



NOUVELLES FONCTIONS DE LA PROTEINE E2F1 DANS LE CONTROLE DE L'EPISSAGE DES TRANSCRITS: IMPLICATION DANS LA CARCINOGENESE BRONCHIQUE

Galina Merdzhanova

► To cite this version:

Galina Merdzhanova. NOUVELLES FONCTIONS DE LA PROTEINE E2F1 DANS LE CONTROLE DE L'EPISSAGE DES TRANSCRITS: IMPLICATION DANS LA CARCINOGENESE BRONCHIQUE. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00411680

HAL Id: tel-00411680

<https://theses.hal.science/tel-00411680>

Submitted on 28 Aug 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

SCIENCES DE LA TECHNOLOGIE ET DE LA SANTÉ
GRENOBLE I

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Spécialité : **Biologie cellulaire et moléculaire**

Présentée par

Galina MERDZHANOVA

Le 7 Mai 2009

Nouvelles fonctions de la protéine E2F1 dans le contrôle de l'épissage des transcrits : implication dans la carcinogénèse bronchique

Jury

Pr. Elisabeth BRAMBILLA, Grenoble,
Dr. Laurence DUBREZ-DALOZ, Dijon
Dr. Jean-Jacque FEIGE, Grenoble
Dr. Laurent CORCOS, Brest,
Dr. Gilles PAGES, Nice
Dr. Béatrice EYMIN, Grenoble

Examineur
Examineur
Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Directrice de Thèse

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé à l'Institut Albert Bonniot, au sein de l'Equipe Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon. Il a été financé par le Ministère de la Recherche Française et par la Fondation pour la Recherche Médicale pour la 4^{ème} année de ma thèse.

Je tiens ici à exprimer tout particulièrement mes sincères remerciements à Docteur Béatrice Eymin pour avoir pris le risque d'accepter l'encadrement d'une étudiante bulgare en thèse et de m'avoir donnée ainsi l'opportunité d'effectuer ma thèse au sein de l'équipe. Merci pour sa confiance, son attention constante et sa rigueur scientifique qui m'ont permis de sentir l'expérience dans la recherche et m'ont inspiré à me développer et me perfectionner dans mon travail. Je voudrais également la remercier pour son aide si précieuse pendant la rédaction de cette thèse et les publications qui l'accompagnent, ainsi que pour sa patience pour rendre compréhensible ce manuscrit. Je tiens enfin à lui exprimer ma sincère gratitude pour son soutien moral sans faille dans toutes les difficultés que j'ai rencontrées au cours de ma thèse, pendant mon congé de maternité et ma nouvelle vie comme mère, qui m'a permis d'avancer dans mon travail, même dans les moments difficiles.

Mes remerciements plus vifs vont également au professeur Elisabeth Brambilla pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Merci pour sa confiance, son regard critique et surtout pour ses conseils si précieux et toutes les discussions fructueuses avec elle au cours des travaux de cette thèse.

Je remercie le professeur Christian Brambilla pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire. Ses appuis m'ont toujours permis de bénéficier d'excellentes conditions scientifiques et matérielles qui m'ont pleinement aidé dans la conduite de mon travail.

Je veux également remercier le Docteur Sylvie Gazzeri de m'avoir accueillie au sein de l'équipe et pour son soutien moral, ses conseils si précieuses et la confiance qu'elle m'a témoignée dès le début de ce travail.

Je souhaite remercier vivement le Docteur Laurent Corcos et le Docteur Gilles Pagès pour avoir accepté d'être rapporteurs sur mon rapport de thèse et de consacrer de temps pour évaluer ce travail.

Je suis également très reconnaissante au Docteur Jean-Jacques Feige et au Docteur Laurence Dubrez-Daloz de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de soutenance de ma thèse.

Un grand Merci à tous les gens (chercheurs, techniciens et étudiants) de l'équipe de l'Unité U823 qui m'ont accueillie dans une ambiance chaleureuse et amicale et qui m'ont vite fait oublier le fait que je suis dans un pays étranger et que la langue française n'est pas ma langue maternelle. Dans ce cadre, je tiens à remercier tout particulièrement Céline Lampréa pour m'avoir sacrifié son temps avec beaucoup de patience afin de partager avec moi ses connaissances pratiques sur le western blot, le RT-PCR et les cultures

cellulaires au début de ma thèse. Je souhaite également remercier Patricia Betton pour son aide si précieuse à la réalisation technique de ce travail.

Mes remerciements chaleureux vont également aux doctorants de mon bureau : Arnaud Van Der Broeck, Valérie Edmond et Peggy Ozenne, pour les discussions quotidiennes sur la vie et sur des questions scientifiques biensûr. J'ai beaucoup apprécié cette ambiance créative et amicale au bureau !

Je remercie particulièrement le Docteur Caroline Salon, dont le travail au laboratoire précède ma thèse. Je souhaite lui témoigner ma reconnaissance pour son aide morale, ses conseils pratiques et l'amitié qu'elle m'a proposée à coeur ouvert dès mon arrivée à l'institut et jusqu'à ce jour.

Je remercie très spécialement mes parents pour leur soutien moral et financier. Ils m'ont donné la possibilité de venir en France et m'ont soutenu dans mon rêve presque impossible pour moi qu'était la réalisation d'une thèse de Doctorat en France. Merci pour votre existence et votre confiance en moi !

Une affectueuse pensée va à mes amis Anne-Sophie, Emilie Naquet-Radiguet et toute sa famille, Emilie Rejaut, Cécile et Christophe Renou sans qui je n'aurais jamais pu venir et tenter ma chance de réaliser une thèse de Doctorat en France ! Leur soutenance et amitié m'ont rendu forte et confiante dans la poursuite de mes rêves.

Quant à Delcho et mon adorable fils Christian qui sont le sens de ma vie, je les remercie de tout mon coeur pour leur soutien et compréhension. L'aide précieuse et efficace de Delcho sur la compréhension et le fonctionnement de EndNote m'a permis de construire rapidement la partie « Bibliographie » de ce manuscrit.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	2
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	7
ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION	15
I CARCINOGENESE BRONCHO-PULMONAIRE : RAPPELS EPIDEMIOLOGIQUES, HISTO-PATHOLOGIQUES ET PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES.	17
I.1 Epidémiologie des cancers pulmonaires	17
I.1.1 Données chiffrées.....	17
I.1.2 Les facteurs étiologiques.....	19
I.2 Classification histologique et pTNM des cancers pulmonaires	20
I.2.1 Classification histologique	20
I.2.2 Classification pathologique pTNM selon l'UICC (2002)	21
I.3 Caractéristiques moléculaires de la carcinogénèse pulmonaire	23
I.3.1 Carcinogénèse bronchique – une carcinogénèse multi-étape	23
I.3.2 Aspects moléculaires du cancer broncho-pulmonaire	25
I.3.2.1 Voies oncogéniques activées dans les cancers du poumon.....	25
I.3.2.2 Inactivation des voies de signalisation des gènes suppresseurs de tumeur dans les cancers bronchiques	27
II LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION E2F1 - UNE PROTEINE AMBIVALENTE	31
II.1 La famille E2F	31
II.1.1 La voie E2F/RB – une voie conservée au cours de l'évolution.....	31
II.1.2 Les membres de la famille E2F chez l'Homme	32
II.1.3 Activités régulatrices de la transcription des membres de la famille E2F	34
II.2 Activités biologiques des E2Fs et régulation de leur fonction.....	37
II.2.1 E2F1 et contrôle du cycle cellulaire.....	38
II.2.1.1 E2F1 – une protéine clé du passage en phase S	38
II.2.1.2 Mécanismes moléculaires de contrôle de l'activité de E2F1 au cours du cycle cellulaire	39
II.2.2 E2F1 et réponse aux dommages de l'ADN.....	44
II.2.3 Apoptose et E2F1	46
II.2.3.1 Généralités sur l'apoptose	46
II.2.3.2 Les acteurs moléculaires de l'apoptose	48
II.2.3.3 Les voies de signalisation de l'apoptose	52

II.2.3.4	E2F1 : facteur pro-apoptotique et anti-apoptotique	56
II.2.4	E2F1 et Angiogénèse	61
II.2.4.1	La famille VEGF.....	62
II.2.4.2	Fonctions biologiques et régulation des VEGFs.....	63
II.2.4.3	Les isoformes VEGF _{xxx} et VEGF _{xxx} b	65
II.2.4.4	E2F1 et angiogénèse	68
II.3	Rôle ambigu de E2F1 au cours de la tumorigénèse	69
II.3.1	Propriétés oncogéniques de E2F1	69
II.3.2	Propriétés suppressives de tumeur de E2F1.....	70
II.3.3	L'expression de E2F1 est altérée dans les tumeurs humaines	71
III	EPISSAGE DES PRE- ARNM CHEZ LES EUCARYOTES.....	72
III.1	Généralités sur l'épissage.....	72
III.1.1	Définition de l'épissage	72
III.1.2	Mécanismes moléculaires de l'épissage	73
III.1.2.1	Séquences nécessaires à l'identification et l'élimination d'introns	73
III.1.2.2	Assemblage des complexes splicéosomaux et facteurs protéiques participant à cet assemblage.....	74
III.1.2.3	Les différentes modes d'épissage alternatif.....	77
III.1.3	Régulation de l'épissage alternatif.....	79
III.1.3.1	Des sites d'épissage sous-optimaux et des éléments de séquences régulatrices agissant en " <i>cis</i> "	79
III.1.3.2	Facteurs protéiques impliqués dans l'épissage et agissant en " <i>trans</i> "	80
III.1.4	Couplage entre transcription et épissage.....	82
III.2	Les protéines SR	86
III.2.1	Présentation de la famille et caractéristiques structurales.....	86
III.2.1.1	Le domaine RRM de fixation à l'ARN des protéines SR.....	88
III.2.1.2	Le domaine RS des protéines SR.....	88
III.2.2	Mécanismes d'action des protéines SR.....	89
III.2.2.1	Rôle des protéines SR dans l'épissage constitutif et alternatif.....	89
III.2.2.2	Rôle des protéines SR dans les mécanismes cellulaires post-épissage.....	93
III.2.3	Fonctions biologiques des protéines SR	95
III.2.3.1	Rôle des protéines SR dans l'apoptose et la réponse aux dommages sur l'ADN	95
III.2.3.2	Rôle des protéines SR au cours du cycle cellulaire	98

III.2.3.3	Rôle des protéines SR dans la stabilité génomique.....	98
III.2.4	Régulation de l'activité des protéines SR	99
III.2.4.1	Rôle de la phosphorylation des protéines SR dans la réaction d'épissage	100
III.2.4.2	Rôle de la phosphorylation dans la localisation sub-nucléaire des protéines SR	100
III.2.4.3	Rôle de la phosphorylation des protéines SR dans la navette noyau-cytoplasme	102
III.2.4.4	Kinase et phosphatases impliquées dans le contrôle de la phosphorylation réversible des protéines SR.....	105
III.2.4.5	Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des protéines SR	107
III.3	Epissage et cancer	108
III.3.1	Mutations « <i>en cis</i> »	109
III.3.2	Anomalies affectant les protéines régulant l'épissage.....	111
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....		113
RESULTATS		117
I	E2F1 CONTROLE L'EPISSAGE ALTERNATIF DE GENES IMPLIQUES DANS L'APOPTOSE EN STIMULANT L'EXPRESSION DU FACTEUR D'EPISSAGE SC35 ..	118
I.1	Présentation de l'étude	118
I.2	Article 1.....	120
II	E2F1 MODIFIE L'EXPRESSION DES VARIANTS D'EPISSAGE PRO- VERSUS ANTI-ANGIOGENIQUES DU VEGF-A DANS LES LIGNEES CELLULAIRES DE CARCINOME PULMONAIRE HUMAINES	121
II.1	Présentation de l'étude.	121
II.2	Article 2.....	122
III	RESULTATS NON PUBLIES	123
III.1	Effet de E2F1 sur la phosphorylation de SC35 et sur sa localisation sub-cellulaire	123
III.1.1	E2F1 induit l'accumulation d'une forme phosphorylée de SC35.....	123
III.1.2	Implication de la voie PI3Kinase/AKT dans la phosphorylation de SC35 en réponse à E2F1.....	124
III.1.3	E2F1 affecte l'épissage de la kinase Clk/Sty.....	125
III.2	Effet de E2F1 sur l'épissage de SC35: existence d'une boucle de rétrocontrôle négatif?.....	127
III.3	Rôle de SC35 dans les fonctions prolifératives de E2F1 (Edmond, Merdzhanova, en préparation)	128

DISCUSSION	135
I E2F1 ET SC35: UNE INTERCONNEXION ETROITE POUR LE CONTROLE DE LA CROISSANCE CELLULAIRE	136
I.1 SC35 : une nouvelle cible de E2F1	136
I.1.1 SC35 : cible transcriptionnelle directe de E2F1.....	136
I.1.2 E2F1 contrôle l'épissage de SC35.....	137
I.1.3 E2F1 régule la phosphorylation de SC35	138
I.1.4 E2F1 et SC35 interagissent directement	140
I.2 E2F1 et SC35 coopèrent pour induire l'apoptose.....	141
I.2.1 Caractérisation d'une nouvelle voie de signalisation par laquelle E2F1 induit l'apoptose.....	141
I.2.2 Rôle de cette voie dans la réponse aux agents génotoxiques.....	142
I.3 SC35 contrôle les fonctions prolifératives de E2F1.....	144
I.3.1 SC35: une protéine qui cycle au cours de la division cellulaire	144
I.3.2 SC35: un régulateur des activités transactivatrices de E2F1	145
II IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE FONCTION BIOLOGIQUE DE E2F1 DANS LE CONTROLE DU PROCESSUS ANGIOGENIQUE.....	146
II.1 E2F1 affecte la balance des variants pro- versus anti-angiogéniques du VEGF-A .	146
II.2 Rôle des protéines SR dans cette fonction.....	147
III IMPLICATION DES PROTEINES E2F1 ET SC35 AU COURS DU PROCESSUS DE CARCINOGENESE BRONCHIQUE	149
III.1 Expression des protéines E2F1 et SC35 dans les tumeurs bronchiques	149
III.2 Conséquences possibles sur la carcinogénèse bronchique.....	150
CONCLUSION	152
BIBLIOGRAPHIE.....	155
ANNEXE	197

TABLES DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1: ESTIMATION DE L'INCIDENCE ET DE LA MORTALITÉ DES CANCERS EN EUROPE EN 2006.	18
FIGURE 2: ACCUMULATION DES ALTERATIONS GENETIQUES AU COURS DE LA CARCINOGENESE BRONCHO-PULMONAIRE MULTI-ETAPE: EXEMPLE DES CARCINOMES BRONCHIQUES NON A PETITES CELLULES (CBNPC).	24
FIGURE 3: ALTERATIONS DES VOIES SUPPRESSIVES DE TUMEUR AU COURS DE LA CARCINOGENESE BRONCHIQUE.	28
FIGURE 4: CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES PROTEINES DE LA FAMILLE E2F ET DE LEURS PARTENAIRES LES PROTEINES DP.	33
FIGURE 5: LES DIFFERENTS SOUS-GROUPES DE LA FAMILLE E2F.	34
FIGURE 6: MECANISMES D'ACTIVATION VERSUS REPRESSION DE LA TRANSCRIPTION DEPENDANTE DES FACTEURS E2FS.	36
FIGURE 7: TRANSITION G1/S DU CYCLE CELLULAIRE.	39
FIGURE 8: MECANISMES DE REPRESSION DE LA TRANSCRIPTION DEPENDANTE DE E2F1, MEDIEE PAR RB.	40
FIGURE 9: ROLE DE E2F1 DANS LA REPOSE AUX DOMMAGES DE L'ADN.	45
FIGURE 10: CONSEQUENCE PATHOLOGIQUES D'UNE DEREGULATION DE L'APOPTOSE	47
FIGURE 11: MODIFICATIONS SEQUENTIELLES ULTRASTRUCTURALES DE L'APOPTOSE ET DE LA NECROSE.	47
FIGURE 12: LA FAMILLE DES CASPASES CHEZ LES MAMMIFERES.	49
FIGURE 13: STRUCTURE ET MODE D'ACTIVATION DES CASPASES.	50
FIGURE 14: LA FAMILLE BCL-2.	51
FIGURE 15: LES DEUX GRANDES VOIES APOPTOTIQUES.	52
FIGURE 16: RECEPTEURS DE MORT ET LEURS LIGANDS.	54
FIGURE 17: DIFFERENTES VOIES PRO-APOPTOTIQUES DEPENDANTES DE E2F1.	57
FIGURE 18 : ORGANISATION GENETIQUE DES MEMBRES HUMAINS DE LA FAMILLE VEGF.	63
FIGURE 19: ROLE DES RECEPTEURS TYROSINE KINASE VEGFRS.	64
FIGURE 20: STRUCTURE C-TERMINALE DU GENE DU VEGF.	66
FIGURE 21 : SEQUENCES ESSENTIELLES A LA REACTION D'EPISSAGE (PATEL AND STEITZ, 2003)	74
FIGURE 22 : ASSEMBLAGE DU SPLICEOSOME ET INTERACTIONS SEQUENTIELLES DES PROTEINES SR SUR LE PRE-ARNM.	75
FIGURE 23: FORMATION DU SPLICEOSOME APRES ASSEMBLAGE DES SNRNP ET D'AUTRES PROTEINES AU NIVEAU DES SITES D'EPISSAGE.	76
FIGURE 24 : LES DIFFERENTS MODES D'EPISSAGE ALTERNATIF.	77
FIGURE 25 : REGULATION DE L'EPISSAGE ALTERNATIF PAR DES ELEMENTS DE SEQUENCES REGULATRICES.	80
FIGURE 26: MODELE DU COUPLAGE TRANSCRIPTION/EPISSAGE.	83
FIGURE 27: TRANSCRIPTION ET EPISSAGE, DEUX EVENEMENTS COUPLES POUR UN MEILLEUR CONTROLE DE L'EXPRESSION DES GENES.	85
FIGURE 28: ORGANISATION STRUCTURALE DES PROTEINES SR.	87

FIGURE 29: ACTIVATION D'ÉPISSAGE PAR LES PROTEINES SR D'UNE MANIÈRE EXON-DEPENDANT.	90
FIGURE 30: MODELES DE MECANISMES D'ACTION DES PROTEINES SR INDEPENDANT DE LEUR FIXATION SUR LES SEQUENCES ESE.	91
FIGURE 31 : MODELE D'INHIBITION D'ÉPISSAGE.	92
FIGURE 32: RÔLE CENTRAL DES PROTEINES SR DANS LE RESEAU DES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRES IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF.	99
FIGURE 33 : MODELE DE LA STRUCTURE DES SPECKLES.	102
FIGURE 34: RÔLE DE LA PHOSPHORYLATION REVERSIBLE DE CERTAINES PROTEINES SR QUI FONT LA NAVETTE ENTRE LE NOYAU ET LE CYTOPLASME POUR LEUR LOCALISATION SUBCELLULAIRE ET LEUR ACTIVITE BIOLOGIQUE.	103
FIGURE 35: DEUX VOIES DISTINCTES DE RECYCLAGE DES PROTEINES SR AU COURS DE L'ÉPISSAGE ET LA MATURATION DE L'ARNM.	104
FIGURE 36: ANOMALIES DE L'ÉPISSAGE DU PRE-ARNM CONDUISANT A DIVERSES PATHOLOGIES.	109
FIGURE 37: CAUSES ET POSSIBLES CONSEQUENCES FONCTIONNELLES DES ANOMALIES AFFECTANT L'ÉPISSAGE DES PRE-ARNM.	112
FIGURE 38: E2F-1 STIMULE LA PHOSPHORYLATION DE SC35 ET SA LOCALISATION DANS LES SPECKLES NUCLEAIRES.	124
FIGURE 39: LA VOIE DE SIGNALISATION AKT EST IMPLIQUÉE DANS LA PHOSPHORYLATION DE SC35 EN RÉPONSE À E2F-1. LES CELLULES H358 TET-ON E2F1 ONT ÉTÉ CULTIVÉES EN ABSENCE (-) OU PRÉSENCE (+) DE 1µG/ML DE DOXYCYCLINE PENDANT 72H, ET EN PRÉSENCE (+) OU ABSENCE (-) SOIT DE WORTMANNIN (250HM) OU DE L'INHIBITEUR D'AKT VIII (5µM).	125
FIGURE 40: E2F1 MODIFIE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE CLK/STY VIA SC35.	126
FIGURE 41: E2F1 AFFECTE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE SC35 VIA SC35.	127
FIGURE 42: AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE, SC35 EST EXPRIMÉE D'UNE MANIÈRE CYCLIQUE ET S'ACCUMULE AU MOMENT DE LA TRANSITION ET PROGRESSION EN PHASE S.	129
FIGURE 43: SC35 EST IMPLIQUÉ DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE CERTAINES DES CIBLES TRANSCRIPTIONNELLES DE E2F1.	130
FIGURE 44: LA SUREXPRESSION DE SC35 INDUIT L'ACCUMULATION DE CERTAINS GENES CIBLES DE E2F1 ET CONDUIT A UNE ACCUMULATION DES CELLULES EN PHASE S.	130
FIGURE 45: LES PROTEINES E2F1 ET SC35 INTERAGISSENT. CARACTÉRISATION DES SITES D'INTERACTION DE SC35 SUR LA PROTEINE E2F1.	131
FIGURE 46: SC35 STIMULE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DE E2F1 SUR LE PROMOTEUR DE SES GENES CIBLES CYCLINE E ET P45 ^{SKP2} .	133
FIGURE 47: EFFET DE LA VOIE AKT SUR LES FONCTIONS DE E2F1 ET SC35.	134
FIGURE 48: HYPOTHÈSE DE TRAVAIL BASÉE SUR LE COUPLAGE TRANSCRIPTION/ÉPISSAGE.	141
FIGURE 49: RÔLE HYPOTHÉTIQUE DES PROTEINES E2F1 ET/OU SC35 AU COURS DE LA CARCINOGENÈSE BRONCHIQUE.	151

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION PTNM SELON L'UICC 2002 (6 ^{EME} EDITION)	22
TABLEAU 2: EXEMPLE D'ONCOGENES ET DE GENES SUPPRESSEURS DE TUMEUR IMPLIQUES DANS LA CARCINOGENESE BRONCHO-PULMONAIRE.....	26
TABLEAU 3: EXEMPLES DE GENES CIBLES DE E2F1 L'IMPLIQUANT DANS DES PROCESSUS CELLULAIRES VARIES.	37
TABLEAU 4: ROLES DES PROTEINES SR DANS L'EXPRESSION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DES GENES.	94
TABLEAU 5: EXEMPLES DE FACTEURS APOPTOTIQUES REGULES PAR EPISSAGE ALTERNATIF ET CONSEQUENCES FONCTIONNELLES.	96
TABLEAU 6: EXEMPLE DE MUTATIONS QUI ONT LIEU DANS DES SEQUENCES AGISSANT EN "CIS" ET QUI SONT ASSOCIEES AVEC LE DEVELOPPEMENT DE MALADIES MALIGNES.	110

ABBREVIATIONS

ADC: adénocarcinome
 AIF: Apoptosis Inducing Factor
 APAF-1: Apoptotic Protease Activating Factor 1
 ARF: Alternative Reading Frame
 ARN: Acide Ribonucléique
 ARNm: ARN messenger
 ATM/ATR: Ataxia Telangiectasia Mutated/Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related
 BCL-2: B-Cell Lymphoma Protein 2
 CAP: capping de l'ARNm
 CARD: Caspase Recrutement Domain
 Caspases: Cystein Aspartic Acid-Protease
 CAT: chloramphenicol acetyl transferase
 CBnPC: carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules
 CCK-B: Cholecystokinin –B/gastrin
 c-FLIP: FADD-ICE like Inhibitory Proteins
 ChIP: chromatin immunoprecipitation
 CHK 1/2: Checkpoint Kinase 1/2
 CPC: carcinomes à petites cellules
 Crm A: Cytokine response modifier gene A
 CTD: domaine carboxyterminal de l'ARN polymérase II
 DBD: deuxième domaine de liaison à l'ADN
 DD: Death Domain
 DED: Death Effector Domain
 DHFR: DiHydroFolate Reductase
 DISC: Death Inducing Signaling Complex
 DR4/5: Death Receptor 4/5
 E2F1: E2F Factor 1
 ECM: matrice extracellulaire
 EGF: Epidermal Growth Factor
 EJC: Exon Junction Complex
 ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
 ESE: Exonic Splicing Enhancer
 ESS: Exonic Splicing Silencer
 FADD: Fas Associated Death Domain
 FASL: Fas Ligand

FGF: Fibroblast Growth Factor
 FLIP_C: isoforme courte de FLIP; FLIP_L: isoforme longue de FLIP
 HAT: Histone Acetyl Transferase
 HDAC: enzymes histone déacétylases
 HIF-1: Hypoxia Inducible Factor-1
 hnRNP: Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein
 HRE: Hypoxia Responsive Enhancer Element
 IAP: Inhibitor of Apoptosis
 ICAD: Inhibitor of Caspase-Activated DNase I
 IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1
 IGHD II: Isolated Growth Hormone Deficiency type II
 IHC: immunohistochimie
 IL-1 α : interleukin-1 α
 IL-6: interleukin-6
 ISE: Intronic Splicing Enhancer
 ISS: Intronic Splicing Silencer
 K5: Keratine 5
 MB: Marked Box
 MEFs: Mouse Embryonic Fibroblasts
 MMS: methylmethanesulfonat
 NES: Nuclear Export Signal
 NLS: Nuclear Localisation Signal
 NMD: Non Sense Mediated Decay
 Non-snRNP: Non-small Nuclear Ribonucleoproteins
 NRP 1/2: neuropilines 1/2
 NRS: Nuclear Retention Signal
 p54nrb: p54 nuclear RNA-binding protein
 PcG: complexe polycomb mammifère
 PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
 PI3 Kinase: Phosphatidylinositol
 PKCI-1: Protein Kinase C-Interacting protein
 PLGF: Placental Growth Factor
 pol II: Polymérase II
 PP1: Protein Phosphatase 1
 pré-ARNm: ARN pré-messagers

PSF: Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor
 Py: enchaînements de pyrimidine
 RBD: RNA Binding Domain
 RRM: RNA Recognition Motif
 RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
 RT-qPCR: Real Time Quantitative PCR
 SELEX: Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment
 SFCs: Splicing Factor Compartments
 siRNA: small interfering RNA
 SKP2: S-Phase Associated kinase Protein 2
 SLM-2: Sam68-like mammalian protein-2
 snRNP: Small Nuclear Ribonucleoproteins
 SR: Serine-Rich Arginine Proteins
 SRPK1/2: SR Protein Kinase 1/2
 SRrp: SR related protein
 TGF- β : Transforming growth factor- β
 TNF α : Tumor necrosis factor α
 TNF: Tumor Necrosis Factor
 TRADD: TRAIL Associated Death Domain
 TRAF2: TNF Receptor Associated Factor 2
 TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
 TRAILR 1/2: TRAIL Receptor 1/2
 UIP: Usual Interstitial Pneumonia
 UsnRNA: Uridine-rich small nuclear ribonucleic acids
 UsnRNP: Uridine-rich Small Nuclear Ribonucleoparticle
 VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
 VEGFR 1/2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1/2

INTRODUCTION

Mon travail de thèse a porté sur le rôle du facteur de transcription E2F1 dans les cancers du poumon et a permis notamment de mettre en évidence un lien entre E2F1 et certaines des protéines contrôlant le processus de l'épissage alternatif des transcrits.

C'est pourquoi, j'ai choisi de scinder mon introduction bibliographique en trois parties:

- Une première partie présentant le modèle du cancer du poumon et les grandes lignes de la carcinogénèse bronchique.
- Une seconde partie axée sur les fonctions biologiques de E2F1 et sa contribution à la pathogénèse tumorale.
- Une troisième partie décrivant brièvement ce qu'est l'épissage alternatif des pré-ARNms et le rôle d'acteurs protéiques clés de ce processus, les protéines de la famille SR (Serine-Rich Arginine).

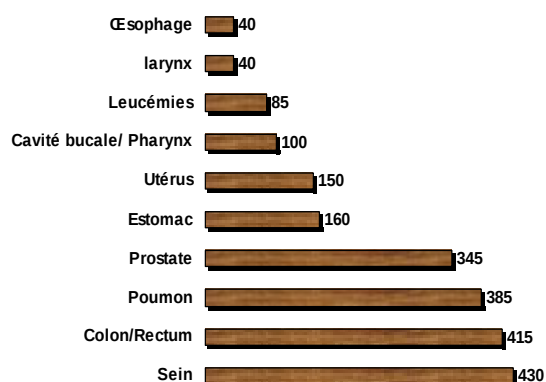
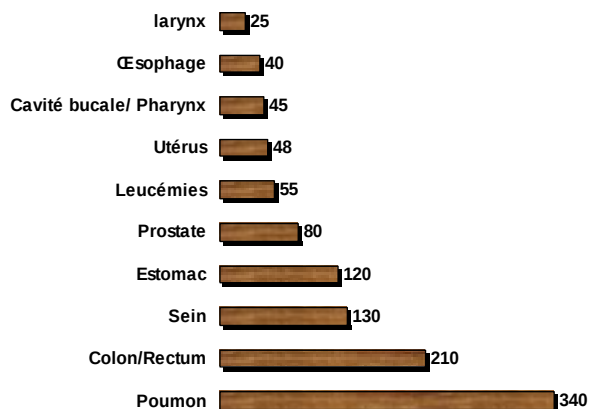
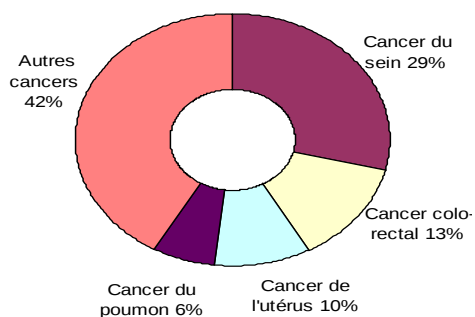
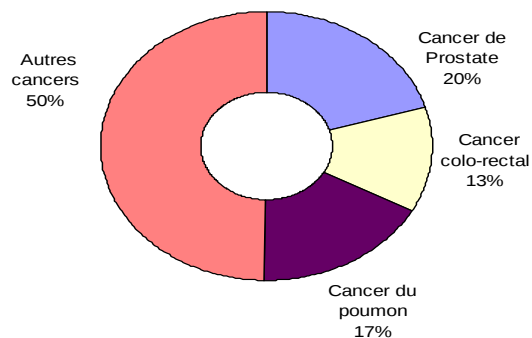
I CARCINOGENESE BRONCHO-PULMONAIRE : RAPPELS EPIDEMIOLOGIQUES, HISTO-PATHOLOGIQUES ET PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES

I.1 Epidémiologie des cancers pulmonaires

I.1.1 Données chiffrées

Le cancer bronchopulmonaire constitue la première cause de mortalité par cancer chez l'homme. En Europe, les dernières estimations de 2006 indiquent que le cancer du poumon est le 3^e cancer le plus fréquemment diagnostiqué (386000 cas, soit 12,1 % de tous les cas de cancer) après le cancer du sein (429900 cas, soit 13,5 %) et le cancer colo-rectal (412900, soit 12,9 %). Chez l'homme, si son incidence a légèrement reculé depuis 2004, il reste la première cause de mortalité par cancer à l'origine de 334800 décès en 2006 (soit 19,7 % de l'ensemble des décès liés au cancer). Chez la femme, il est la troisième cause de mortalité par cancer (64 100 cas, soit 12,5% de l'ensemble de décès liés au cancer), avec un pourcentage très élevé, observé en Europe Centrale et Europe du Nord (Islande, Suède, Danemark) (Ferlay, et al., 2007) (**Figure 1**).

Le taux de survie du cancer du poumon à 5 ans reste médiocre, inférieur à 15 % au niveau mondial (Greenlee, et al., 2000), la moyenne européenne n'excédant pas 10 % soit à peine mieux que celle des pays en voie de développement [8, 9% - (Parkin, et al., 2005)]. Ce mauvais pronostic est étroitement lié au fait que 70% des patients présentent un stade avancé et sont donc inopérables au moment du diagnostic. La survie globale est en effet très fortement corrélée au stade. Les patients au stade IA présentent une survie à 5 ans de 70 % qui chute à 40 % pour un stade II et à 5 % lorsque le diagnostic est posé à un stade métastatique (stade IV).

A. Incidence des cancers par localisation en Europe en 2006, pour les deux sexes, (en milliers)**B. Mortalité des cancers par localisation en Europe en 2006, pour les deux sexes, (en milliers)****C. Cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez la femme en Europe en 2006****D. Cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez l'homme en Europe en 2006****Figure 1: Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers en Europe en 2006.**

Incidence (A) et mortalité (B) pour les deux sexes confondus. Incidence des cancers les plus fréquents chez la femme (C) et chez l'homme (D).

Adapté d'après Ferlay, et al., 2007.

I.1.2 Les facteurs étiologiques

Entre 85 et 90 % des décès par cancer bronchique sont directement attribués au tabagisme et les tendances de l'incidence ou de la mortalité sont le reflet de l'évolution de sa consommation. Plus de 300 composants chimiques ont été détectés dans la fumée de cigarette et 40 d'entre eux sont connus pour être des carcinogènes. Selon Williams & Sandler, le risque relatif dépend de la quantité consommée : il passe de 15 pour ½ paquet par jour à 64 pour 2 paquets par jour (pour un risque à 1 chez un non-fumeur) (Williams and Sandler, 2001). Ce risque décroît avec l'arrêt de la consommation pour stagner à 1,5 – 2, 20 ans après le sevrage tabagique. Cependant en 2007, Lubin et ses collaborateurs ont développé un modèle démontrant que ce risque n'augmente pas de manière linéaire avec le nombre de cigarettes fumées par jour. Sur la base de ces résultats, ils ont même proposé l'idée que le potentiel carcinogène de certaines substances du tabac est réduit chez les gros fumeurs (Lubin, et al., 2007). Enfin, 50 % des cancers bronchiques surviennent chez les non-fumeurs mais un tiers de ces cas est directement lié au tabagisme passif. Ainsi, il existe une association entre le développement d'un cancer bronchopulmonaire et une exposition de longue durée à un tabagisme passif, avec un risque relatif évalué à 1,4 (Williams and Sandler, 2001). De plus, il a été démontré qu'un enfant est plus susceptible au tabagisme passif qu'un adulte. Le tabagisme passif de l'enfant potentialiserait l'effet de l'exposition de longue durée observé chez l'adulte en déterminant le développement du cancer du poumon (Lee, et al., 2000).

D'autres facteurs comme l'exposition professionnelle à certains produits industriels ont été associés au cancer bronchique. L'exposition à des dérivés du chrome, du nickel, du béryllium et de l'arsenic, et à des produits à base de pétrole peut accroître le risque de cancer du poumon, surtout chez les fumeurs (Alberg, et al., 2005). Il a été démontré que la fumée de cigarette exerce un effet synergique avec l'amiante en ralentissant les battements ciliaires et la phagocytose des macrophages alvéolaires, ce qui facilite la rétention pulmonaire des fibres d'amiante (Craighead, 1984). L'inhalation de produits radioactifs comme le radon (un gaz radioactif de la famille de l'uranium) est également un facteur étiologique reconnu chez les mineurs. Enfin, certaines pneumopathies interstitielles fibrosantes comme l'UIP (Usual Interstitial Pneumonia) sont associées à une incidence plus élevée de cancer pulmonaire.

I.2 Classification histologique et pTNM des cancers pulmonaires

I.2.1 Classification histologique

L'intérêt d'une telle classification repose sur la nécessité de délivrer un diagnostic qui permette l'inclusion des patients dans des protocoles thérapeutiques et serve de base aux études épidémiologiques et biologiques. Il doit reposer sur des critères histologiques simples, reproductibles et donc utilisables par tous les pathologistes.

La récente classification de l'OMS de 1999 (Travis, 2002) et sa mise à jour en 2006 (Travis, et al., 2006) ont intégré de nouvelles entités depuis celles de 1981 et ont redéfini les critères diagnostiques des lésions prénéoplasiques bronchiques. A ce jour, deux catégories principales de tumeurs sont reconnues, notamment en terme de prise en charge thérapeutique: (a) les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBnPC) comprenant entre autre les carcinomes malpighiens et les adénocarcinomes; (b) les tumeurs à différenciation neuroendocrine comprenant les carcinoïdes (typiques et atypiques), les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules et les carcinomes à petites cellules (CPC). D'autre part, à la lumière de cette classification histologique, se dessine un spectre lésionnel d'agressivité croissante pour les tumeurs à différenciation neuroendocrine, qui comprend dans un ordre croissant d'agressivité: le carcinoïde typique, atypique, le carcinome neuroendocrine à grandes cellules et le carcinome à petites cellules (CPC). Par ordre de fréquence décroissante, les sous-types histologiques les plus fréquemment rencontrée sont les adénocarcinomes, les carcinomes malpighiens, les carcinomes à petites cellules, les carcinomes à grandes cellules et les carcinoïdes. Les entités plus rares regroupent entre autres les carcinomes sarcomatoïdes et les carcinomes adénosquameux.

I.2.2 Classification pathologique pTNM selon l'UICC (2002)

C'est la classification d'extension tumorale de référence pour les cliniciens et les pathologistes. Elle permet de définir le stade histopathologique d'extension d'une tumeur (pTNM) après examen macroscopique et microscopique de la pièce de résection par le pathologiste.

Le stade histopathologique reflète le degré d'invasion tumorale. La classification pTNM est basée sur trois éléments : T= taille et/ou extension de la tumeur primitive, N= présence ou absence de métastases ganglionnaires (ganglions locorégionaux) et M= présence ou absence de métastases à distance (**Tableau1**).

Le stade TNM peut être regroupé en 5 grandes catégories:

0: Tis N0M0

IA: T1N0M0

IB : T2N0M0

IIA : T1N1M0

IIB : T2N1M0 T3N0M0

IIIA: T1N2M0 T2N2M0 T3N1M0

T3N2M0

IIIB: T4 ou N3M0

IV: M1

Classification TNM

pT: tumeur primitive

pT0: pas de tumeur.

pTis: carcinome « *in situ* ».

pT1: tumeur de 3 cm maximum sans invasion bronchoscopique d'une bronche souche.

pT2: tumeur de plus 3 cm, ou envahissant une bronche souche à plus de 2 cm de la carène, ou envahissant la plèvre viscérale ou associée à une atélectasie ou une pneumonie obstructive.

pT3: tumeur envahissant la paroi thoracique, le diaphragme, la plèvre médiastinale, pariétale, le péricarde pariétal ou située à moins de 2 cm de la carène ou associée à une atélectasie ou une pneumonie obstructive de tout un poumon.

pT4: tumeur envahissant le médiastin, le cœur, les gros vaisseaux, la trachée, l'œsophage, le corps vertébral, la carène, associée à une pleurésie maligne, ou avec des nodules satellites dans le même lobe.

pN: ganglions régionaux

pN0: absence (après examen microscopique).

pN1: métastase(s) ganglionnaire(s) péribronchique(s) ou périhilaire(s) ipsilatérale(s) ou intraparenchymateuse(s), incluant l'atteinte ganglionnaire par extension directe.

pT2: métastase(s) ganglionnaire(s) médiastinale(s) ou sous carénaire(s) ipsilatérale(s).

pT3: métastase(s) ganglionnaire(s) médiastinale(s) ou hilaire(s) controlatérale(s) ou susclaviculaire ipsi ou controlatérale.

pM: métastase à distance

pM0: absence de métastase à distance.

pM1: métastase(s) à distance incluant des nodules satellites de deux lobes différents.

Tableau 1 : Classification pTNM selon l'UICC 2002 (6^{ème} édition)

I.3 Caractéristiques moléculaires de la carcinogénèse pulmonaire

I.3.1 Carcinogénèse bronchique – une carcinogénèse multi-étape

Les données épidémiologiques démontrent que relativement peu de personnes développant un cancer bronchique sont exposées à un carcinogène dans le cadre de leur profession. Environ 10 – 15 % des gros fumeurs développent un carcinome bronchique. Il apparaît donc que certains facteurs génétiques confèrent à certains fumeurs une plus grande susceptibilité au développement d'un cancer pulmonaire.

Le cancer bronchique résulte de l'accumulation séquentielle, sur une période relativement longue, d'anomalies génétiques et épigénétiques qui dérèglent par étapes successives (carcinogénèse multi-étape) les mécanismes de contrôle de la croissance des cellules épithéliales de l'arbre bronchique. Sur le plan morphologique, ces anomalies résultent d'une très forte instabilité génétique induisant une transformation progressive de l'épithélium normal bronchique en épithélium hyperplasique, dysplasique puis en carcinome "*in situ*" et carcinome invasif (Osada and Takahashi, 2002) (**Figure 2**).

D'une manière générale, les altérations génétiques les plus précoces ne s'accompagnent pas de modifications morphologiques (Shivapurkar, et al., 2000). C'est seulement à la suite d'une accumulation d'un nombre critique d'anomalies génétiques que les stades morphologiques précoces peuvent être diagnostiqués (Thiberville, et al., 1995; Wistuba, et al., 2000). De plus, certains travaux suggèrent que ce n'est pas tant l'ordre des altérations que leur accumulation progressive qui détermine la transition vers des lésions au potentiel évolutif plus important (**Figure 2**).

Ce modèle de carcinogénèse broncho-pulmonaire corrèle avec le modèle proposé par Hanahan et Weinberg selon lequel les anomalies génétiques sont responsables de l'acquisition, par la cellule épithéliale normale, de six propriétés essentielles qui vont la transformer en cellule tumorale (Hanahan and Weinberg, 2000).

- (1) l'auto-suffisance (indépendance) vis-à-vis des facteurs de croissance qui permet aux cellules de rester dans un état de prolifération active et soutenue,
- (2) l'insensibilité vis-à-vis des signaux inhibiteurs de croissance,
- (3) la capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée nommée apoptose,
- (4) l'acquisition d'un potentiel répliatif illimité (échappement à la sénescence répliatif),
- (5) la capacité à induire un réseau de néovaisseaux ou néoangiogénèse,
- (6) la capacité de s'implanter à distance de son tissu d'origine – pouvoir métastatique.

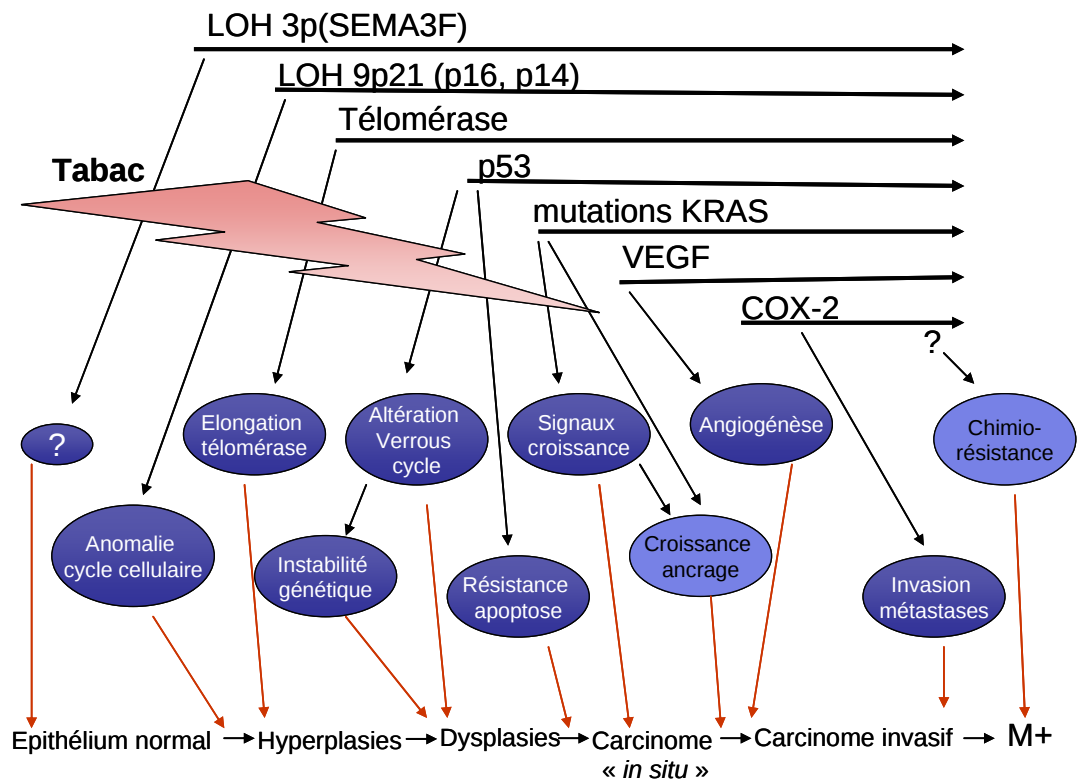


Figure 2: Accumulation des altérations génétiques au cours de la carcinogénèse broncho-pulmonaire multi-étape: exemple des carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBnPC).

Sous l'effet de l'exposition aux carcinogènes du tabac de nombreuses anomalies génétiques et épigénétiques s'accumulent et transforment progressivement l'épithélium bronchique normal en épithélium hyperplasique, métaplasique, dysplasique puis en carcinome *in situ* et en carcinome invasif. Les conséquences biologiques d'une telle accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques sont indiquées.

M+ : métastases

Adapté d'après Osada and Takahashi, 2002.

I.3.2 Aspects moléculaires du cancer broncho-pulmonaire

L'homéostasie tissulaire est un mécanisme intime qui régule l'équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaires, assurant le maintien de la structure et le fonctionnement d'un tissu. Au sein d'une population cellulaire normale, cette homéostasie nécessite l'expression équilibrée de gènes prolifératifs, favorisant la division et la survie cellulaire (proto-oncogènes) et de gènes antiprolifératifs (gènes suppresseurs de tumeurs) freinant le cycle cellulaire ou induisant l'apoptose. La rupture de cet équilibre au cours de la carcinogénèse bronchique est la conséquence d'une activité anormale de certains proto-oncogènes corrélée à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur.

I.3.2.1 Voies oncogéniques activées dans les cancers du poumon

Les proto-oncogènes codent pour des gènes essentiels à la division cellulaire. Ils ont été identifiés pour la première fois chez les rétrovirus et sont responsables de leurs propriétés cancérigènes, mais leurs versions modifiées sont présentes dans toutes les cellules normales chez les mammifères. Dans les cellules tumorales, la modification de structure (altérations qualitatives) ou d'expression (altérations quantitatives) de ces gènes en réponse à des mutations, amplifications géniques, translocations chromosomiques ou à des anomalies épigénétiques conduit à leur activation constitutive sous la forme d'oncogènes. Les protéines produites par les proto-oncogènes ont des rôles variés. Certaines sont excrétées et sont des facteurs de croissance agissant à distance comme des hormones pour stimuler la prolifération de leurs cellules-cibles. D'autres sont des récepteurs de ces facteurs de croissance présents au niveau de la membrane cytoplasmique (par exemple c-erbB1 qui produit le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor)). De nombreux proto-oncogènes (*c-ras*), sont impliqués dans les voies de signalisation et acheminent le signal de la membrane jusqu'au noyau où se prennent les décisions de prolifération ou de différenciation. Leur surexpression ainsi que celle de leurs récepteurs par les cellules tumorales sont à l'origine de boucles de croissance autocrines ou paracrines qui permettent d'acquérir une indépendance par rapport au milieu extracellulaire. Par exemple, la surexpression de facteurs de croissance impliqués dans l'angiogénèse incluant les cytokines VEGFs (Vascular Endothelial Growth Factor) (Brambilla, et al., 2000; Merrick, et al., 2005) et leurs récepteurs VEGFR1, VEGFR2, neuropilines 1 et 2 (Lantuejoul, et al., 2003) intervient de manière non négligeable dans le développement des cancers broncho-pulmonaires. Certains oncogènes sont capables d'induire (seul ou en coopération) la transformation tumorale, certains étant capable d'immortaliser les cellules (*c-myc*) ou d'induire l'acquisition du phénotype tumoral (*Ras*). Le tableau 2 présente certains des oncogènes dont l'activation a été décrite dans les carcinomes pulmonaires.

Nom	Fonction	Mécanismes d'activation	Fréquence de surexpression
Oncogènes			
C-erbB1	Récepteur membranaire à tyrosine- kinase	*Mutation somatique - 31 % des adénocarcinomes *Autre: dérégulation transcriptionnelle et traductionnelle	45 à 90% des CBnPC
C-erbB2/Neu	Récepteur membranaire à tyrosine- kinase	*Amplification génique *Mutation 4% ADC	20 % des adénocarcinomes
K-ras	Protéine G sous-membranaire Transduction du signal de croissance	*Mutation somatique des codons 12, 13 et 61	14 % des adénocarcinomes
c-Myc	Facteur de transcription	*Amplification génique 5-15 % CPC *Dérégulation transcriptionnelle	5 -10 % des CBnPC et 15 - 30 % des CPC
PI3 kinase	Protéine kinase sous-membranaire Transduction du signal de croissance	*Amplification génique *Mutation somatique 4% des CBnPC	
Bcl-2	Protéine anti-apoptotique	*Dérégulation transcriptionnelle et traductionnelle	10 - 35 % des CBnPC et 75 - 95 % des CPC
Gènes suppresseurs de tumeur			
RB	Facteur antiprolifératif	*Inactivation par délétion ou mutation 13q14 *Inactivation par hyperphosphorylation dans CBnPC	15 -30 % des CBnPC et 90 % des CPC
p53	Facteur de transcription	*Inactivation par mutation ou délétion (perte d'hétérozygotie)	50 % des CBnPC et 80 - 90 % des CPC

Tableau 2: Exemple d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans la carcinogénèse broncho-pulmonaire.

CBnPC: carcinome bronchique non à petite cellule

CPC: carcinome à petites cellules

ADC: adénocarcinome

I.3.2.2 Inactivation des voies de signalisation des gènes suppresseurs de tumeur dans les cancers bronchiques

Les gènes suppresseurs de tumeur exercent à l'état normal une fonction régulatrice négative sur la prolifération cellulaire (Weinberg and van Eyck, 1991). Les produits de ces gènes sont capables de contrecarrer l'effet des oncogènes et d'inhiber le phénotype tumoral d'où leur nom de gènes suppresseurs de tumeur. De façon importante, l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur est l'une des étapes les plus précoces de la carcinogénèse bronchique.

Ainsi, des délétions des régions chromosomiques 3p, 9p21, 13q14 et 17p13 sont souvent observées dans les lésions précédant la transformation des cellules épithéliales bronchiques en cellules tumorales. Ces données suggèrent l'importance de gènes suppresseurs de tumeurs situés dans ces régions génomiques pour la pathogénèse pulmonaire. En 9p21, 13q14 et 17p13 sont situés les gènes de p16^{INK4A}/p14^{ARF}, p15^{INK4B}, RB et p53. Leurs protéines sont fonctionnellement liées au sein des deux grandes voies de signalisation p16^{INK4A}/RB-E2F1 et p53/p14^{ARF}-MDM2 (Osada and Takahashi, 2002; Sekido, et al., 2003) (**Figure 3**). Ces voies contribuent au bon déroulement du cycle cellulaire et au maintien de l'intégrité du génome en raison de leur implication au niveau des points de contrôle activés lors du passage entre les phases G1-S et G2-M du cycle cellulaire. Ces points de contrôle (checkpoints) sont des centres décisionnels dictant à la cellule son devenir selon les signaux qu'elle reçoit (altération de l'ADN par exemple): progression dans le cycle cellulaire, arrêt du cycle pour réparation de l'ADN endommagé ou mort par apoptose si la cellule est incapable de réparer les lésions génomiques. Les voies de signalisation p53 et RB sont inactivées dans la quasi-totalité des cancers bronchiques (**Tableau 2**).

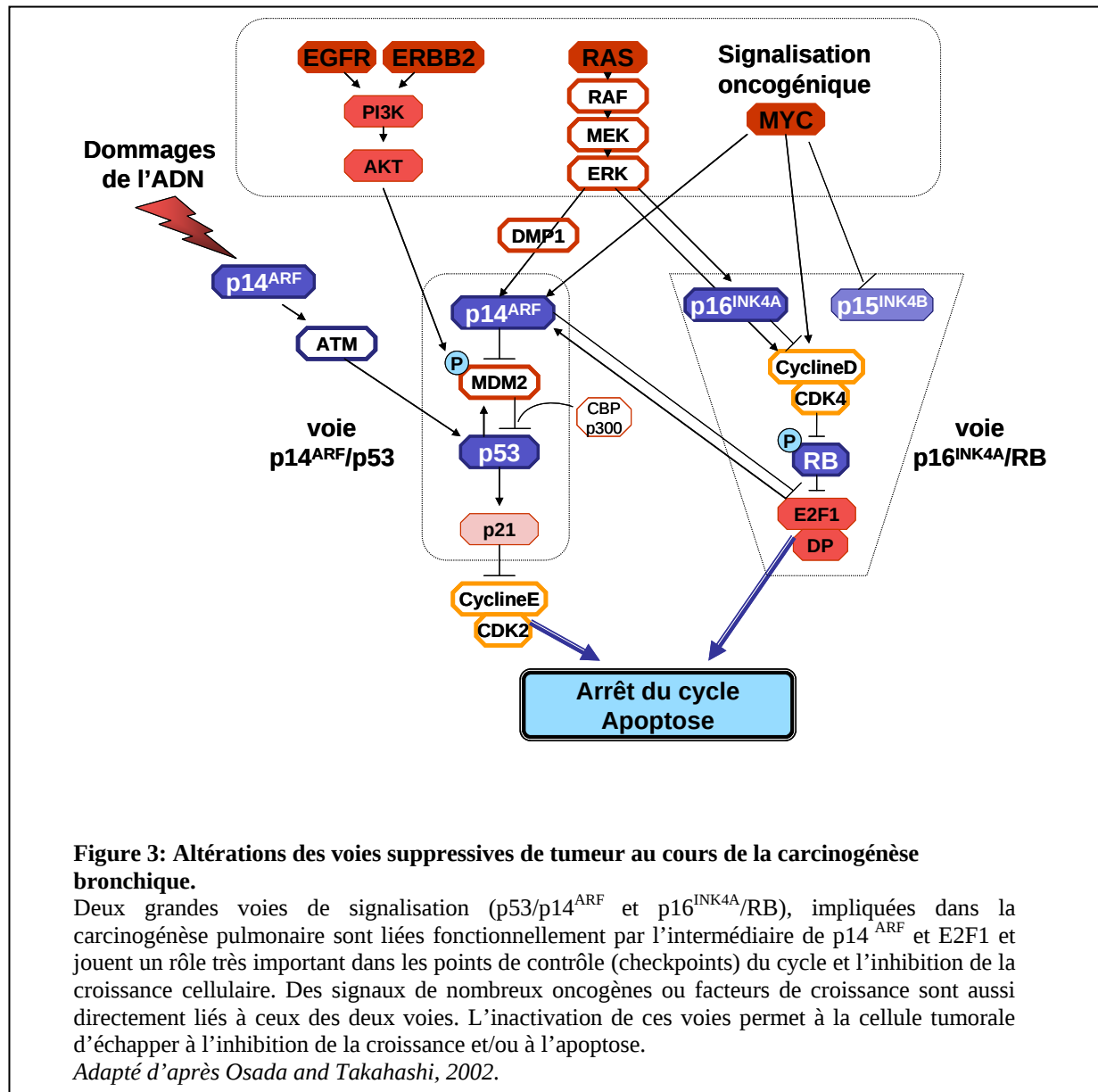


Figure 3: Altérations des voies suppressives de tumeur au cours de la carcinogénèse bronchique.

Deux grandes voies de signalisation ($p53/p14^{\text{ARF}}$ et $p16^{\text{INK4A}}/\text{RB}$), impliquées dans la carcinogénèse pulmonaire sont liées fonctionnellement par l'intermédiaire de $p14^{\text{ARF}}$ et E2F1 et jouent un rôle très important dans les points de contrôle (checkpoints) du cycle et l'inhibition de la croissance cellulaire. Des signaux de nombreux oncogènes ou facteurs de croissance sont aussi directement liés à ceux des deux voies. L'inactivation de ces voies permet à la cellule tumorale d'échapper à l'inhibition de la croissance et/ou à l'apoptose.

Adapté d'après Osada and Takahashi, 2002.

a) La voie de signalisation p53/p14^{ARF}

Le gène suppresseur de tumeur p53 est considéré comme l'un des gardiens du génome et joue un rôle important au niveau des points de contrôle (checkpoints) du cycle cellulaire. En réponse aux dommages de l'ADN induits par des carcinogènes, à l'hypoxie ou aux activations oncogéniques, p53 transactive l'expression de gènes cibles comme p21/WAF1, mdm2 (*hdm2 humain*), gadd45, bax et cycline G conduisant à un arrêt en G1 du cycle cellulaire, à la réparation de l'ADN et/ou à la mort cellulaire programmée par apoptose (Lavin and Gueven, 2006; Osada, et al., 2002; Sekido, et al., 1998). Situé sur la région chromosomique 17p13, p53 est le gène le plus fréquemment muté ou délété dans les cancers humains et de nombreux travaux ont démontré que les altérations du gène p53 sont des phénomènes précoces au cours de la carcinogénèse broncho-pulmonaire. L'inactivation de p53 est observée dans 75 – 100 % des CPC et dans 47 % des CBnPC dont 51% des carcinomes malpighiens, 54 % des carcinomes à grandes cellules et 39% des adénocarcinomes (Tammemagi, et al., 1999; Zochbauer-Muller, et al., 2002). Dans 60 à 80 % des cas, l'inactivation de p53 a lieu par perte d'hétérozygotie et mutations ponctuelles de l'allèle restant le plus souvent dans le domaine de liaison à l'ADN (Greenblatt, et al., 1994; Osada, et al., 2002; Sekido, et al., 2002).

La protéine p53 a une courte demi-vie et est très faiblement exprimée dans les cellules normales, mais elle est stabilisée et surexprimée dans les cellules subissant des dommages génotoxiques. Des mutations "non sens" de p53 provoquent l'augmentation de la demi-vie de sa protéine conduisant à un niveau très élevé de la protéine détecté par immunohistochimie (IHC) dans les cellules cancéreuses pulmonaires. L'expression anormale de p53, détectée par IHC, est rapportée dans 40 – 70 % des CPC et 40 – 60 % de CBnPC (Geradts, et al., 1999; Zochbauer-Muller, et al., 2002).

Des altérations affectant les partenaires de p53 peuvent aussi conduire à une inactivation de la voie p53 et sont observées dans les tumeurs bronchiques. Le gène suppresseur de tumeur p14^{ARF} identifié comme ARF (Alternative ReadinG Frame) est situé dans le même locus que p16^{INK4a} sur le chromosome 9p21. Induit par des signaux oncogénique (Myc, RAS et E2F1), p14^{ARF} inhibe l'activité ubiquitine E3 ligase de MDM2 (HDM2) en le séquestrant dans le noyau (Honda and Yasuda, 1999). La perte de p14^{ARF} a été décrite dans notre laboratoire par des techniques d'immunohistochimie, dans 25 % des adénocarcinomes et dans 30 – 40 % des carcinomes neuroendocrines de haut grade (Gazzeri, et al., 1998). MDM2 (HDM2) est un proto-oncogène, amplifié et surexprimé très fréquemment dans les cancers. En interagissant avec p53, MDM2 réduit son niveau d'expression et conduit p53 vers la voie de dégradation par le protéasome. Nous avons décrit la surexpression de MDM2 dans 30 % des cancers pulmonaires (Eymin, et al., 2002).

b) La voie de signalisation RB/p16^{INK4A} dans les tumeurs bronchiques

La voie de signalisation p16^{INK4A} /cycline D1/CDK4/RB est considérée comme une voie essentielle pour le contrôle de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire. Il a été démontré qu'au moins un de ces quatre gènes est muté ou fonctionnellement altéré dans les tumeurs humaines. Les deux protéines suppressives de tumeur affectées dans les cancers pulmonaires sont p16^{INK4A} (dans les CBnPC) et RB (dans les CPC).

Des altérations de RB sont détectées dans presque tous les CPC (>90 %). L'absence d'expression de RB attestée par son absence d'expression en immunohistochimie est majoritairement liée à la perte d'un allèle au niveau du locus 13q14 et aux altérations structurales de l'autre allèle comprenant des délétions, des mutations non-sens et/ou des anomalies de l'épissage (Gouyer, et al., 1998; Harbour, et al., 1988; Hensel, et al., 1990). A l'inverse, la perte d'expression de RB est beaucoup plus rare dans les CBnPC (15 – 30 %) avec une fréquence plus considérable dans les stades avancés. Dans ces tumeurs, la voie de signalisation de p16^{INK4A}–cycline D1-CDK4-RB est très souvent inactivée par mutation de p16^{INK4A} (50 % des CBnPC) (Brambilla, et al., 1999; Sekido, et al., 1998). Dans la majorité des CBnPC, RB reste inactivée sous sa forme hyperphosphorylée, résultat de la perte de la protéine p16^{INK4A}. Enfin, des altérations oncogéniques et amplifications géniques portant sur la cycline D1, la kinase CDK4 ou la cycline E et conduisant à leur surexpression peuvent maintenir RB dans un état hyperphosphorylé inactif, favorisant la prolifération cellulaire (Brambilla, et al., 1999; Fukuse, et al., 2000; Sekido, et al., 2002).

A côté des anomalies touchant les voies RB/p53, la très haute fréquence de la perte allélique au niveau du bras court du chromosome 3 (3p) (90 % des CPC et 70 % des CBnPC) a permis d'identifier plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs, candidats dans cette région du génome, parmi lesquels *FHIT* (Fragil Histidin Trial), *RARβ* (Retinoid Acid Receptor β), *RASSF1* (Ras Association domain Family 1A), *Robbo1/DUTT1* (Roundabout 1/Deleted in U Twenty Twenty1), *SEMA 3F* et *SEMA 3B* (Semaphorin).

L'importance des voies de signalisation p53/RB et de leur inactivation au cours de la carcinogénèse bronchique nous a conduit depuis plusieurs années à étudier au sein du laboratoire les protéines situées à l'interface de ces voies et à analyser leur rôle potentiel au cours du développement tumoral. Dans ce contexte, je me suis intéressée au cours de mon travail de thèse à l'une de ces protéines d'interface - le facteur de transcription E2F1. C'est pourquoi dans une deuxième partie de mon introduction je vous présenterai cette protéine, ses fonctions biologiques, ainsi que la replacerai dans le contexte de la famille des facteurs de transcription E2F.

II LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION E2F1 - UNE PROTEINE AMBIVALENTE

II.1 La famille E2F

II.1.1 La voie E2F/RB – une voie conservée au cours de l'évolution

Les facteurs de transcription E2F sont les effecteurs directs de la voie des protéines de la famille RB. Depuis longtemps, ils sont connus pour être des régulateurs très importants de la transition des cellules en phase S du cycle cellulaire. De façon importante, des études plus récentes ont démontré que leurs fonctions s'étendaient au delà du contrôle de la transition G1/S. Actuellement, les facteurs de transcription de la famille E2F sont impliqués dans des activités biologiques diverses, en fonction du contexte cellulaire et tissulaire et apparaissent tout autant capable d'induire que de réprimer la transcription, de stimuler ou d'inhiber l'apoptose, d'induire la différenciation ou la sénescence.

Des homologues des protéines E2Fs et RB ont été décrits chez les insectes (*Drosophila*) (Dynlacht, et al., 1994; Ohtani and Nevins, 1994; Stevaux, et al., 2002), les vers (Ceol and Horvitz, 2001; Page, et al., 2001), les grenouilles (Suzuki and Hemmati-Brivanlou, 2000) et chez différents espèces de plantes (Albani, et al., 2000; Ramirez-Parra, et al., 1999; Rossignol, et al., 2002). Toutes ces études montrent que la voie E2F/RB reste très conservée au cours de l'évolution biologique, prouvant l'importance de cette voie dans la signalisation de divers processus cellulaires. L'organisation de la voie de signalisation E2F/RB est plus simple chez les insectes. Par exemple, la drosophile possède seulement deux gènes pour E2F (dE2F1 et dE2F2), un gène DP (dDP) et deux gènes homologues RB (RBF1 et RBF2). La simplicité d'organisation et de fonctionnement génétiques chez les organismes eucaryotes a permis de faciliter la compréhension des fonctions biologiques exercées par les facteurs E2F et de mettre en évidence de nouveaux rôles pour ces protéines qui ont ensuite été vérifiés dans les cellules de mammifères.

II.1.2 Les membres de la famille E2F chez l'Homme

Le premier membre de la famille des facteurs de transcription E2F est notre facteur d'intérêt E2F1. Il a été découvert en 1986 (Kovesdi, et al., 1986; La Thangue and Rigby, 1987; Yee, et al., 1987) et a été isolé par trois groupes indépendants sur la base de sa capacité à se lier au promoteur du gène adénoviral E2 et à l'activer. Le gène *e2f1* est situé sur le bras long du chromosome 20 (20q11.2) et contient 7 exons. Il code pour une protéine nucléaire de 437 acide aminés dont le poids moléculaire est de 60kD (Neuman, et al., 1996). La protéine E2F1 interagit directement avec RB (Helin, et al., 1992; Kaelin, et al., 1992; Shan, et al., 1992; Weinberg, 1995).

Depuis la découverte de E2F1, la famille des facteurs E2F s'est élargie et actuellement elle comprend huit membres (E2F1 – E2F8) chez l'homme (**Figure 4**). Les six premiers membres de la famille sont les mieux décrits et étudiés aujourd'hui. Ils possèdent des domaines communs et fortement conservés au cours de l'évolution dont un domaine N-terminal de liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation avec les membres de la famille " Differentiation regulated transcription factors Protein" (DP), suivis d'une région appelée "marked box", impliquée dans la dimérisation et les interactions entre les protéines E2F1-5 et leurs différents partenaires. Dans la partie C-terminale de ces protéines se trouve le domaine de transactivation comprenant la région de liaison aux protéines de la famille RB. Les domaines de liaison à l'ADN et de dimérisation sont bien conservés dans la structure de la protéine E2F6, mais elle ne possède pas de domaine de transactivation et ne fait pas de complexe avec les protéines RB. Cette protéine exerce son activité biologique en interagissant avec des membres du complexe polycomb (PcG) (DeGregori and Johnson, 2006; Trimarchi, et al., 2001; Tsantoulis and Gorgoulis, 2005). D'autres différences structurales consistent en la présence d'un domaine nécessaire à la localisation nucléaire des protéines E2F1-3, nommé NLS (Nuclear Localisation Signal) et d'un domaine de liaison à la Cycline A, tous deux situés dans la partie N-terminale des protéines.

Le groupe de Leone a identifié deux protéines E2F3, nommées E2F3a et E2F3b, résultat d'un épissage alternatif (Leone, et al., 2000). La protéine courte E2F3b ne possède pas de domaine interagissant avec la Cycline A et se distingue par une activité biologique différente de E2F3a. Récemment, le rôle redondant joué par ces deux formes dans le contrôle de la prolifération cellulaire a été démontré (Chong, et al., 2009). L'absence de NLS dans les protéines E2F4 et E2F5 est compensée par l'existence d'un autre domaine nommé NES (Nuclear Export Signal). Ce domaine assure l'hétérodimérisation des deux protéines avec les protéines DP et leur translocation dans le noyau (Tsantoulis and Gorgoulis, 2005; Verona, et al., 1997). La présence de tels signaux de localisation assure une translocation continue noyau-cytoplasme permettant de moduler l'activité des protéines E2F4/E2F5 d'une manière dépendante du cycle cellulaire.

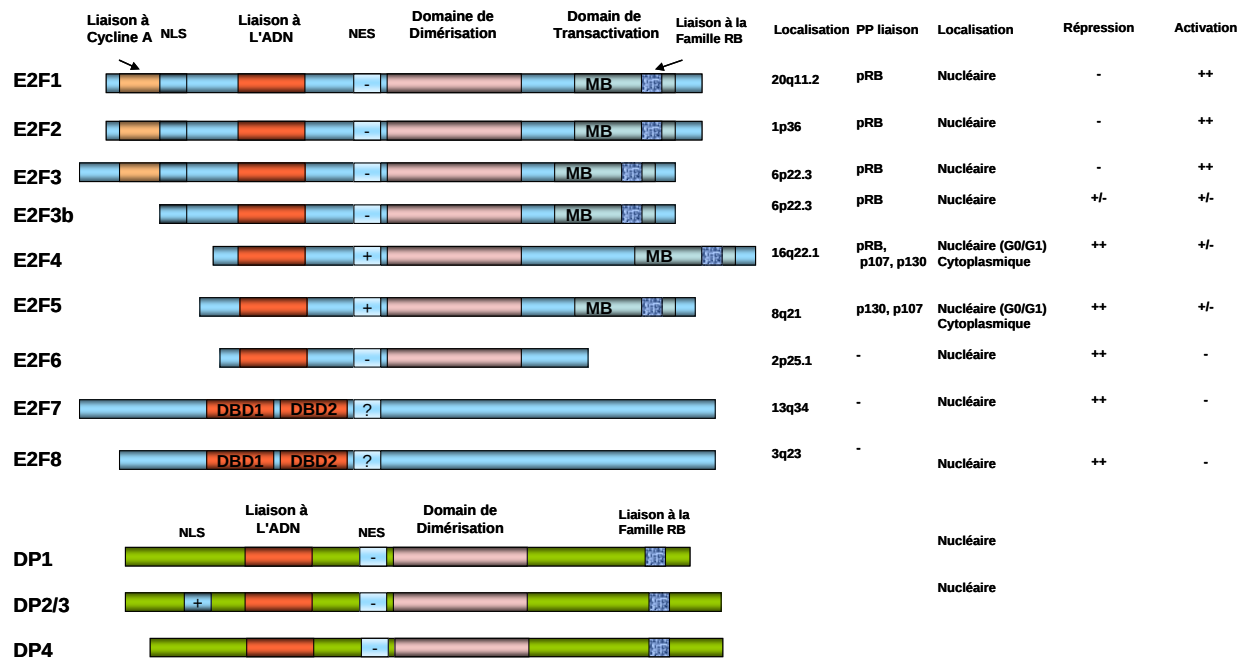


Figure 4: Caractéristiques structurales des protéines de la famille E2F et de leurs partenaires les protéines DP.

Tous les E2Fs contiennent des domaines homologues de **liaison à l'ADN** (en rouge). Les « activateurs » E2F1-3 possèdent un domaine **NLS (Nuclear Localization Signal)** (en bleu), un domaine de **transactivation** (en gris) comprenant des séquences nommées « **Marked Box** » (MB), une région de liaison avec les protéines de la famille **RB** (en bleu foncé). Les « répresseurs » E2F4 et E2F5 à l'inverse présentent un domaine **NES (Nuclear Export Signal)** (en bleu clair). Les protéines E2F6, 7 et 8 ne possèdent pas de domaine de transactivation, ni de région liant RB. C'est pourquoi elles exercent leur activité répressive d'une manière indépendante de RB probablement comme homodimères.

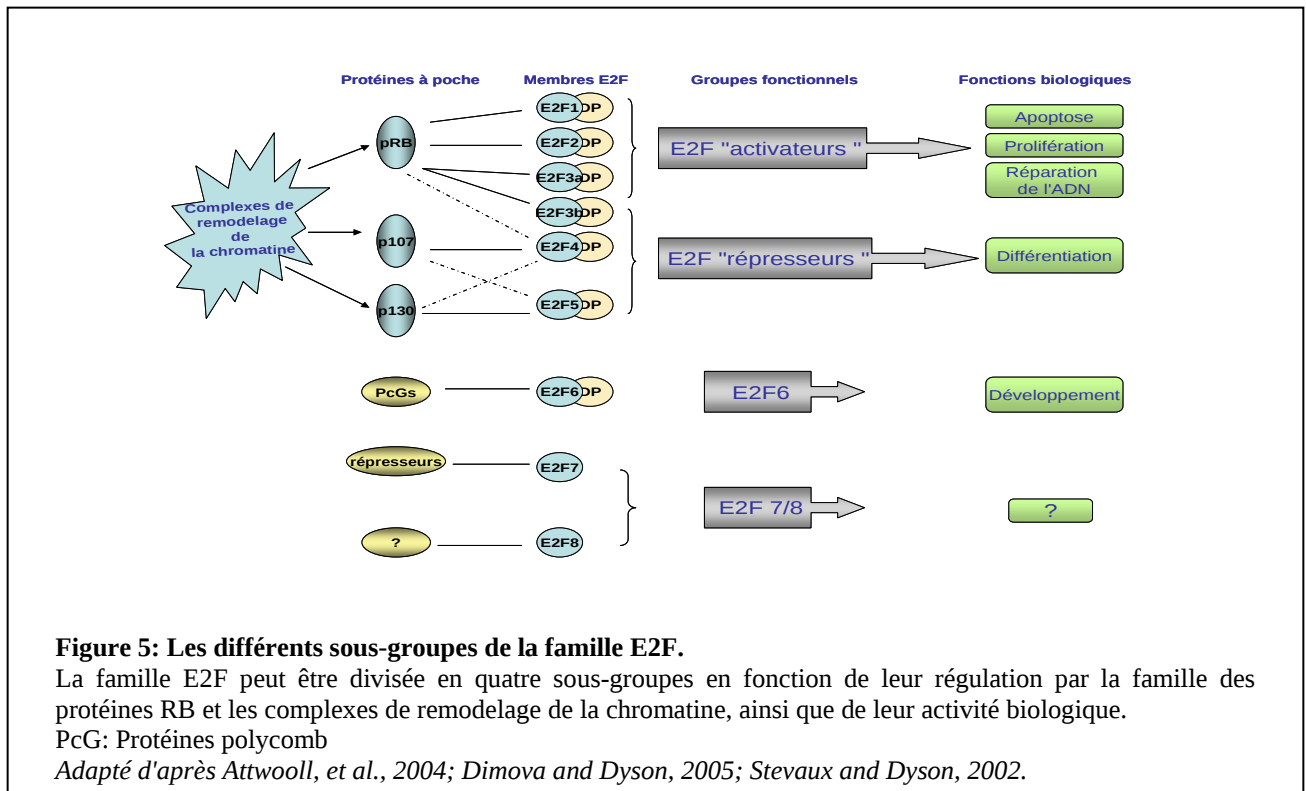
Adapté d'après DeGregori and Johnson, 2006; Dimova and Dyson, 2005; Iaquinta and Lees, 2007; McClellan and Slack, 2007; Tsantoulis and Gorgoulis, 2005.

Les protéines E2F1-6 créent des dimères avec l'un des membres DP (DP1, DP2/3, DP4) en formant des complexes transcriptionnels fonctionnels qui lient l'ADN et les protéines RB avec une très haute affinité. La fonction de chaque hétérodimère E2F-DP est déterminée par le membre E2F qui participe à ce complexe. Les protéines DP possèdent une homologie structurale significative avec les protéines E2F, en raison de leur domaine de liaison à l'ADN et de leur domaine de dimérisation. Le rôle des différentes protéines DP dans la modulation de l'activité des E2Fs n'est pas encore complètement compris. Cependant, la présence d'un domaine NLS (Nuclear Localization Signal) sur la protéine DP2 et son absence sur DP1 pourrait contribuer à la localisation subcellulaire des E2Fs dans le noyau.

Les protéines E2F7 et E2F8 sont les derniers membres décrits de la famille E2F. Elles possèdent une structure particulière avec un deuxième domaine de liaison à l'ADN (DBD) à la place du domaine de dimérisation. E2F7 et E2F8 sont capables de se lier sur l'ADN en absence d'interaction avec les protéines DP et leur deuxième domaine DBD permettrait l'affinité des deux protéines sur l'ADN.

II.1.3 Activités régulatrices de la transcription des membres de la famille E2F

Les membres de la famille E2F sont divisés en quatre groupes fonctionnels basés sur leurs propriétés transcriptionnelles, leur mode de distribution au cours du cycle cellulaire, leurs caractéristiques structurales et leur affinité d'interaction avec les membres de la famille des protéines RB (Figure 5).



En général, les protéines E2F1, E2F2 et E2F3a sont considérées comme des membres « activateurs » sur la base de leur capacité potentielle à activer la transcription de gènes cibles et à s'accumuler à la fin de la phase G1 et au début de la phase S d'une manière dépendante du cycle cellulaire. Ces protéines interagissent exclusivement avec RB et sont périodiquement exprimées au cours du cycle. Le deuxième groupe, dénommé « membres répresseurs », comprend les protéines E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 et E2F8. En raison des caractéristiques structurales de chaque membre de cette famille plusieurs types de complexes répresseurs pourraient exister: (1) des complexes E2F/DP interagissant avec les membres de la famille RB, (2) des complexes E2F/DP agissant d'une manière indépendante de la famille RB, (3) des complexes E2F qui répriment la transcription indépendamment des protéines DP et/ou RB (Dimova and Dyson, 2005). Dans les cellules quiescentes ou au début de la phase G1, E2F3b, E2F4 et E2F5 se lient sur les promoteurs de leurs gènes cibles et recrutent différentes

protéines de la famille RB entraînant une répression transcriptionnelle de ces gènes. Les membres de ce groupe sont exprimés de façon constante au cours du cycle. L'inactivation de E2F4 et E2F5 chez la souris montre un rôle important de ces facteurs au cours de la différenciation (Humbert, et al., 2000; Lindeman, et al., 1998). Les protéines E2F6, E2F7 et E2F8 agissent aussi comme des répresseurs transcriptionnels mais elles répriment l'activité du promoteur de leurs gènes cibles par un mécanisme indépendant de la famille RB. E2F6 participe à la répression de gènes dont le niveau d'expression diminue à la fin de phase S du cycle. Son haut niveau d'expression, détecté dans les cellules quiescentes, peut empêcher la réentrée des cellules en division et son inactivation chez la souris montre son rôle potentiel dans certaines étapes du développement précoce (Storre, et al., 2002). Cette protéine exerce sa fonction en association avec les répresseurs transcriptionnels de la famille Polycomb suggérant que E2F6 pourrait être impliqué dans la régulation de gènes *Hox* (Gould, 1997; Ogawa, et al., 2002; Trimarchi, et al., 2001). De plus, plusieurs études suggèrent un rôle de E2F6 dans le contrôle d'expression de gènes suppresseurs de tumeur régulant la structure chromatinienne, parmi lesquels BRCA1 (Oberley, et al., 2003). Les protéines E2F7 et E2F8 sont encore mal connues mais elles exercent probablement leur activité répressive d'une manière analogue à celle de E2F6 (DeGregori and Johnson, 2006; Iaquinta and Lees, 2007). De part leur effet répresseur sur des gènes cibles du cycle cellulaire, elles seraient impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire (Christensen, et al., 2005; Logan, et al., 2005).

Malgré ces deux sous-groupes, il semble aujourd'hui que la classification des membres de la famille E2F en « activateurs » ou « répresseurs » de la transcription soit beaucoup trop simpliste et ne reflète pas les dynamiques du contrôle transcriptionnel dépendant des E2Fs. Ainsi, des données issues des analyses « microarray » démontrent que la surexpression de membres activateurs comme E2F1 provoque la répression d'un certain nombre de gènes cibles (Muller, et al., 2001; Young, et al., 2003). En outre, E2F1 s'associe avec la protéine RB au sein d'un complexe répresseur de la transcription au niveau des promoteurs de divers gènes cibles en fin de phase G1 et S (Iwanaga, et al., 2006). Dans certains cas, E2F1 agit aussi comme répresseur transcriptionnel par un mécanisme direct et indépendant de RB (Koziczak, et al., 2000; Koziczak, et al., 2001). D'autre part, la surexpression des protéines E2F4 et E2F5 peut conduire à leur interaction avec certains co-activateurs transcriptionnels. Dans ce contexte, ces protéines connues comme répresseurs transcriptionnels deviennent capables de stimuler l'activité des promoteurs de gènes cibles des E2Fs (Balciunaite, et al., 2005; Wells, et al., 2003). Enfin, des modèles d'études utilisant différents mutants suggèrent aujourd'hui que l'une des fonctions des protéines « activatrices » E2F1-3a pourrait être l'occupation de sites au niveau des promoteurs afin d'empêcher la fixation des E2Fs répresseurs (Rowland and Bernards, 2006) (**Figure 6**).

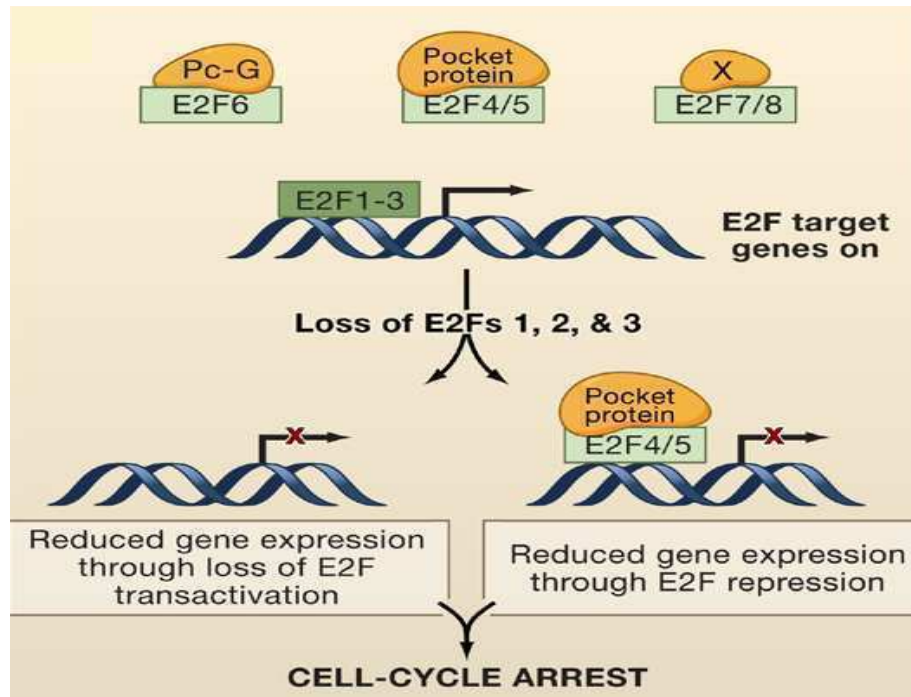


Figure 6: Mécanismes d'activation versus répression de la transcription dépendante des facteurs E2Fs.

Il a été montré que la perte des protéines E2F1-3 entraînait une diminution de l'expression de leurs gènes cibles. Deux mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer cet effet : (1) par perte directe d'une activité transactivatrice ; (2) par occupation des promoteurs ciblés par les membres répresseurs (E2F4 – E2F8) laissant suggérer que les membres activateurs ont pour fonction d'empêcher la répression de la transcription de leurs gènes cibles par les complexes répresseurs contenant les membres E2F4, 5, 6, 7 ou 8.

Pc-G : protéines Polycomb

D'après Rowland and Bernards, 2006.

D'une manière générale, il est donc probable que l'effet activateur ou répresseur des protéines E2Fs dépend du type de promoteur ciblé et du contexte cellulaire et/ou tissulaire et qu'une telle régulation n'est pas uniquement mise en jeu au cours de la progression dans le cycle cellulaire. Ainsi, la capacité transactivatrice des membres activateurs pourrait être nécessaire à la réentrée dans le cycle des cellules quiescentes mais non essentielle pour le cycle suivant, ou impliquée dans d'autres processus biologiques tels que l'induction de l'apoptose.

II.2 Activités biologiques des E2Fs et régulation de leur fonction

Les membres de la famille E2F ont d'abord été reconnus pour leur rôle important dans la progression du cycle cellulaire. De très nombreux gènes potentiellement régulés par E2F ont été par la suite découverts grâce à l'utilisation de puces à ADN (Iwanaga, et al., 2006; Muller, et al., 2001; Ren, et al., 2002) et de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (Lavrrar and Farnham, 2004; Takahashi, et al., 2000). Ainsi, la complexité des fonctions biologiques des facteurs E2F est attestée par le nombre grandissant de gènes cibles identifiés (**Tableau 3**). De plus, s'il existe des redondances fonctionnelles des activités E2F, des spécificités de fonction ont été nettement mises en évidence par les phénotypes variés résultant de l'inactivation chez la souris de chaque facteur ou d'un sous-groupe de facteurs (DeGregori and Johnson, 2006). Dans le chapitre suivant, les données actuelles concernant les fonctions biologiques de E2F1 seront plus particulièrement abordées.

Cycle cellulaire			
Transition G1/S	Synthèse Nucléotidique	Réplication de l'ADN	Transition G2/M
Cycline E	Thymidine kinase	DNA polymérase α	Cdc 2
B-myb	Thymidilate synthase	Réplication protéine A1	Cycline A
E2F1, 2, 3a	Dihydrofolate réductase	Cdc6, orc 1	Ran BP1
Cdc25a			
Points de contrôle		Réparation de l'ADN	
p53		BRCA1	
ATM		Rad 51	
CHK1		Mad 2	
Apoptose			
p53, p73	} Induction de l'expression	} Répression de la transcription	
Apaf-1			
Caspases 8, 7, 3			
p14ARF			
Noxa, PUMA			

Tableau 3: Exemples de gènes cibles de E2F1 l'impliquant dans des processus cellulaires variés. En circonstances normales, E2F1 régule l'expression des gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire dont les gènes *cycline E*, *thymidilate synthetase (TS)* et *Cdc6*. En réponse aux dommages de l'ADN, E2F1 est phosphorylé par les kinases ATM/ATR et CHK2 et ainsi stabilisé. Les modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation) de la protéine E2F1 en réponse aux dommages de l'ADN permettent l'activation de différents gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose (Apaf-1, p14^{ARF}). La spécificité d'interaction de E2F1 avec ses différents gènes cibles pourrait dépendre du type tissulaire et/ou du type de voie de signalisation engagés (Attwooll, et al., 2004; Dimova and Dyson, 2005).

II.2.1 E2F1 et contrôle du cycle cellulaire

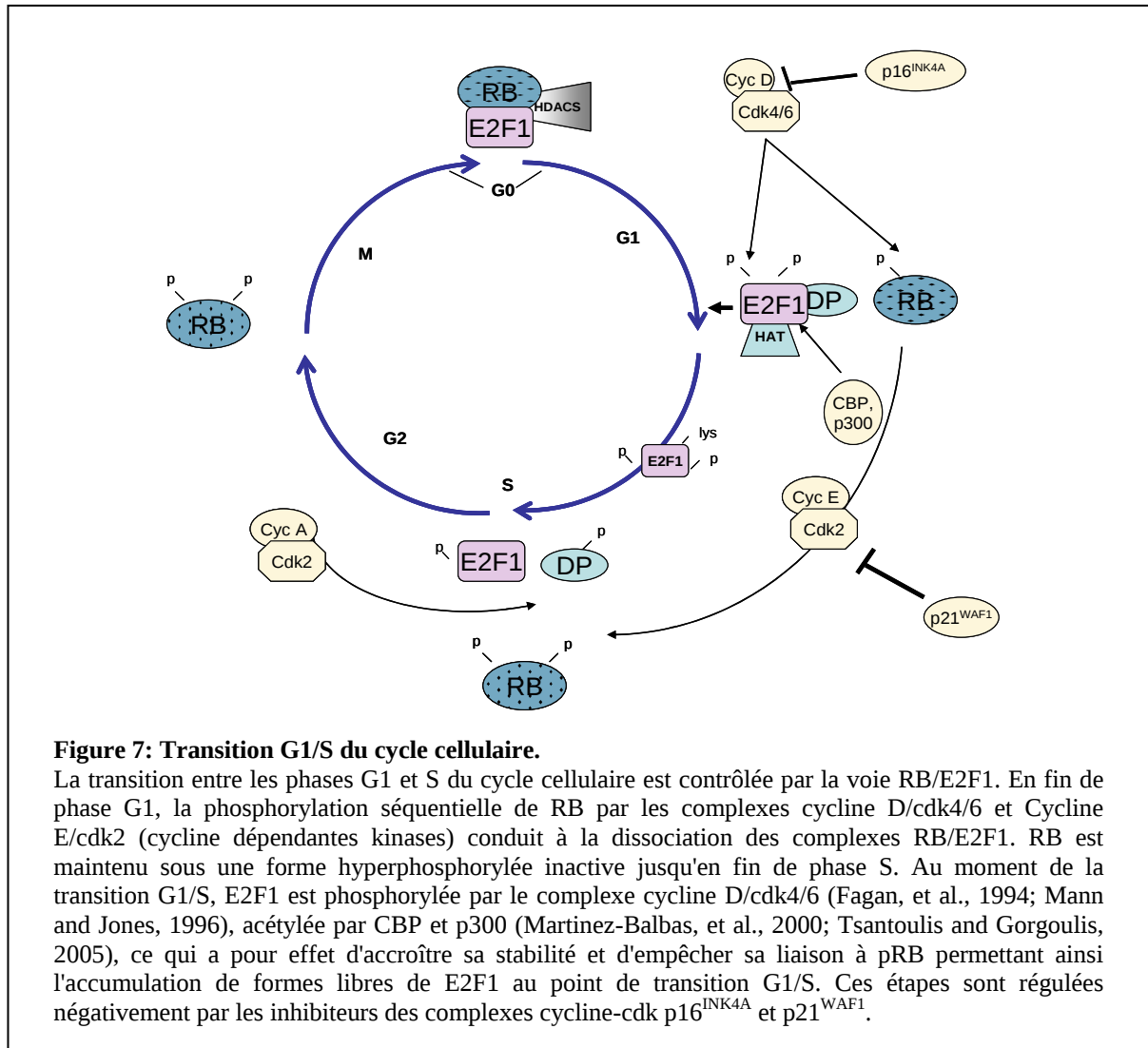
II.2.1.1 E2F1 – une protéine clé du passage en phase S

La capacité de E2F1 à réguler la transition G1/S et l'entrée en phase S du cycle cellulaire a été démontrée par des études réalisées "*in vivo*" et "*in vitro*" en condition de surexpression et/ou de perte de fonction, grâce aux modèles animaux, et aussi par l'analyse après immunoprécipitation de la chromatine des différents complexes E2Fs formés au niveau des promoteurs de ses gènes cibles. Chez la Drosophile, la surexpression de E2F1 induit une entrée ectopique des cellules en phase S (Asano, et al., 1996; Du, et al., 1996). Inversement, chez les drosophiles mutantes pour *e2f1*, l'absence d'expression de la protéine E2F1 endogène perturbe la transition des cellules en phase S et retarde la croissance cellulaire (Brook, et al., 1996; Duronio, et al., 1995; Frolov, et al., 2001). De la même façon, la neutralisation de dE2F1 par ARN interférence inhibe la réplication de l'ADN et provoque l'arrêt des cellules en phase G1 (Dimova, et al., 2003; Frolov, et al., 2003). Chez les mammifères, il a été montré que la surexpression de E2F1 dans des cellules quiescentes conduit à l'entrée en phase S (Kong, et al., 2007). De plus, la surexpression de E2F1 entraîne une entrée prématurée en phase S de fibroblastes murins immortalisés en l'absence de sérum (DeGregori, 2006; Johnson, 1995; Lukas, et al., 1996). Cependant, la surexpression de E2F1 ne conduit pas toujours à l'entrée des cellules en phase S. Dans certains cas, E2F1 pourrait aussi inhiber la réplication de l'ADN en réponse au traitement par les gamma radiations (DeGregori, et al., 1995; He, et al., 2000). De plus, il a été démontré dans des fibroblastes primaires humains que la surexpression de E2F1 pouvait induire la sénescence des cellules (Dimri, et al., 2000) ou l'apoptose (DeGregori, 2002; Trimarchi and Lees, 2002). Ces résultats suggèrent que la capacité de E2F1 à induire la transition des cellules en phase S pourrait dépendre du contexte cellulaire (cellules normales versus immortalisées par exemple).

A côté de son rôle au cours du passage en phase S, E2F1 participe aussi au contrôle de la transition G2/M via l'induction d'un certain nombre de gènes impliqués dans le processus mitotique. De façon intéressante, l'activité transcriptionnelle de E2F1 diminue au cours de la phase S et cette inhibition permet le passage en phase G2 du cycle cellulaire (Krek, et al., 1995).

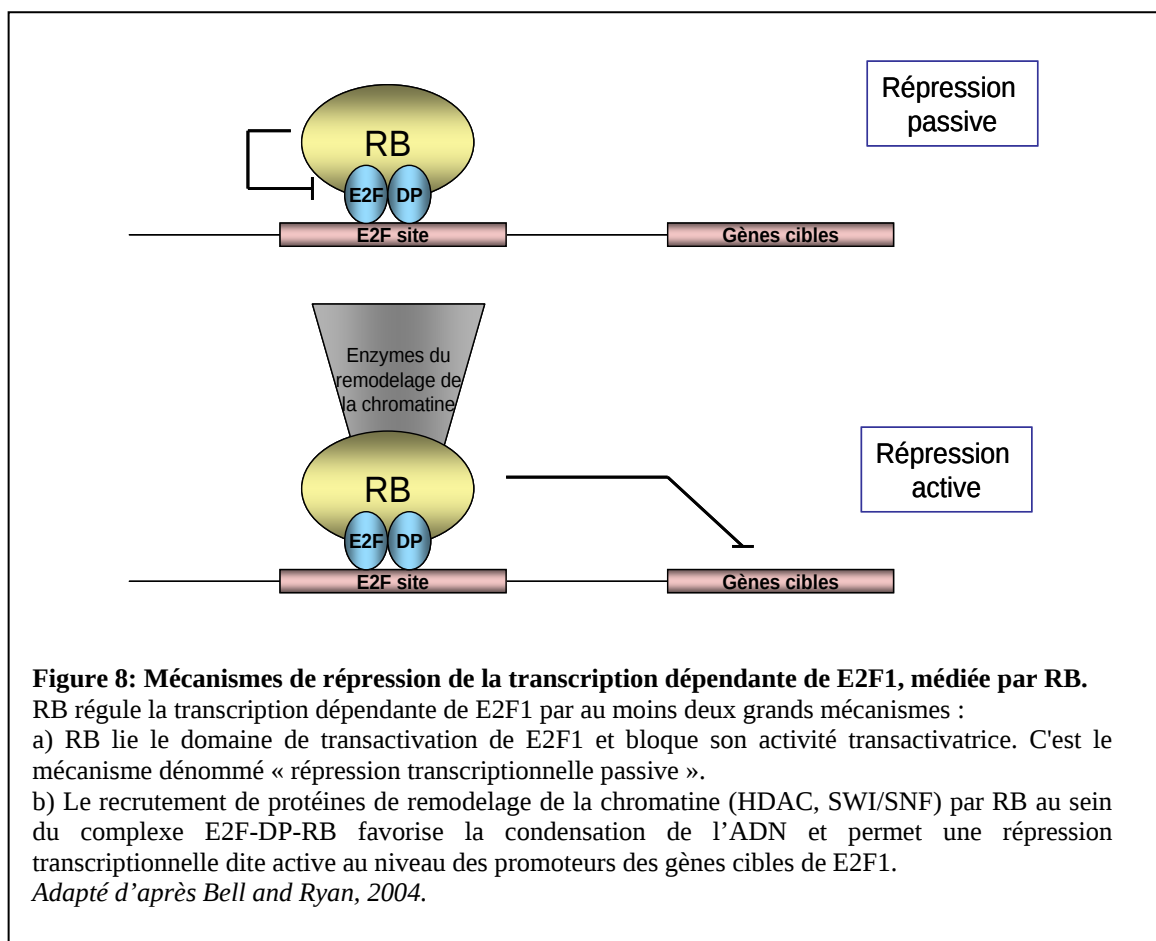
II.2.1.2 Mécanismes moléculaires de contrôle de l'activité de E2F1 au cours du cycle cellulaire

Sur le plan moléculaire, l'activité de E2F1 au cours du cycle cellulaire notamment est finement régulée par son interaction avec différents partenaires protéiques, mais aussi par des modifications post-traductionnelles (**Figure 7**).



a) Répression de la transcription dépendante de E2F1 par la protéine RB

L'interaction de E2F1 avec la protéine RB contrôle étroitement son activité au cours du cycle cellulaire (**Figure 7**). Durant les phases G0 et G1, RB maintient E2F1 sous une forme transcriptionnelle inactive par deux mécanismes différents: (i) un mécanisme dit de "répression passive" et (ii) un mécanisme dit de "répression active" (**Figure 8**). A l'heure actuelle, il est impossible de préciser quel mécanisme est préférentiellement utilisé par les cellules dans le contrôle du cycle cellulaire normal. Dans le premier cas, l'interaction de RB avec les hétérodimères E2F-DP masque les sites de recrutement des complexes de pré-initiation de la transcription, situés dans le domaine C-terminal de E2F1, par des encombrements allostériques (Flemington, et al., 1993; Helin, et al., 1993; Ross, et al., 1999). Ce processus prévient le recrutement par l'hétérodimère E2F-DP de facteurs de transcription comme TFIID, aussi bien que des co-activateurs transcriptionnels comme p300/CBP, GCN5, TRAPP, Tip60 et ACTR/AIB1 (Ross, et al., 1999; Taubert, et al., 2004; Trouche, et al., 1996).



L'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN est régulée au moins en partie par des modifications épigénétiques telles que l'acétylation ou la méthylation des extrémités N-terminales des histones. Ces protéines s'associent sous forme d'octamère pour construire la charpente de l'unité chromatinienne, le nucléosome, et leurs modifications post-traductionnelles régulent le degré de compaction de la chromatine. Ainsi, d'une façon générale, une chromatine hypoacétylée est inactive transcriptionnellement alors qu'une chromatine acétylée est dite permissive à la transcription. Dans le second cas, une modulation du niveau d'acétylation des histones médiée par RB au niveau des gènes cibles de E2F1 est impliquée dans la répression transcriptionnelle. Ainsi, RB convertit l'activité de l'hétérodimère E2F-DP d'activateur en répresseur actif de la transcription via le recrutement sur les promoteurs des gènes cibles de E2F1 d'un grand nombre de facteurs de modification et de remodelage de la chromatine (Frolov and Dyson, 2004; Zhu, 2005). La spécificité du co-répresseur recruté par le complexe E2F-RB dépend du gène cible et du contexte cellulaire (cellule quiescente ou différenciée, par exemple) (Balciunaite, et al., 2005; Chen, et al., 2002; Dahiya, et al., 2001).

L'acétylation des histones H3 et H4 par les HATs (Histone Acetyl Transferase) est un processus rendu rapidement réversible par les enzymes histone déacétylases (HDAC). RB et ses homologues p107 et p130 interagissent avec les HDACs 1, 2 et 3 et les recrutent sur les promoteurs des gènes cibles pour en induire leur répression (Brehm, et al., 1998; Ferreira, et al., 1998; Luo, et al., 1998; Magnaghi-Jaulin, et al., 1998; Zhang, et al., 2000). Les protéines HDACs s'associent soit directement à RB grâce à leur motif consensus de liaison LXCXE, soit indirectement par l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles que RBP1 (Lai, et al., 1999).

Les modifications covalentes par méthylation des histones H3 et H4 coïncident, en fonction du résidu méthylé, soit à une activation de la transcription, soit au contraire à l'induction d'une hétérochromatine inaccessible à la machinerie transcriptionnelle. Des travaux récents suggèrent aussi un rôle de la méthylation des histones dans la répression de certains gènes de E2F1 médiée par les protéines RB, impliquant des méthyltransférases de classes différentes telles que SUV39H 1 (Nielsen, et al., 2001) et PMRT 5 (Fabrizio, et al., 2002).

La structure de la fibre chromatinienne peut être également modifiée par des complexes de remodelage de la chromatine, qui utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour diminuer la force d'interaction entre l'ADN et les histones (Narlikar, et al., 2002). BRG1 et hBRGM, homologue humains du complexe de remodelage SWI/SNF chez la levure ont été impliqués dans l'arrêt de la croissance cellulaire (Dunaief, et al., 1994) et dans la répression de la transcription de gènes cibles de E2F1 (Trouche, et al., 1997) médiée par RB. Ces données sont néanmoins remises en cause par des travaux de Kang et son équipe (Kang, et al., 2004) montrant qu'une interaction directe RB/BRG1 n'est pas nécessaire à l'arrêt de croissance et à la répression de la transcription de gènes cibles de E2F.

De manière intéressante, E2F1 peut aussi activement réprimer la transcription de certains gènes cibles de manière indépendante de RB (Koziczak, et al., 2000; Koziczak, et al., 2001; Liu, et al., 2004; Muller, et al., 2001). Cette répression transcriptionnelle nécessite une synthèse protéique *de novo*, plaçant en faveur de l'implication d'autres répresseurs transcriptionnels dans cette inhibition.

b) Activation de la transcription dépendante de E2F

Au moment de la transition G1/S du cycle cellulaire ou de la réentrée en cycle de cellules quiescentes, le complexe E2F/RB est dissocié en réponse à la phosphorylation séquentielle RB par les complexes cycline D/CDK 4/6 et cycline E/CDK 2 (**Figure 7**). Il existe alors une accumulation de molécules E2Fs "libres" qui corrèle avec une activation de la transcription dépendante de E2F.

A ce stade, la protéine E2F1 est aussi phosphorylée par le complexe cycline D/CDK 4/6 sur les sérines en position 332 et 337 (Fagan, et al., 1994; Mann and Jones, 1996). Ces phosphorylations augmentent sa stabilité et empêchent sa liaison à RB. E2F1, par une boucle de rétrocontrôle positive, est alors capable d'induire sa propre expression, ce qui représente un niveau supplémentaire de régulation de son activité au cours de la progression dans le cycle cellulaire.

Afin de former des complexes activateurs de la transcription, E2F1 recrute sous sa forme libre, non complexée à RB, différentes protéines dotées d'une activité histone acétyl-transférase (HATs), dont les protéines CBP, p300 et P/CAF qui induisent une hyperacétylation des histones H3 et H4 au niveau des promoteurs des gènes cibles de E2F1 et corrélerent avec l'activation de la transcription médiée par E2F1 (Martinez-Balbas, et al., 2000; Trouche and Kouzarides, 1996). Plus récemment, une interaction de E2F1 avec Tip 60, une HAT de la classe MYST, différente de CBP, a été décrite dans un modèle de surexpression. L'expression ectopique de E2F1 induit, dans ce système, le recrutement d'un complexe comprenant Tip 60 et quatre autres partenaires (TRRAP, p400, Tip 48 et Tip 49) au niveau de promoteurs régulés par E2F. De façon intéressante, l'acétylation de E2F1 par p300/CBP (Marzio, et al., 2000; Morris, et al., 2000; Trouche and Kouzarides, 1996) ou Tip60 (Taubert, et al., 2004) a été décrite comme stimulant son activité transactivatrice. Le rôle de cette acétylation dans le contexte du cycle cellulaire reste à démontrer.

Enfin, d'autres types de protéines, telles que SP1, un facteur de transcription induit par les signaux mitogènes (Karlseder, et al., 1996; Lin, et al., 1996), le facteur de transcription GABP gamma 1 (Hauck, et al., 2002) ou des facteurs de croissance (Black and Azizkhan-Clifford, 1999) interagissent spécifiquement avec E2F1 et régulent la transcription au niveau de promoteurs qui ne comportent pas les élément consensus classiques de E2F.

c) Inactivation de E2F1

En fin de phase S, le complexe cycline A/CDK 2 interagit avec E2F1, via son domaine de liaison à la cycline A (Adams, et al., 1996; Dynlacht, et al., 1997; Peeper, et al., 1995; Xu, et al., 1994). Le complexe cycline A/CDK2 induit parallèlement la phosphorylation du cofacteur DP, induisant la dissociation de l'hétérodimère E2F1/DP et la phosphorylation de E2F1 lui-même sur un résidu serine en position 375. Cette phosphorylation diminue ainsi la capacité de liaison de E2F1 à l'ADN (Mundle and Saberwal, 2003). Des données expérimentales avec un mutant de E2F1 incapable d'interagir avec le complexe cycline A/CDK 2 suggèrent que l'inhibition de l'activité E2F1 est importante pour l'entrée en phase G2/M (Krek, et al., 1995).

La voie de dégradation des protéines par le protéasome contrôle le turn-over de nombreuses protéines du cycle cellulaire (Hershko and Ciechanover, 1998). La protéolyse médiée par la voie du protéasome implique deux étapes: une étape de polyubiquitination des substrats suivie par la dégradation des protéines ubiquitinylées par le complexe du protéasome 26S (Hochstrasser, 1996). Le niveau d'expression de E2F1 est également contrôlé en seconde partie de phase S et en phase G2 du cycle cellulaire par sa dégradation par la voie du protéasome. Dans ce contexte, l'interaction directe de RB dans la région C-terminale de E2F1 le protège efficacement de la dégradation (Campanero and Flemington, 1997) et allonge de plus de deux fois la demi-vie du facteur. L'induction de l'expression de p14^{ARF} (ou de son homologue murin p19^{ARF}) ou de MDM2 entraîne en retour l'induction de la dégradation de E2F1 par le protéasome (Lin, et al., 2001; Mundle and Saberwal, 2003). A l'inverse, des modifications post-traductionnelles à type de phosphorylation ou d'acétylation contribuent également à induire la stabilité et/ou l'accumulation de E2F1 "libre" dans la cellule par diminution de sa dégradation (Loughran and La Thangue, 2000).

II.2.2 E2F1 et réponse aux dommages de l'ADN

De nombreux travaux ont mis en évidence l'existence d'un lien étroit entre la voie E2F/RB et les voies de signalisation engagées au cours de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN (Berkovich and Ginsberg, 2003; Muller, et al., 2001; Ren, et al., 2002). Ainsi, une augmentation rapide du niveau protéique de E2F1 est observée dans des lignées cellulaires tumorales variées mais également dans des systèmes de cultures primaires (fibroblastes, thymocytes murins) traités par divers agents créant un stress génotoxique (Stevens and La Thangue, 2004) et ceci indépendamment du statut des protéines RB et p53. De manière analogue à p53, cette induction de E2F1 est liée à une augmentation de la stabilité de la protéine en réponse à diverses modifications post-traductionnelles visant à limiter son turnover. Dans la voie de signalisation de réponse aux dommages de l'ADN, les kinases ATM/ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated/Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related) agissent très en amont, comme des détecteurs des lésions et initient une cascade de phosphorylation sur les effecteurs incluant entre autre, les kinases CHK1 et CHK2 (Checkpoint Kinase). Il a été décrit une phosphorylation de E2F1 sur son résidu sérine en position 31 par les protéines kinases ATM/ATR (Lin, et al., 2001) et/ou en position 364 par la kinase CHK2 (Stevens, et al., 2003). E2F1 est également la cible d'acétylation sur différents résidus lysine par PCAF, dont l'activité HAT est stimulée en réponse aux dommages sur l'ADN. De plus, le traitement des cellules par un inhibiteur de la topoisomérase II (étoposide), induit une acétylation de E2F1 sur les résidus lysine 873/874 dans la région C-terminale incluant un site de liaison à RB. Ce domaine a été identifié dernièrement comme une nouvelle région d'interaction et de contrôle de l'activité de E2F1 (Rubin, et al., 2005). Cette double acétylation a pour conséquence d'empêcher l'interaction RB/E2F1 et d'activer E2F1 (Markham, et al., 2006). L'ensemble de ces données suggère que les processus d'acétylation de E2F1 et/ou de ses partenaires directs pourraient jouer un rôle important au cours de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, en régulant à la fois la stabilité et l'activité de E2F1. Dans ce contexte, E2F1 devient capable d'activer les points de contrôle engagés dans la réponse aux dommages de l'ADN en transactivant des gènes cibles tels que les kinases ATM, CHK2 (Powers, et al., 2004; Rogoff, et al., 2004) et CHK1 (Urist, et al., 2004). De plus, un rôle direct de la protéine E2F1 dans les processus de recombinaison/réparation de l'ADN a été proposé (Liu, et al., 2003). Depuis, d'autres résultats de la littérature sont venus renforcer cette hypothèse et montrent, à la fois dans un système de lignées cellulaires, mais aussi « *in vivo* » dans un modèle murin nullizygote qu'E2F1 est capable d'activer des points de contrôle, de stimuler le processus de réparation de l'ADN tout en induisant une résistance cellulaire à l'apoptose (Berton, et al., 2005; Wikonkal, et al., 2003) (**Figure 9**).

Parallèlement, de multiples données convergent vers le fait que l'accumulation de la protéine E2F1 en présence d'un stress génotoxique peut aussi engager les cellules vers l'apoptose de manière

dépendante ou non de p53 (Hong, et al., 2006; Hsieh, et al., 2002; Stevens, et al., 2003). Ainsi, les thymocytes E2F1^{-/-} sont moins sensibles à l'étoposide (Lin, et al., 2001) et la neutralisation de E2F1 par ARN interférence dans ces cellules en culture diminue leur sensibilité à l'apoptose en réponse à la chimiothérapie (Urist, et al., 2004). De plus, Rogoff et coll. ont montré dans un modèle de fibroblastes humains non transformés que cette propriété serait spécifique à E2F1 parmi les membres de la famille E2F (Rogoff, et al., 2004).

L'ensemble de ces constatations va donc dans le sens d'un rôle possiblement important de E2F1 au cours de la réponse aux dommages de l'ADN et ambivalente en terme de réponse thérapeutique aux drogues cytotoxiques. En effet, si E2F1 est capable d'activer la réparation de l'ADN endommagé, il pourrait être un facteur contribuant à la chimiorésistance des cellules tumorales. A l'inverse, sa capacité à induire l'apoptose en réponse à des lésions de l'ADN pourrait sensibiliser les cellules tumorales aux chimiothérapies. Dans ce cas, des essais précliniques ont montré la capacité de E2F1 à potentialiser les effets anti-tumoraux de divers agents cytotoxiques (Dong, et al., 2002; Gomez-Manzano, et al., 2001; Ma, et al., 2003; Rodicker, et al., 2001). Cette réponse différente de E2F1 aux agents endommageant l'ADN pourrait dépendre de son niveau d'expression, de son état d'activation (phosphorylation, acétylation), du niveau d'expression de ses protéines partenaires mais également du contexte cellulaire et des caractéristiques génétiques de la cellule.

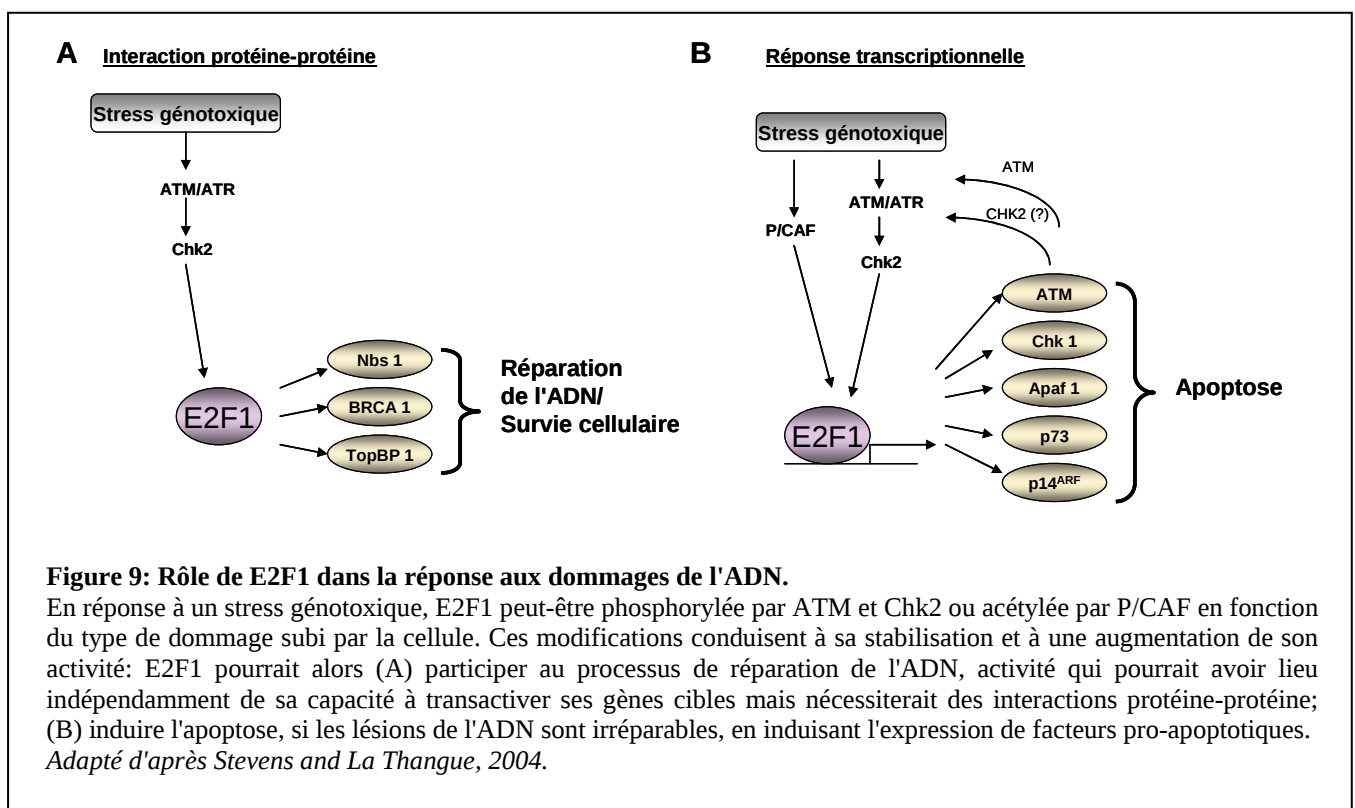


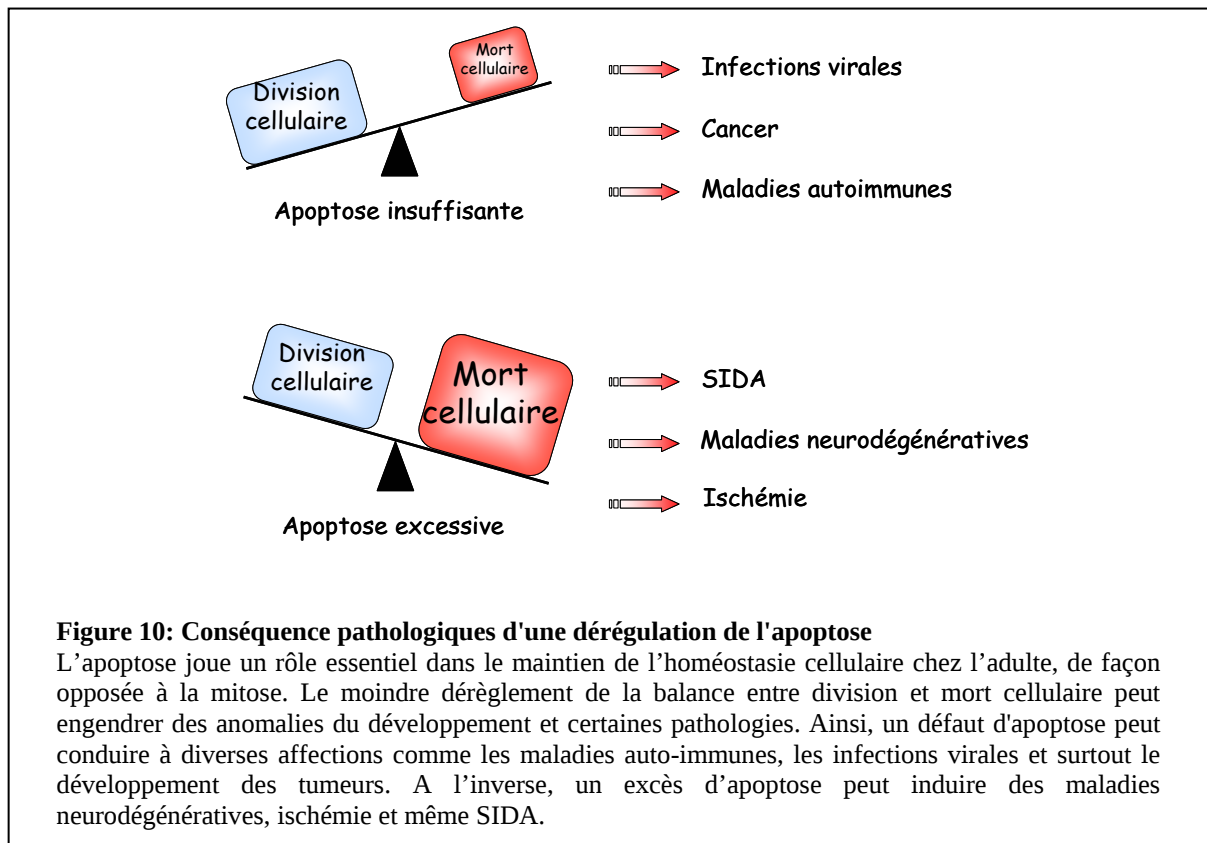
Figure 9: Rôle de E2F1 dans la réponse aux dommages de l'ADN.

En réponse à un stress génotoxique, E2F1 peut-être phosphorylée par ATM et Chk2 ou acétylée par P/CAF en fonction du type de dommage subi par la cellule. Ces modifications conduisent à sa stabilisation et à une augmentation de son activité: E2F1 pourrait alors (A) participer au processus de réparation de l'ADN, activité qui pourrait avoir lieu indépendamment de sa capacité à transactiver ses gènes cibles mais nécessiterait des interactions protéine-protéine; (B) induire l'apoptose, si les lésions de l'ADN sont irréparables, en induisant l'expression de facteurs pro-apoptotiques. Adapté d'après Stevens and La Thangue, 2004.

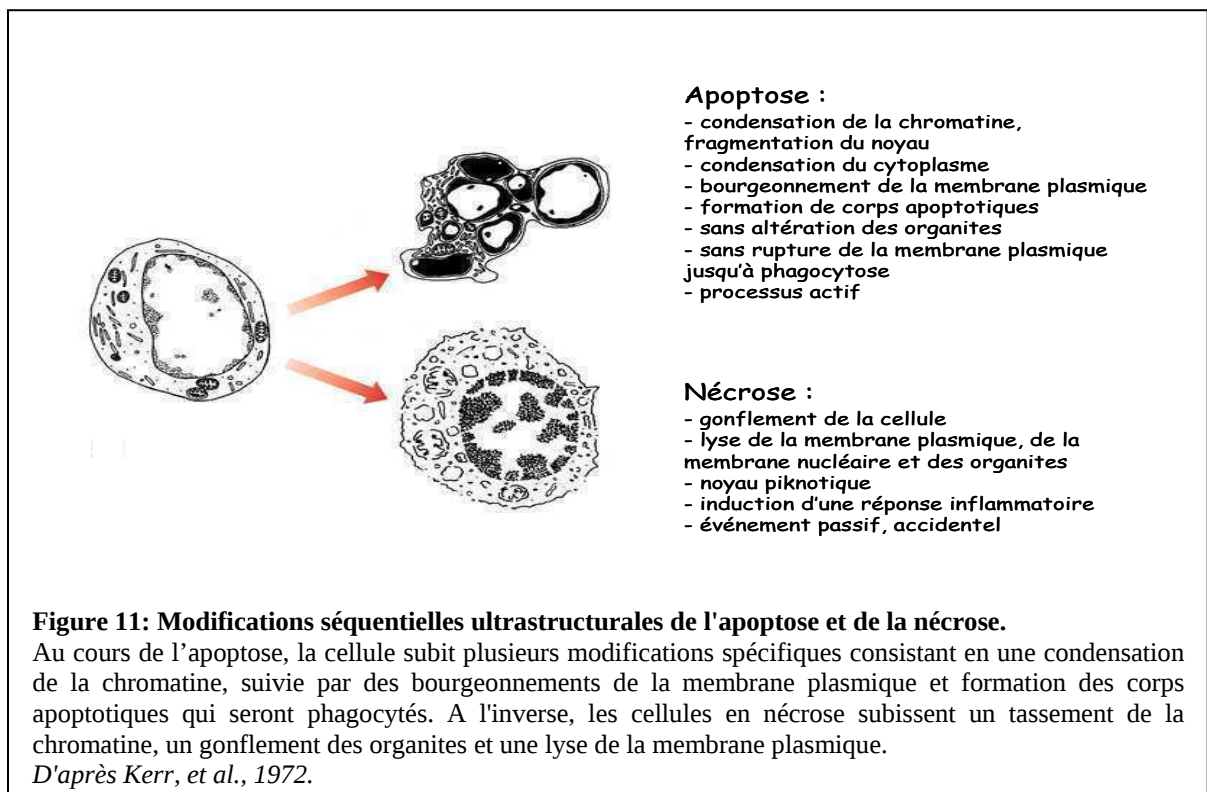
II.2.3 Apoptose et E2F1

II.2.3.1 Généralités sur l'apoptose

En 1972, Kerr et collaborateurs ont décrit une mort cellulaire dans divers tissus et types cellulaires qu'ils ont appelé « apoptose » : ces cellules présentaient des caractéristiques morphologiques communes, mais cependant distinctes de celles observées dans les cellules en nécrose (Kerr, et al., 1972). Ce terme vient du grec et fait allusion à la chute des feuilles en automne. L'apoptose est un phénomène conservé à travers les espèces et est retrouvée chez tous les organismes multicellulaires (Cikala, et al., 1999; Steller, 1995). Elle permet à l'organisme de contrôler le nombre de cellules et la taille des tissus et peut être activée par des signaux physiologiques normaux, intra- ou extracellulaires, mais aussi par des stimuli pathologiques (Hengartner, 2000). En effet, elle est responsable de l'élimination des cellules endommagées par un stress oxydatif, oncogénique, par des altérations génétiques, par un choc thermique ou par des agents thérapeutiques cytotoxiques tels que les chimiothérapies conventionnelles, l'irradiation aux rayons γ ou l'immunothérapie (Herr and Debatin, 2001; Johnstone, et al., 2002; Kaufmann and Earnshaw, 2000). Elle permet également à l'organisme d'éliminer les cellules tumorales (ou infectées par des virus) reconnues comme cellules du non soi, qui sont détruites par un processus apoptotique déclenché par les lymphocytes T cytotoxiques du microenvironnement. Ce processus de défense est nommé réponse immune anti-tumorale (Barry and Bleackley, 2002; Catros-Quemener, et al., 2003; Pinkoski and Green, 2002). Ainsi, le moindre dérèglement de l'apoptose et/ou de son contrôle aboutissant à une mort cellulaire excessive ou insuffisante peut engendrer des anomalies du développement et certaines pathologies. Par exemple, un excès d'apoptose dans le système nerveux central peut induire des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Mattson, 2004), la sclérose latérale amyotrophique (Sathasivam, et al., 2001) ou la maladie de Parkinson (Tatton, et al., 2003). A l'inverse, un déficit apoptotique peut aussi causer diverses affections telles que les maladies auto-immunes (la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux disséminé, par exemple) qui se traduisent par une apoptose insuffisante des cellules auto-immunes réactives. Un défaut d'apoptose favorise la survie et la croissance de cellules anormales, à l'origine d'un déséquilibre entre la croissance et la mort cellulaire qui conduit potentiellement au développement ou à la progression des tumeurs (Reed, 1999; Thompson, 1995) (**Figure 10**).



Sur le plan morphologique, une cellule en apoptose se caractérise par des changements ultrastructuraux caractéristiques qui la distinguent de la cellule en nécrose (**Figure 11**).



Une des premières modifications morphologiques de l'apoptose est la réduction du volume cellulaire par condensation du cytoplasme. Ensuite, on assiste à une condensation de la chromatine qui débute à la périphérie de la membrane nucléaire, puis cette dernière se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes. Après cette phase de condensation, la cellule présente à sa surface des vésicules renfermant des amas de chromatine et des fragments cytoplasmiques cernés de membrane plasmique. Ces vésicules vont se détacher de la cellule pour former les corps apoptotiques, qui sont libérés dans le milieu extra-cellulaire. Ces corps apoptotiques sont rapidement phagocytés « *in vivo* » par les cellules voisines et les macrophages, sans provoquer de processus inflammatoire dans les tissus. Ces caractéristiques morphologiques permettent de différencier l'apoptose de la nécrose, autre mode de mort cellulaire, qui aboutit-elle, à l'éclatement de la cellule, à la libération des constituants intracellulaires dans le milieu et à la genèse d'une réaction inflammatoire. Les changements morphologiques survenant au cours de l'apoptose sont accompagnés d'altérations biochimiques spécifiques telles que la fragmentation internucléosomale de l'ADN, l'externalisation des phosphatidylsérines composant normalement le feuillet interne de la membrane plasmique. Ce processus permet aux cellules d'être reconnues comme cibles par les macrophages pour la phagocytose (Fadok, et al., 2000).

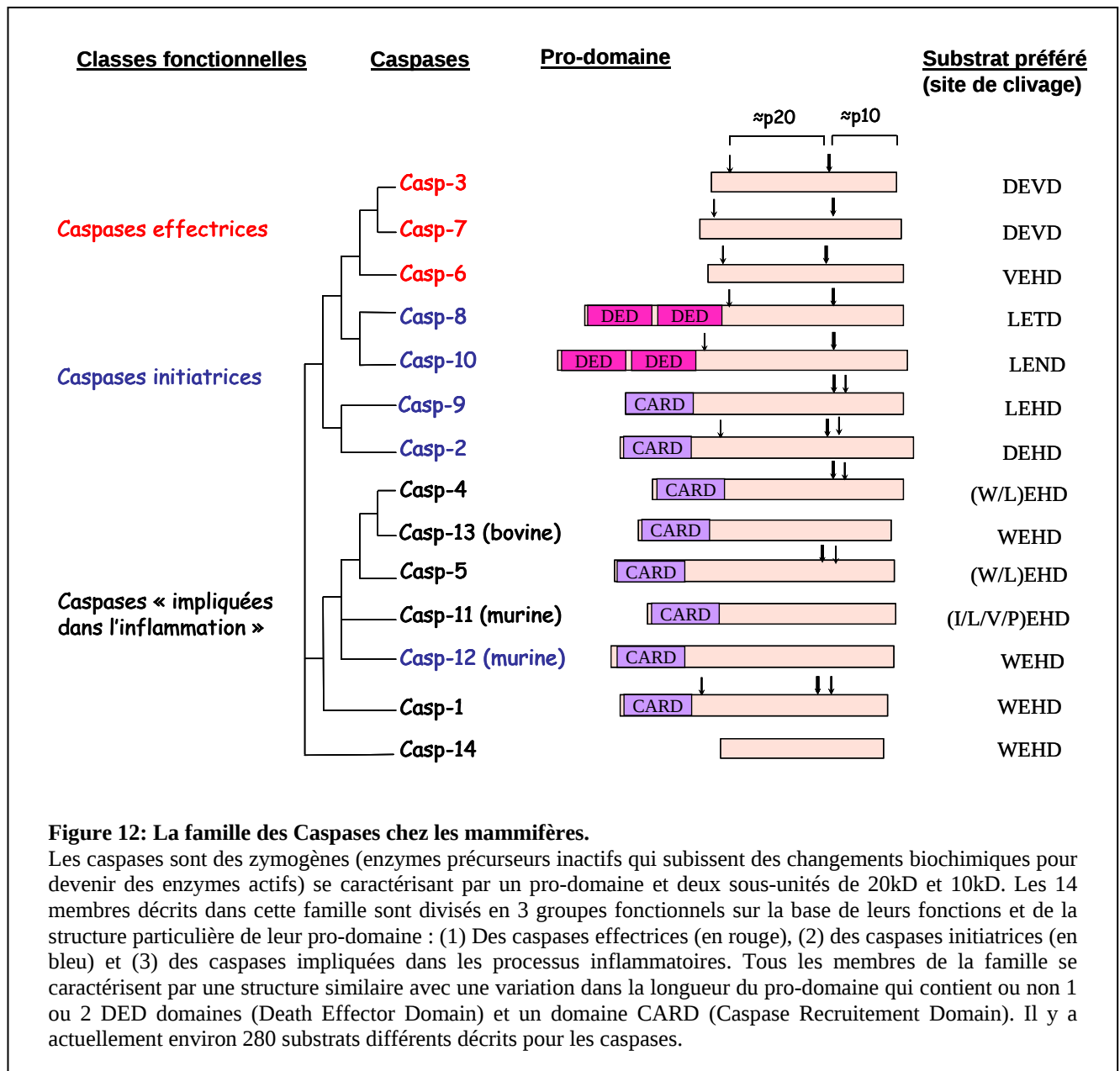
II.2.3.2 Les acteurs moléculaires de l'apoptose

La mort cellulaire par apoptose résulte de l'activation de voies de signalisation moléculaires complexes étroitement régulées. Les gènes clés impliqués dans la régulation de l'apoptose, initialement identifiés chez le nématode (*C. elegans*) et leurs homologues chez les mammifères codent pour des protéines pro-apoptotiques telles que les caspases et des facteurs anti-apoptotiques.

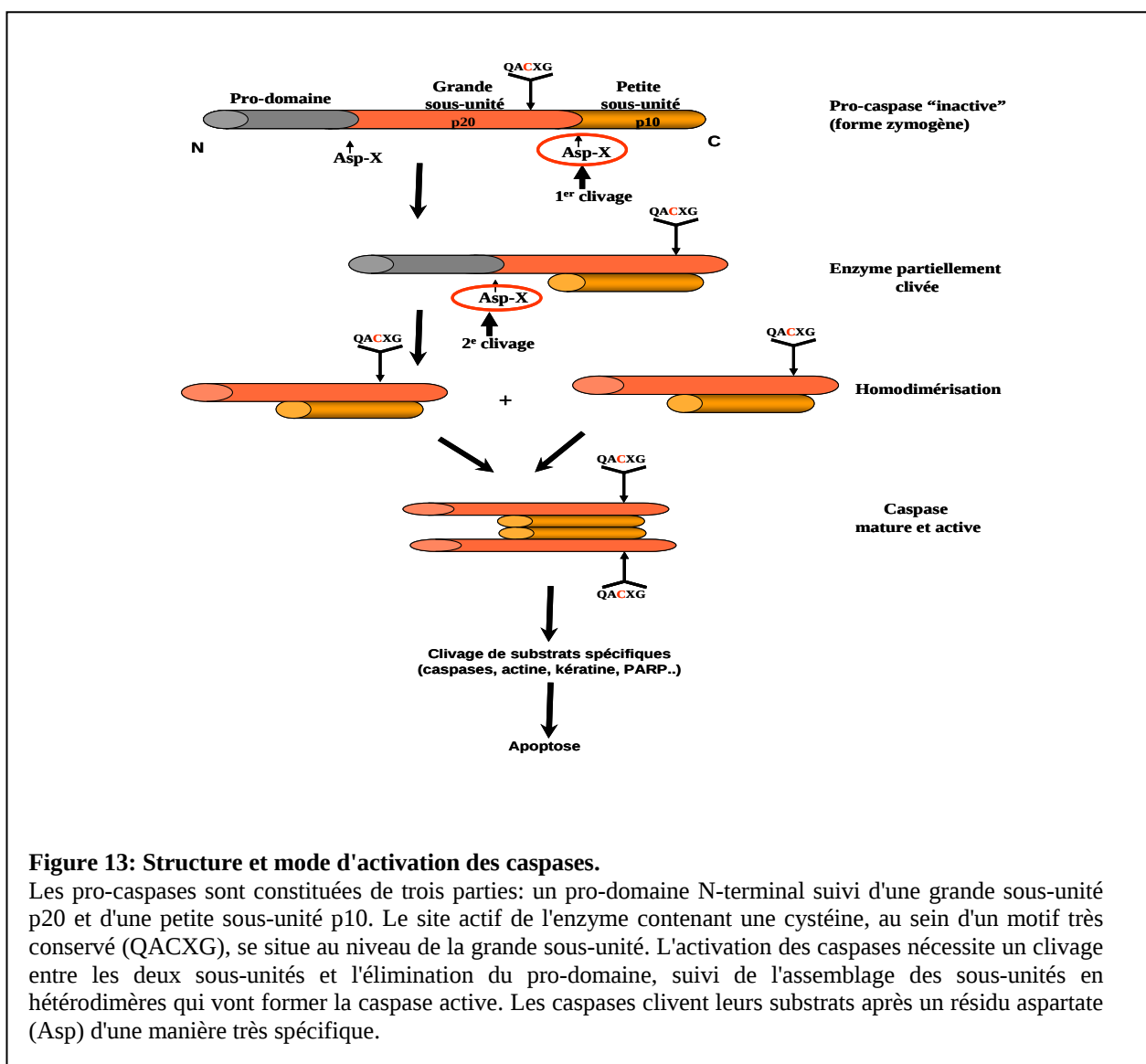
a) *Facteurs pro-apoptotiques: Les caspases et leurs co-facteurs*

Les caspases (Cystein Aspartic Acid-Protease) appartiennent à une famille de protéases à cystéine qui sont des effecteurs moteurs du processus apoptotique. De par leur activité protéasique, elles clivent des substrats spécifiques en une protéolyse raisonnée conduisant aux modifications morphologiques et biochimiques caractérisant les cellules en apoptose. Par exemple, en clivant leurs cibles, les caspases (i) inactivent des protéines anti-apoptotiques; (ii) dégradent des protéines de structure; (iii) dégradent des protéines de jonction favorisant l'isolement de la cellule. Sur la base de leur structure et de leurs fonctions, les caspases sont groupées en deux classes principales: (i) les caspases initiateuses (caspases-2, -8, -9 et -10) activées par oligomérisation ; (ii) les caspases effectrices (caspases-3, -6, et -7) dont l'activation nécessite leur clivage par les caspases initiateuses (**Figure 12**).

Physiologiquement, les caspases sont exprimées sous la forme de proenzymes contenant trois domaines: un domaine aminoterminal ou prodomaine de taille variable, une grande sous-unité et une petite sous-unité. Selon la taille du prodomaine, on distingue des caspases à long prodomaine (caspases -1, 2, 4, 5, 8, 9, et 10) qui correspondent aux caspases initiatrices et des caspases à prodomaine court (caspases -3, 6 et 7) qui correspondent aux caspases effectrices (Stennicke and Salvesen, 2000).



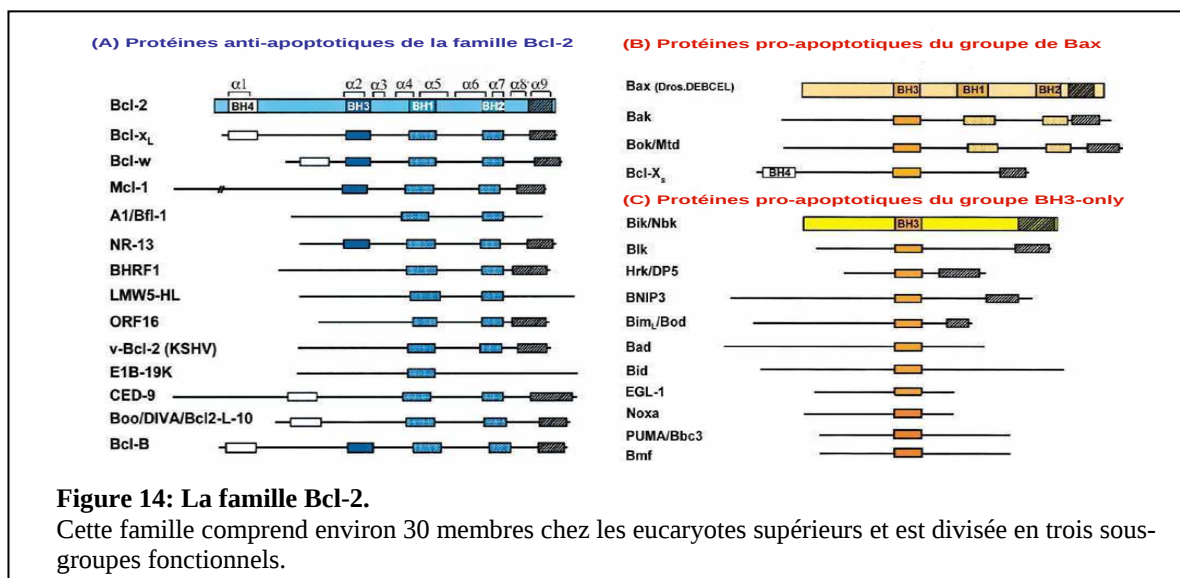
L'activation des caspases nécessite leur clivage au niveau de résidus aspartates, la libération du prodomaine et l'association de la petite et la grande sous-unité sous forme d'hétérodimère. L'enzyme active est donc un tétramère constitué de deux hétérodimères au sein desquels les petites et grandes sous-unités sont intimement liées (**Figure 13**). L'activité enzymatique des caspases est étroitement régulée, notamment par leur interaction avec des cofacteurs. Ces interactions font intervenir leurs prodomaines et notamment les séquences DED (Death Effector Domain) et CARD (Caspase Activation Recruitment Domain). Parmi les activateurs des caspases, on trouve la protéine APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) qui lie la caspase-9 ou la protéine FADD (Fas Associated Death Domain) qui lie les caspases -8 et -10.



b) Les facteurs anti-apoptotiques

D'autres protéines à l'inverse des caspases empêchent la mort de la cellule par la voie de l'apoptose. Parmi ces facteurs anti-apoptotiques, on trouve certaines protéines virales qui permettent la réplication du virus en inhibant l'apoptose de la cellule infectée, dont la protéine CrmA (Cytokine response modifier gene A) qui prévient le clivage des caspases -1 et -8, la protéine du baculovirus p35 (Zhou, et al., 1997) qui inhibe la caspase 3 activée et les protéines de la famille IAP (Inhibitor of Apoptosis) découvertes initialement chez le baculovirus qui inhibent à la fois l'activité des caspases initiatrices et celle des caspases effectrices (Liston, et al., 2003). Une autre famille de protéines anti-apoptotiques contrôle l'activation des caspases-8, et -10. Il s'agit des protéines c-FLIP (FADD-ICE like Inhibitory Proteins), homologues chez les mammifères de la protéine virale v-FLIP (Thome and Tschopp, 2001).

Enfin, les acteurs anti-apoptotiques majeurs sont représentés par les membres de la famille BCL-2. La protéine BCL-2 possède quatre domaines conservés nommés BCL-2 homology (BH) domain. Chez les mammifères, la famille compte au moins 20 membres comportant tous au moins un domaine BH (Cory and Adams, 2002). BCL-2 et quatre autres membres de la famille sont anti-apoptotiques (BCL-xL, BCL-w, A1 et MCL-1) et contiennent des régions BH1, 2 et 3 (**Figure 14**). Les membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 peuvent être divisés en deux groupes. Le premier groupe dont le chef de file est nommé BAX comporte uniquement trois membres (BAX, BAK et MTD/BOK) également structurés par des régions BH1, 2 et 3. Le deuxième groupe comprend des protéines qui possèdent uniquement un court domaine BH3 et constituent la sous-famille "BH3-only" qui dénombre actuellement huit membres chez les mammifères (BID, BAD, BIM, BIK, BMF, NOXA, PUMA et HRK). A l'état normal, ils sont séquestrés au niveau du cytosquelette, mais en réponse à un signal pro-apoptotique, ils forment des hétérodimères avec les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 et neutralisent ainsi leur fonction de survie.



II.2.3.3 Les voies de signalisation de l'apoptose

A ce jour, deux grandes voies à l'origine de l'activation des caspases et des membres de la famille BCL-2 ont été décrites: la voie de la mitochondrie ou voie intrinsèque et la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque (**Figure 15**).

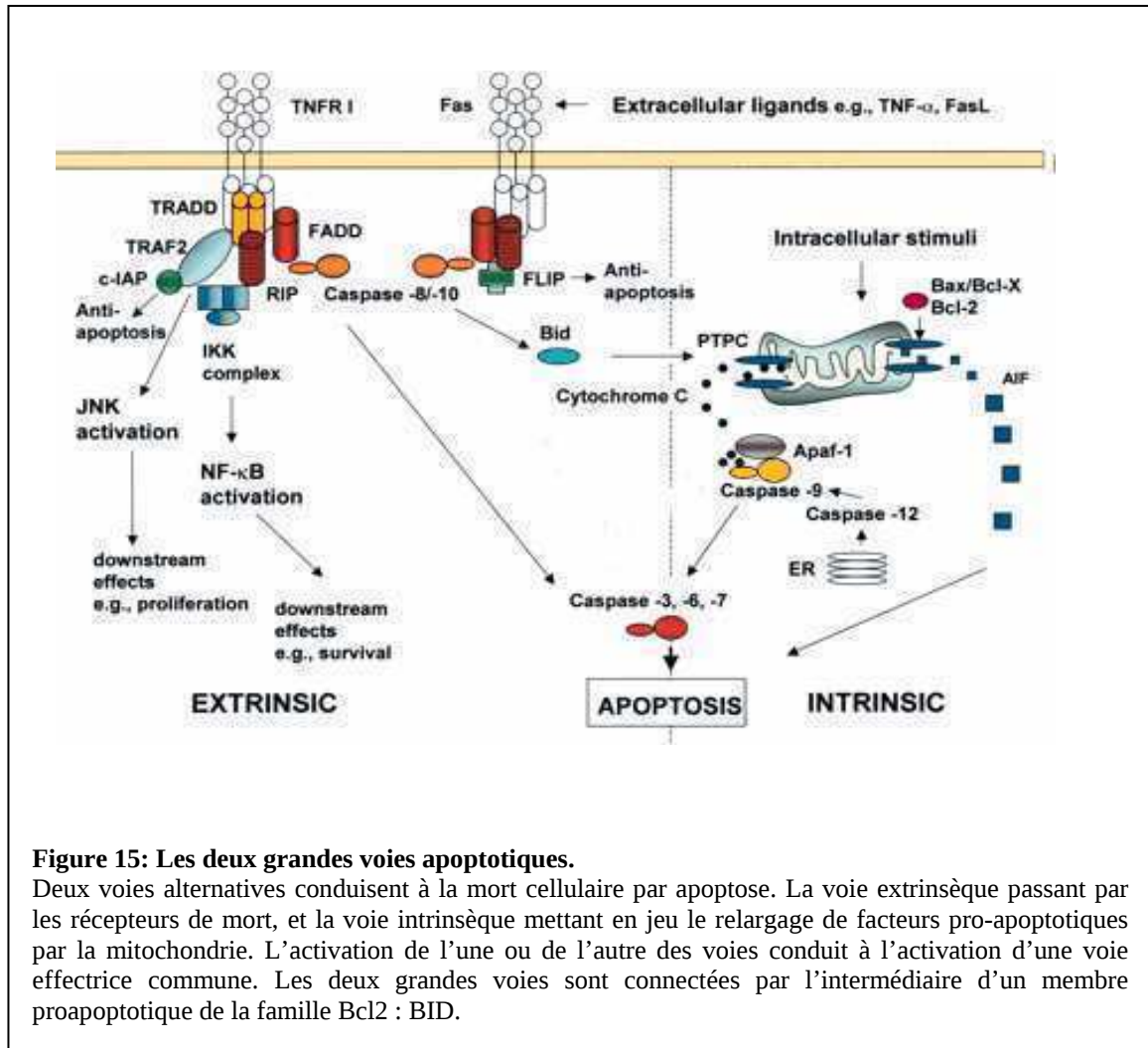


Figure 15: Les deux grandes voies apoptotiques.

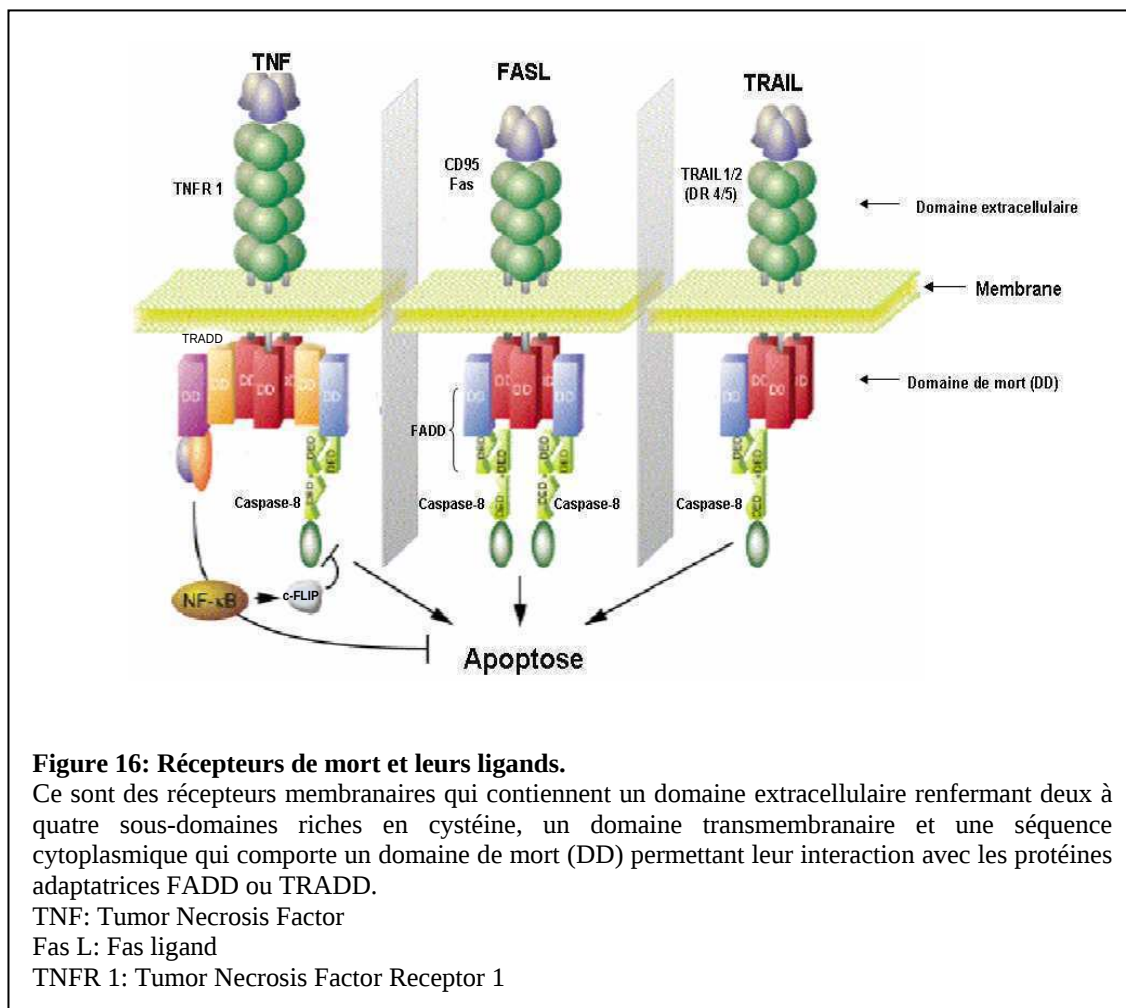
Deux voies alternatives conduisent à la mort cellulaire par apoptose. La voie extrinsèque passant par les récepteurs de mort, et la voie intrinsèque mettant en jeu le relargage de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie. L'activation de l'une ou de l'autre des voies conduit à l'activation d'une voie effectrice commune. Les deux grandes voies sont connectées par l'intermédiaire d'un membre proapoptotique de la famille Bcl2 : BID.

a) La voie mitochondriale intrinsèque

Cette voie est activée en réponse à divers stimuli intra- et extracellulaires comme la privation de facteurs de croissance, un stress osmotique, hypoxique ou génotoxique (Hengartner, 2000; Kaufmann and Vaux, 2003). Cette voie se caractérise par la libération de facteurs apoptotiques à partir de la mitochondrie. Elle est dépendante des protéines de la famille BCL-2 et implique la libération du cytochrome c de la mitochondrie dans le milieu cytoplasmique. Le cytochrome c forme alors un complexe multiprotéique avec la molécule adaptatrice APAF-1 et la pro-caspase-9 en présence d'ATP. Ce complexe est dénommé apoptosome (Adrain and Martin, 2001). La pro-caspase-9, activée lors de son recrutement au niveau de l'apoptosome, active à son tour les caspases effectrices (**Figure 15**). Deux autres protéines pro-apoptotiques jouant un rôle dans la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, sont également libérées par la mitochondrie: le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G (Endo G) (Li, et al., 2001; Susin, et al., 1999). L'activité des caspases effectrices activées en réponse à la libération du cytochrome c est modulée par la présence des protéines IAPs, SMAC/DIABLO et OMI/HTRA2.

b) La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque

L'autre voie majeure d'initiation de l'apoptose, très largement impliquée dans la réponse cellulaire immune (Ashkenazi and Dixit, 1998), mais également activée en réponse aux stress génotoxiques (Debatin and Krammer, 2004; Micheau, et al., 1999a; Micheau, et al., 1999b) est celle des récepteurs de mort ou voie extrinsèque. Ces récepteurs membranaires appartiennent à la superfamille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor) dont les membres présentent un domaine extracellulaire similaire, riche en cystéines (**Figure 16**). Les récepteurs de mort exprimés à la surface de la cellule sous forme d'homotrimère renferment également dans leur région cytoplasmique un domaine d'interaction protéine-protéine nommé domaine de mort (DD) qui permet le recrutement d'autres protéines et la propagation du signal de mort induit par la stimulation de ses récepteurs (Ashkenazi and Dixit, 1999; Bodmer, et al., 2000; Peter and Krammer, 2003). On décompte actuellement huit membres incluant FAS (aussi dénommé CD95, APO-1, DR2) activé par son ligand FASL, le récepteur TNF-R1 qui lie le TNF α et la lymphotoxine α , et les récepteurs du ligand TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), TRAILR1 (aussi connu comme DR4) et TRAILR2 (également dénommé DR5).



L'activation de ces récepteurs par leur ligand respectif conduit à l'induction de l'apoptose. La fixation du ligand induit une oligomérisation des récepteurs, un changement de leur conformation et le recrutement par les domaines DD de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain protein). Cette protéine possède en N-terminal, un autre domaine d'interaction protéine-protéine appelé domaine effecteur de mort (DED) qui stimule le recrutement des caspases initiatrices -8 ou -10. Ce complexe, incluant le ligand, son récepteur, FADD et la caspase-8/10 correspond au complexe du DISC (Death Inducing Signaling Complex). Le recrutement de la caspase 8 (ou caspase-10) et sa forte concentration locale semble être à l'origine de son autoclivage et de son activation. La caspase-8 (ou caspase-10) ainsi activée initie alors la cascade des caspases effectrices en aval, soit directement, soit par l'intermédiaire d'une boucle d'amplification qui aboutit à la libération du cytochrome c de la mitochondrie en réponse à l'activation de BID clivé par la caspase-8 (Li, et al., 1998; Luo, et al., 1998; Scaffidi, et al., 1998). Il existe donc un lien étroit entre la voie extrinsèque et intrinsèque (**Figure 15**). Plus tardivement, les récepteurs activés forment des agrégats multimériques au niveau de domaines riches en lipides (« radeaux lipidiques ») qui seront internalisés (Algeciras-Schimmich and Peter, 2003).

Cette voie pro-apoptotique des récepteurs de mort est modulée par les isoformes anti-apoptotiques c-FLIP_{Long} et c-FLIP_{Court} issues d'un épissage alternatif qui agissent au niveau du DISC en empêchant le recrutement de la caspase-8. Il a été proposé, par homologie au mode d'action de v-FLIP, que les deux isoformes agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs et empêchent le recrutement de la caspase-8 au niveau du DISC et par la même son activation (Rasper, et al., 1998) (**Figure 16**). Ainsi, un rapport élevé c-FLIP_{Court}/caspase-8 inhiberait l'activation de la caspase-8 et l'initiation de la cascade apoptotique (Krueger, et al., 2001; Schmitz, et al., 2004). Concernant c-FLIP_{Long}, le mécanisme semble plus complexe. Un ratio élevé c-FLIP_L/caspase-8 exerce aussi une activité anti-apoptotique (Chang, et al., 2002). Cependant, il a été montré que c-FLIP_L recruté au niveau du DISC pouvait être clivé en une sous-unité p43 restant complexée au DISC et en une sous-unité dissociée. Il a ainsi été suggéré que le complexe c-FLIP_L/caspase-8 pourrait induire un clivage partiel de la caspase-8 et une activité protéasique de l'hétérodimère affectant des substrats situés à proximité (Chang, et al., 2002; Micheau, et al., 2002).

Le mécanisme de la modulation de la mort cellulaire par c-FLIP n'est pas encore complètement élucidé à ce jour, et les facteurs impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif des isoformes c-FLIP ne sont pas connus.

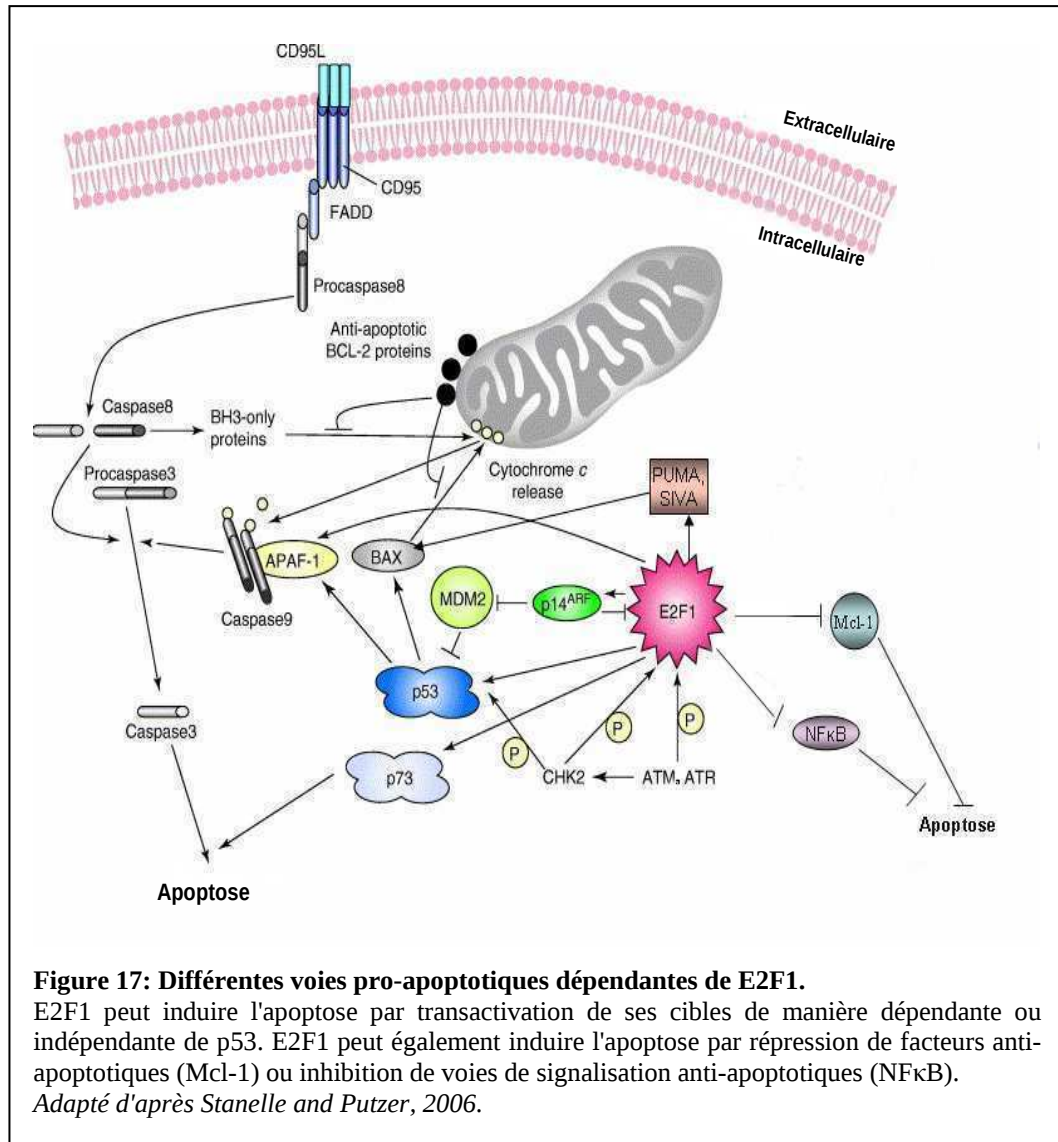
II.2.3.4 E2F1 : facteur pro-apoptotique et anti-apoptotique

a) E2F1 : facteur pro-apoptotique

Parallèlement à l'induction d'une entrée en phase S, la présence d'un haut niveau d'expression de E2F1 résulte en une mort cellulaire par apoptose dans diverses conditions expérimentales (Qin, et al., 1994; Shan and Lee, 1994; Wu and Levine, 1994) et l'inactivation de E2F1 s'accompagne d'une résistance à la mort programmée dans certains types cellulaires. Selon certains auteurs, cette fonction pro-apoptotique serait spécifique à E2F1 (DeGregori, et al., 1997; Kowalik, et al., 1998; Leone, et al., 2001; Lissy, et al., 2000) tandis que pour d'autres, E2F2 et E2F3 possèderaient aussi cette capacité (Dirks, et al., 1998; Vigo, et al., 1999; Ziebold, et al., 2001). De façon intéressante, il a été récemment montré que l'activité apoptotique médiée par E2F3 dépendait de E2F1 (Lazzerini Denchi and Helin, 2005). De plus, une boucle de rétro-contrôle négatif exercée par les protéines E2F7 et E2F8 pour inhiber l'apoptose induite par E2F1 (Li, et al., 2008; Moon and Dyson, 2008) a récemment été décrite. Ce sont les phénotypes observés chez les souris *E2F1*^{-/-} qui apportent des arguments convaincants pour un rôle physiologique de E2F1 au cours du processus apoptotique (Field, et al., 1996; Garcia, et al., 2000; Zhu, et al., 1999). Chez ces animaux, la perte de E2F1 entraîne effectivement une résistance à l'apoptose des thymocytes matures ayant pour effet l'accumulation anormale de lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺ par défaut de sélection négative. Le facteur E2F1 est aussi impliqué dans l'apoptose résultant de la perte de *RB*. Ainsi, dans les embryons *Rb*^{-/-} (le phénotype *Rb*^{-/-} étant létal), l'inactivation de E2F1 résulte en une diminution nette de l'apoptose par rapport à la population témoin et augmente de manière significative la vie fœtale bien que ces derniers meurent encore avant la naissance (Saavedra, et al., 2002; Tsai, et al., 1998).

Les voies de signalisation pro-apoptotiques médiées par E2F1 potentiellement mises en jeu lors de la mort cellulaire sont multiples, interconnectées et coopèrent très probablement pour induire l'apoptose. Elles impliquent aussi bien la voie mitochondriale que la voie extrinsèque (**Figure 17**). Ainsi, parmi les nombreuses cibles transcriptionnelles de E2F1 on trouve des acteurs clés de la voie intrinsèque incluant les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 incluant PUMA, Noxa, Bim et HRK (Hershko and Ginsberg, 2004). SIVA représente un autre effecteur récemment décrit de l'apoptose médiée par E2F1, dont l'expression est directement stimulée par la liaison de E2F1 sur un site consensus au niveau du promoteur du gène cible (Fortin, et al., 2004). La surexpression de E2F1 résulte également en une accumulation d'un certain nombre de caspases initiateuses dont les caspases-9 et -2 ou effectrices telles que les caspases-7 et -3 par un mécanisme d'activation directe de la transcription de ces gènes (Afshar, et al., 2006; Cao, et al., 2004; Moroni, et al., 2001; Nahle, et al., 2002). La protéine APAF-1 est un autre effecteur classiquement décrit au cours de la mort cellulaire dépendante de E2F1 qui contrôle

directement son expression (Furukawa, et al., 2002; Moroni, et al., 2001). La protéine Smac/DIABLO qui neutralise l'action des facteurs anti-apoptotiques IAPs a aussi été récemment identifiée comme une cible effectrice directe de la mort cellulaire médiée par E2F1 (Xie, et al., 2006).



Concernant la voie extrinsèque, plusieurs travaux impliquent le facteur E2F1. L'expression de E2F1 est en effet induite lors de l'activation du récepteur FAS par son ligand dans les lymphocytes murins. En outre, les lymphocytes T *E2F1*^{-/-} sont nettement plus résistants à ce stimulus apoptotique que la population contrôle (Bi, et al., 2001; Cao, et al., 2004). Dans des cultures primaires de neurones, la neutralisation de E2F1 corrèle également avec une résistance à l'apoptose médiée par FAS (Hou, et al., 2002). De plus, E2F1 induit l'expression de la caspase-8 et son activation en réponse à l'irradiation d'astrocytes tumoraux humains (Afshar, et al., 2006). Ces données suggèrent qu'E2F1 participe à la voie médiée par l'activation du récepteur de mort FAS. Nous avons confirmé cette implication au laboratoire dans des lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire (Salon, et al., 2006). Nos résultats démontrent un mécanisme par lequel E2F1 induit l'apoptose d'une manière indépendante de p53 par activation de la voie des récepteurs de mort. Ainsi, dans nos modèles cellulaires, E2F1 inhibe spécifiquement l'expression de l'isoforme c-FLIP_{Court} conduisant ainsi au recrutement de la caspase-8 au niveau du DISC et à son activation (Salon, et al., 2006).

Dans les modèles animaux comme dans les systèmes de culture cellulaire, E2F1 est capable d'induire l'apoptose de manière dépendante ou non de la protéine p53 ou de son domaine de transactivation (Bell and Ryan, 2004; Trimarchi and Lees, 2002). Cette activité p53-dépendante ou indépendante pourrait dépendre du contexte cellulaire, mais aussi du stimulus puisqu'il a été montré chez la drosophile que l'apoptose médiée par E2F1 en réponse aux lésions sur l'ADN dépendait de p53, alors que l'apoptose dépendante de E2F1 en réponse à l'inactivation de RB non (Moon, et al., 2008). Différents mécanismes pour l'apoptose dépendante de p53 ont été proposés. E2F1 peut induire l'expression de p14^{ARF}, classiquement décrit comme l'un de ses gènes cibles, qui a son tour, séquestre et neutralise l'oncoprotéine hDM2, empêchant ainsi la dégradation de p53 (Aslanian, et al., 2004; Bates, et al., 1998; de Stanchina, et al., 1998; DeGregori, et al., 1997; Parisi, et al., 2002; Robertson and Jones, 1998). Néanmoins, des études menées chez la souris ou sur des fibroblastes en culture montrent qu'E2F1 est également capable d'engager un processus apoptotique via p53 en l'absence de p14^{ARF}, suggérant l'existence de mécanismes alternatifs pour l'induction de p53 (Lindstrom and Wiman, 2003; Rogoff, et al., 2002; Russell, et al., 2002; Tolbert, et al., 2002; Tsai, et al., 2002). La stabilisation de p53 pourrait faire intervenir alternativement une interaction directe avec E2F1 (Hsieh, et al., 2002) ou l'induction de sa phosphorylation sur différents résidus serine en fonction du stress subi et/ou du type cellulaire (Hershko, et al., 2005; Rogoff, et al., 2002). De manière intéressante, l'équipe de Nip et collaborateurs décrit une stabilisation de p53 par E2F1 ne faisant pas intervenir son domaine de transactivation (Nip, et al., 2001).

Parallèlement, en l'absence de p53, l'induction de l'expression de son homologue, p73, reconnue comme cible de E2F1 (Irwin, et al., 2000; Stiewe and Putzer, 2000) a été rapportée dans divers types cellulaires transformés ou non (Irwin, et al., 2000; Lissy, et al., 2000). L'induction de p73 par E2F1

pourrait intervenir entre autre, lors de l'apoptose qui suit l'activation du récepteur TCR des lymphocytes T (Lissy, et al., 2000). Une autre étude suggère qu'en réponse à un dommage de l'ADN, E2F1 est acétylé et spécifiquement dirigé sur le promoteur de p73 afin d'induire l'expression de ce gène (Pediconi, et al., 2003).

Outre la stimulation directe de l'expression d'effecteurs pro-apoptotiques, il existe un second mécanisme utilisé par E2F1 pour induire la mort cellulaire : il s'agit de l'inhibition de signaux anti-apoptotiques ou de survie. Ainsi, E2F1 sensibilise les cellules d'ostéosarcome humain SaoS2 à l'apoptose par la voie de survie dépendante du facteur de transcription NF- κ B (Phillips, et al., 1999). Dans ce modèle, la liaison du TNF α (Tumor necrosis factor) sur son récepteur TNFR stimule la voie NF- κ B par l'intermédiaire d'un adaptateur, TRAF2 (TNF Receptor Associated Factor 2) (Chen and Goeddel, 2002). C'est à ce niveau qu'intervient E2F1 en induisant une diminution de l'expression de TRAF2. Par son effet inhibiteur sur TRAF2, E2F1 dirige donc les cellules vers un état de sensibilisation au ligand de mort TNF α . Dans ce système, E2F1 inhibe aussi l'activité des kinases IKK α et β conduisant à la rétention dans le cytoplasme de la sous-unité p65 de NF- κ B, alors incapable de transactiver ses gènes cibles nucléaires (Phillips, et al., 1999). De plus, un autre mode d'inhibition de NF- κ B par E2F1 a été décrit, par interaction directe de E2F1 avec les sous-unités Rel A/p65 de NF- κ B, résultant en une diminution de l'affinité de liaison à l'ADN du complexe (Tanaka, et al., 2002). Un autre exemple d'inhibition de signaux anti-apoptotique médiée par E2F1 concerne la répression du promoteur du gène codant pour MCL-1, un membre anti-apoptotique de la famille BCL2 (Croxtton, et al., 2002; Elliott, et al., 2001).

b) E2F1 : facteur anti-apoptotique

A l'inverse des études décrivant une fonction apoptotique de E2F1, des données plus récentes, assez inattendues, ont mis en évidence une activité anti-apoptotique de cette protéine. Ainsi, la surexpression de E2F1 peut induire l'expression de gènes de survie (Dimova and Dyson, 2005). De plus, les résultats issus de l'inactivation ou de la surexpression de E2F1 dans des modèles murins suggèrent qu'elle exerce une activité anti-apoptotique dans les keratinocytes où l'on a induit une mort cellulaire par irradiation aux ultra-violets B (Berton, et al., 2005; Wikonkal, et al., 2003). Cette forme d'apoptose pourrait représenter un mécanisme important de protection de l'épiderme contre les mutations induites par l'exposition aux ultraviolets. De façon importante, d'autres expériences d'inactivation de E2F1 au cours du développement chez la drosophile démontrent également l'existence d'activités simultanées anti-apoptotiques et/ou pro-apoptotiques du facteur en fonction du type tissulaire envisagé (Dimova and Dyson, 2005; Moon, et al., 2005).

Ces données, en apparence contradictoires, réhaussent donc le caractère ambivalent de la protéine E2F1 qui ne peut être simplement classée comme pro- ou anti-apoptotique. Au contraire, les fonctions exercées par E2F1 sont complexes et dépendent bien du contexte tissulaire, cellulaire et du stimulus. Ainsi, dans un contexte de croissance normale ou en présence de facteurs de croissance, l'activation de E2F1 pourrait contribuer à la progression dans le cycle cellulaire plutôt qu'à la survenue de l'apoptose, sa capacité à activer des signaux anti-apoptotiques de survie contribuant à cet effet. Dans ce contexte, il a été montré que l'activité pro-apoptotique de E2F1 était neutralisée par activation de la voie de survie cellulaire Ras-PI3 Kinase (Hallstrom, et al., 2008; Hallstrom and Nevins, 2003). De façon intéressante, il a aussi été montré qu'E2F1 active AKT (Chaussepied and Ginsberg, 2004), suggérant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle anti-apoptotique initiée par E2F1. A l'inverse, l'activation anormale ou inappropriée de E2F1 en l'absence de signaux de croissance pourrait conduire à l'apoptose. L'importance de cette balance prolifération/apoptose contrôlée par E2F1 dans le maintien de l'homéostasie tissulaire est attestée par des données récentes montrant qu'une altération de cet équilibre coïncide avec un mauvais pronostic dans les cancers du sein et de l'ovaire (Hallstrom, et al., 2008).

II.2.4 E2F1 et Angiogénèse

La formation d'un système vasculaire est indispensable au développement embryonnaire chez les vertébrés et implique deux processus fondamentaux : (i) la vasculogénèse – définie comme la différenciation des cellules endothéliales progénitrices et leur assemblage dans des plexus capillaires primaires et (ii) l'angiogénèse – la formation de nouveaux capillaires issus des vaisseaux préexistants. Chez les individus adultes, les processus d'angiogénèse sont existants mais limités à certains tissus et processus physiologiques. Par exemple, l'angiogénèse est nécessaire au développement du placenta au cours de la grossesse, à la croissance et la réparation tissulaires, à la croissance musculaire et aux cycles menstruels chez la femme. Cependant, l'angiogénèse joue aussi un rôle important dans certains processus pathologiques incluant les cancers.

Parmi les six propriétés essentielles qui vont transformer une cellule épithéliale normale en cellule tumorale selon le modèle général de la carcinogénèse proposé par Hanahan et Weinberg se trouve la capacité de la cellule tumorale à induire un réseau de néovaisseaux ou néoangiogénèse (Hanahan and Weinberg, 2000). Ainsi, la progression tumorale de quelques cellules cancéreuses vers la formation d'une tumeur solide nécessite le développement et la croissance de plusieurs centaines de vaisseaux qui vont nourrir la tumeur.

La prédominance de l'angiogénèse au cours de la progression des cancers et son rôle relativement limité dans les processus physiologiques normaux ont motivé ces dernières années la recherche de nouvelles thérapies ciblant le réseau vasculaire nourrissant les tumeurs. L'utilisation de ces facteurs anti-angiogéniques dans des modèles expérimentaux de tumeurs solides mais aussi dans le cadre d'essais cliniques chez l'homme ont confirmé l'efficacité de la thérapie anti-angiogénique sur la croissance et la dissémination tumorales.

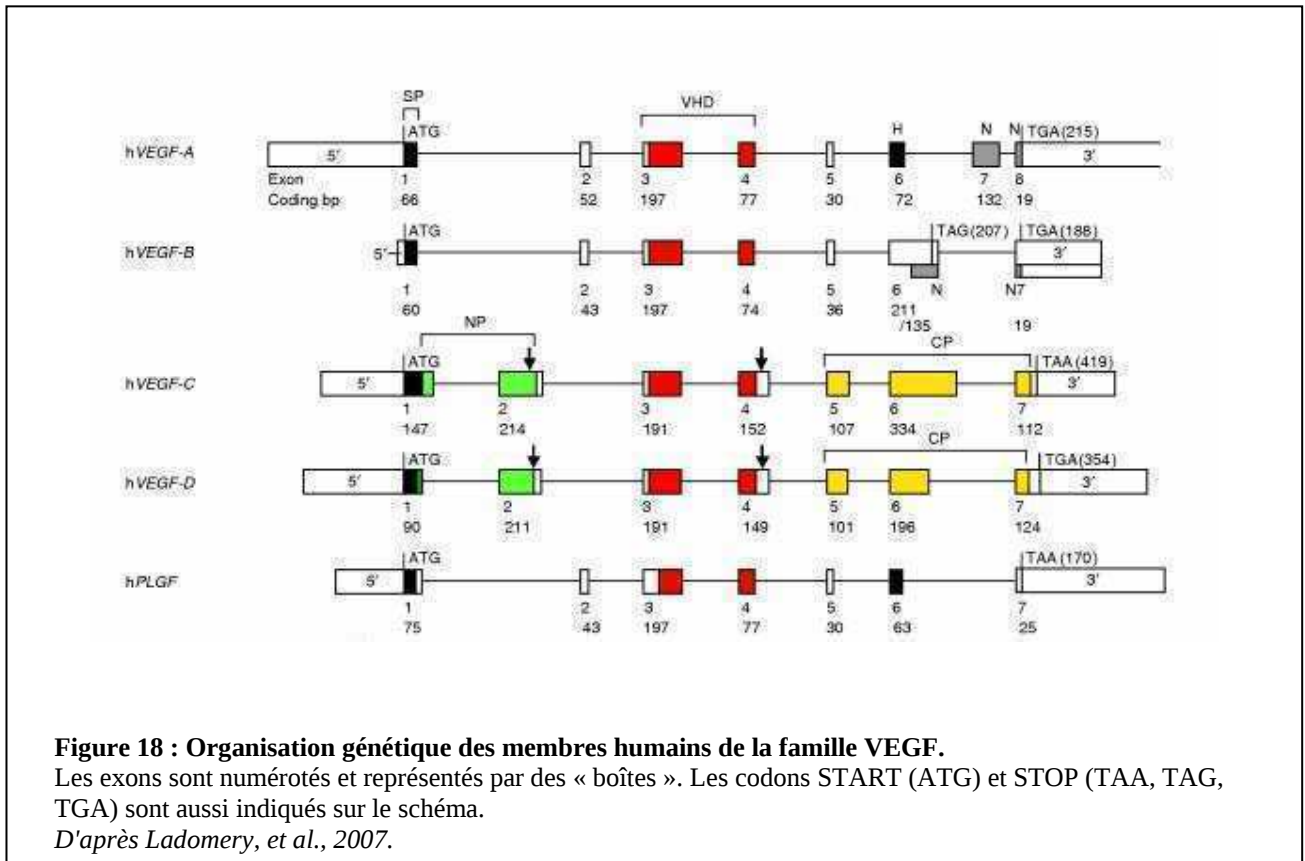
II.2.4.1 La famille VEGF

La formation des nouveaux vaisseaux est un processus très complexe impliquant environ 50 facteurs de croissance différents, récepteurs, cytokines et enzymes. Parmi eux, se trouvent les membres de la famille des protéines VEGF, angiopoietine et éphrine. Ces facteurs agissent sur les cellules endothéliales du système sanguin et lymphatique en formant une microvascularisation fonctionnelle.

Depuis sa découverte (Senger, et al., 1983) et le clonage de son gène en 1989 (Keck, et al., 1989; Leung, et al., 1989), le VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor*) connu comme VEGF (ou facteur de perméabilité) a été décrit comme le régulateur le plus important de la formation des vaisseaux sanguins dans des conditions physiologiques normales ou pathologiques. C'est un facteur essentiel de la vasculogénèse et de l'angiogénèse embryonnaires, mais aussi le médiateur principal de la néo-vascularisation tumorale. Le rôle crucial du VEGF dans les cancers a été illustré par l'emploi dans des modèles tumoraux « *in vivo* » d'anticorps le neutralisant, qui préviennent la néovascularisation et inhibent la croissance tumorale et les métastases (Kim, et al., 1993). Le VEGF représente donc une cible de première importance pour le développement de médicaments contre le cancer, et un certain nombre d'entre eux font l'objet d'essais cliniques (Giancotti, 2007).

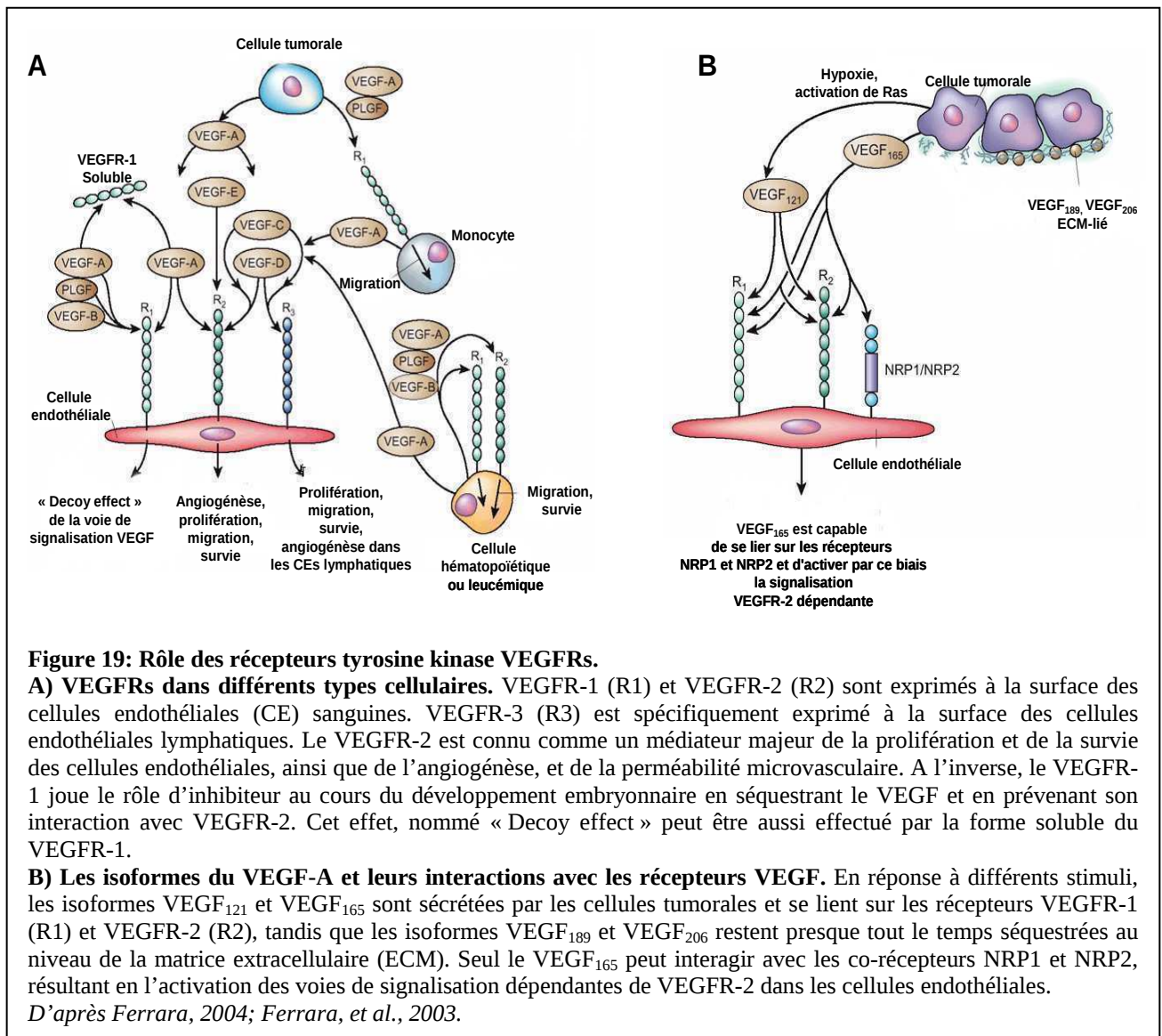
VEGF-A et les autres membres VEGF-B, VEGF-C VEGF-D (connu aussi comme (c-Fos Inducer Growth Factor) FIGF], PLGF (*Placental Growth Factor*) et le VEGF-Fs viral appartiennent à la sous-famille des « platelet-derived » facteurs de croissance de la superfamille des facteurs à domaine « cystine-knot ». Tous les membres de cette superfamille se caractérisent par la présence de huit résidus cystéine conservés formant la structure typique « cystine- knot » (deux cystéines liées par liaison S~S). Le groupe des VEGFs est lié dans l'évolution avec d'autres groupes de facteurs de la superfamille à domaine « cystine knot » dont les hormones glycoprotéiques, la famille des « mucin-like » protéines et la famille des protéines TGF- β (Transforming growth factor- β) (Holmes and Zachary, 2005) (**Figure 18**).

Les protéines VEGFs sont retrouvées dans toutes les espèces de vertébrés et sont très conservées au cours de l'évolution. Le VEGF-A est décrit chez les poissons (zebrafish *Danio rerio* et pufferfish *Fugu rubripes*), les grenouilles (*Xenopus laevis*) les oiseaux (*Gallus gallus*) et les mammifères. Chez la souris, l'expression du VEGF-A est clairement détectée au cours de l'embryogénèse. Son expression diminue quelques semaines après la naissance dans la plupart des tissus et est faible dans les organes adultes exceptés le plexus choroïde cérébral, les alvéoles pulmonaires, les glomérules rénaux ou le cœur. L'expression du VEGF-A est augmentée durant certains processus physiologiques (cicatrisation) ou pathologiques. Le VEGF-A est sécrété par divers types cellulaires, tels que les cellules vasculaires au niveau de l'aorte, les kératinocytes, les macrophages ou les cellules tumorales (Holmes and Zachary, 2005).



II.2.4.2 Fonctions biologiques et régulation des VEGFs

Les fonctions biologiques des VEGFs sont médiées par les récepteurs tyrosine kinase VEGFRs (Dumont, et al., 1998; Fong, et al., 1995; Shalaby, et al., 1995). VEGF-A se lie sur les récepteurs VEGFR-2 (nommé encore KDR/Flk-1) et VEGFR-1 (Flt-1). VEGF-C et VEGF-D se lient sur les récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3 (Flt4). PLGF et VEGF-B se lient uniquement sur le récepteur VEGFR-1 et VEGF-E sur VEGFR-2 (**Figure 19, A**). Dans certaines conditions, certaines isoformes des membres de la famille VEGF peuvent se lier sur des récepteurs dépourvus d'activité tyrosine kinase nommés neuropilines (NRPs) (Gluzman-Poltorak, et al., 2000; Soker, et al., 1998). En se liant à leurs récepteurs, les facteurs VEGFs contrôlent en conditions physiologiques divers processus tels que migration, prolifération ou survie des cellules endothéliales et sécrétion des protéases (**Figure 19**) (Ferrara, et al., 2003). Dans les cancers, les cellules tumorales en sécrétant le VEGF₁₆₅ notamment stimulent la prolifération des cellules endothéliales et la néo-angiogénèse tumorale. De plus, certaines cellules tumorales présentent à leur surface les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 et sécrètent du VEGF. Dans ce cas, une boucle autocrine est mise en jeu et la fixation du VEGF sur son récepteur engage alors une voie de migration et/ou de survie de la cellule tumorale (**Figure, 19, A**).



Le niveau d'oxygène a un rôle clé dans le contrôle de l'expression du VEGF (Shweiki, et al., 1992). L'ARNm du VEGF est induit en condition d'hypoxie dans un grand nombre de situations pathologiques. Dans ce contexte, HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1) est un médiateur clé de la réponse à l'hypoxie. Le gène du VEGF contient un domaine HRE de réponse à HIF-1 (Hypoxia Responsive Enhancer Element) au niveau de ses régions 5' et 3' UTR (Minchenko, et al., 1994). HIF-1 est un hétérodimère composé des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β , toutes les deux membres de la famille "basic helix-loop-helix-PAS" (Huang and Bunn, 2003). HIF-1 α est normalement très instable, mais en conditions hypoxiques cette protéine s'accumule par inhibition de sa dégradation par le protéasome. De plus, l'ARNm du VEGF-A est stabilisé dans des conditions pauvres en oxygène suite à la liaison sur son extrémité 3'UTR de facteurs encore non identifiés (Holmes and Zachary, 2005).

L'expression de l'ARNm du VEGF-A peut être aussi augmentée par certains facteurs de croissance dont les protéines TGF- α , TGF- β , keratinocyte growth factor, IGF-1 (Insulin-like Growth

Factor-1), FGF (Fibroblast Growth Factor) et PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), et il a été suggéré que la sécrétion paracrine ou autocrine de ces facteurs pourrait coopérer avec un état d'hypoxie locale pour réguler l'expression du VEGF (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Neufeld, et al., 1999). Dans certaines conditions d'inflammation, certaines cytokines comme IL-1 α (interleukin-1 α) et IL-6 induisent l'expression du VEGF dans différents types cellulaires (Neufeld, et al., 1999). Des événements spécifiques de la transformation cellulaire peuvent aussi induire l'expression du gène du VEGF. Des mutations oncogéniques ou l'amplification de Ras ou Myc peuvent conduire à l'augmentation de l'expression du VEGF. Ainsi, des données existent concernant une expression du VEGF dépendante des mutations de Ras qui contribuerait à la progression et à la croissance tumorale « *in vivo* » (Grugel, et al., 1995; Okada, et al., 1998).

II.2.4.3 Les isoformes VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b

La structure génique des VEGFs humains se caractérise par sept exons fortement conservés, sauf le VEGF-A qui possède huit exons (**Figure 20, A**). VEGF-A existe sous la forme de multiples isoformes protéiques résultat de l'épissage alternatif de son ARNm pré-messager (Ladomery, et al., 2007). Ces isoformes sont dénommées de façon générique VEGF_{xxx} et chaque transcrit est nommé en accord avec le nombre d'acides aminés inclus dans le monomère. Les isoformes VEGF_{xxx} incluent les VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆. (**Figure 20, A**). Bien que le rôle spécifique de ces différentes isoformes n'ait pas été élucidé, certaines études ont suggéré des rôles distincts mais coordonnés de chacune d'entre elles en fonction du tissu envisagé (Grunstein, et al., 2000). Par exemple, une surexpression préférentielle de l'isoforme VEGF₁₈₉ a été rapportée dans les tumeurs pulmonaires (Nishi, et al., 2005; Oshika, et al., 1998).

Récemment, une nouvelle famille d'isoformes du VEGF a été identifiée (Bates, et al., 2002) (**Figure 20, A**). Ces isoformes dénommées VEGF_{xxx}b possèdent 94-98% d'homologie avec les isoformes VEGF_{xxx} et découlent de l'utilisation d'un site d'épissage alternatif en 3' au niveau du dernier exon (**Figure 20, B**). Ainsi, les isoformes VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b ont la même longueur mais possèdent 6 acides aminés différents au niveau de leur extrémité C-terminale, impliquant possiblement une modification de la structure tertiaire puisque le pont disulfure final est perdu. La queue C-terminale basique comprenant deux arginine est aussi remplacée par des résidus acides.

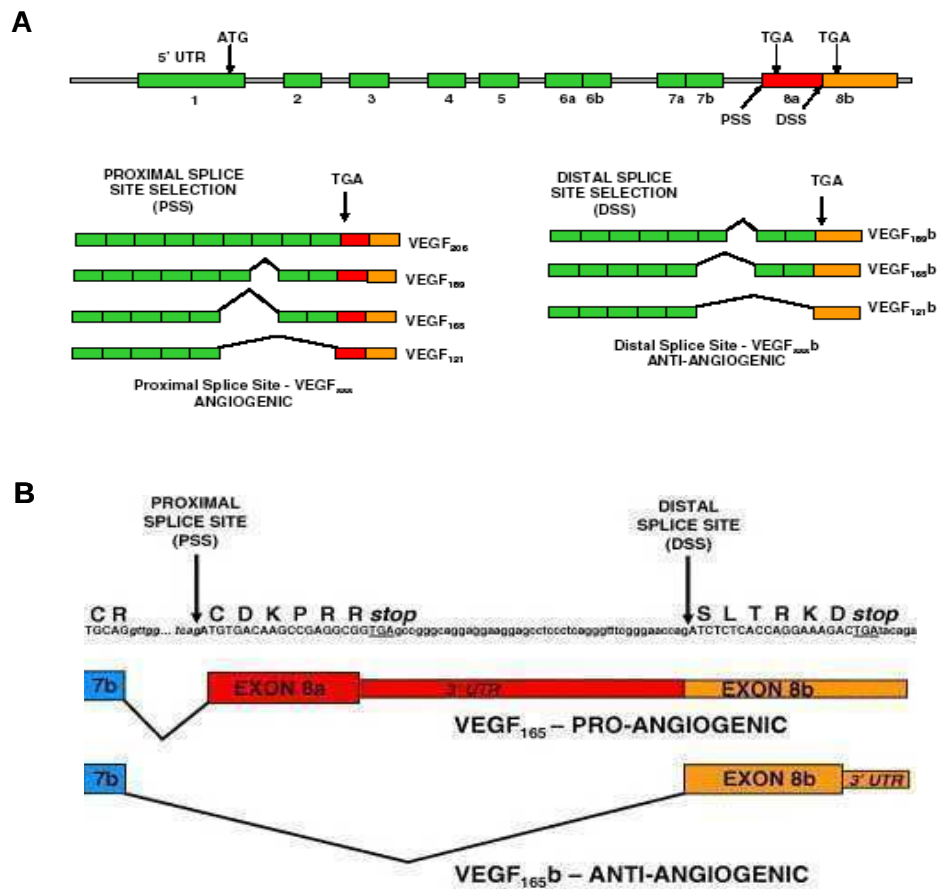


Figure 20: Structure C-terminale du gène du VEGF.

(A) Structure exonique du gène VEGF. Le gène du VEGF comprend 8 exons. Toutes les isoformes actuellement décrites contiennent les exons 1-5 et 8. Le choix d'un site d'épissage alternatif en 3' au niveau de l'exon 8 terminal soit proximal (PSS) ou distal (DSS) conduit à la synthèse de 2 familles de variants du VEGF à activité angiogénique opposée.

(B) Conséquence de l'épissage alternatif du VEGF-A sur la structure de l'ARNm. La sélection d'un site accepteur 3' alternatif situé 66 paires de bases en aval du début de l'exon 8 (distal splice site) induit la synthèse d'un transcrit codant pour les isoformes VEGF_{xxx}b dont les 6 acides aminés C-terminaux diffèrent d'avec les isoformes VEGF_{xxx}. Cette différence ne modifie ni la capacité de liaison aux récepteurs, ni la dimérisation mais modifie la capacité d'activation du récepteur.

D'après Ladomery, et al., 2007.

Il a été montré que les isoformes VEGF_{xxx}b forment environ 50% du "pool" des protéines VEGF dans les tissus normaux et non angiogéniques comme le poumon, le colon ou la peau et l'isoforme VEGF₁₆₅b semble être l'isoforme la plus exprimée. Sur le plan fonctionnel, les formes VEGF_{xxx}b sont anti-angiogéniques. Ainsi, VEGF₁₆₅b se lie au récepteur VEGFR2 avec la même affinité que le VEGF₁₆₅ mais ne stimule pas la phosphorylation du résidu Tyrosine-1052 du VEGFR2, ne lie pas le co-récepteur NRP1, et inhibe donc fortement la signalisation via VEGFR2 (Kawamura, et al., 2008; Woolard, et al., 2004). De plus, des essais « *in vitro* » de prolifération et de migration des cellules endothéliales, des études « *ex vivo* » sur vaisseaux isolés, et des modèles « *in vivo* » de croissance tumorale ont montré que le VEGF₁₆₅b inhibe activement toutes les réponses angiogéniques médiées par le VEGF₁₆₅ (Harper and Bates, 2008). De façon importante, et en accord avec un rôle potentiel de cette balance VEGF₁₆₅/VEGF₁₆₅b au cours du développement tumoral, il a été montré qu'à l'inverse des isoformes VEGF_{xxx} surexprimées dans les tumeurs, l'expression du VEGF₁₆₅b est diminuée dans les carcinomes rénaux (Bates, et al., 2002), colorectaux ou prostatiques (Ladomery, et al., 2007). De plus, la perte du VEGF₁₆₅b est associée au potentiel métastatique des mélanomes (Pritchard-Jones, et al., 2007). Enfin, il a été récemment montré que la surexpression spécifique de l'isoforme VEGF₁₆₅b inhibe la croissance de carcinomes prostatiques ou rénaux implantés en sous cutané chez la souris nude (Rennel, et al., 2008; Woolard, et al., 2004), ainsi que prévient la réponse de tumeurs colorectales implantées en sous-cutané chez la souris au bevacizumab (Avastin®) (Varey, et al., 2008). Ainsi, une rupture de l'équilibre entre les formes angiogéniques et anti-angiogéniques apparaît possiblement impliquée dans le développement des cancers, mais aussi la réponse des cellules tumorales aux thérapies anti-angiogéniques.

De façon surprenante, et malgré le rôle que pourraient jouer les facteurs protéiques contrôlant ce "switch" d'épissage du VEGF pro-angiogénique versus anti-angiogénique au cours de la carcinogénèse, très peu de données existent concernant les protéines susceptibles de contrôler ce processus, ni même sur le statut de ces différentes isoformes dans les tumeurs humaines. Seulement trois études ont été publiées sur des molécules impliquées dans le contrôle de l'épissage alternatif des transcrits VEGF_{xxx} (Cohen, et al., 2005; Dowhan, et al., 2005; Li, et al., 2004). Ainsi, dans les podocytes, Cohen et collaborateurs ont identifié la protéine SLM-2 (Sam68-like mammalian protein-2) comme un régulateur potentiel de l'épissage alternatif des transcrits du VEGF. Leurs résultats démontrent que la neutralisation de la protéine SLM-2 diminue l'expression de la forme VEGF₁₆₅ et que "*in vivo*" l'expression de SLM-2 dans les glomérules rénaux corrèle avec le niveau d'expression du VEGF₁₆₅ (Cohen, et al., 2005). Deux membres de la famille des protéines U2AF⁶⁵, CAPER α et CAPER β , ont été aussi proposés comme co-régulateurs de l'épissage du VEGF. Dans des lignées cellulaires T47D, la neutralisation de la protéine CAPER α change d'une manière significative le ratio des ARNm de VEGF₁₂₁/VEGF₁₈₉ (Dowhan, et al., 2005). Une autre étude propose le canal chloride pICln comme un facteur capable d'altérer l'épissage de gène du VEGF (Li, et al., 2004). Cependant, aucune étude n'a encore identifié des facteurs protéiques

contrôlant l'expression des isoformes VEGF_{xxx}b versus VEGF_{xxx} dans les cellules tumorales. De façon importante, une étude récente réalisée dans les cellules primaires épithéliales a identifié les facteurs d'épissage de la famille SR comme des régulateurs potentiels du switch VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b (Nowak, et al., 2008).

II.2.4.4 E2F1 et angiogénèse

En 2006, les travaux de deux équipes ont impliqué la protéine E2F1 dans le contrôle des processus angiogéniques. Qin et collaborateurs ont montré dans des souris knock-out pour E2F1 l'existence d'une angiogénèse accrue en condition d'hypoxie, corrélée à une augmentation significative de l'expression de l'ARNm du VEGF-A comparativement aux souris sauvages. Dans des conditions d'hypoxie, E2F1 réprime l'activité du promoteur du VEGF, par un mécanisme dépendant de p53 (Qin, et al., 2006). Cette même équipe a caractérisé des sites spécifiques de liaison à E2F1 situés à proximité des sites Sp-1 sur le promoteur du VEGF. Dans une autre étude, le récepteur NRP1 (neuropiline 1) a été identifié comme une cible transcriptionnelle directe de E2F1 (Jiang, et al., 2007). Ces données connectent E2F1 et le contrôle du processus angiogénique, via une régulation du VEGF notamment.

II.3 Rôle ambigu de E2F1 au cours de la tumorigénèse

Le rôle de certains membres E2Fs, dont E2F1, dans le processus de tumorigénèse a été initialement suggéré par les données issues de modèles "*in vitro*" montrant dans des tests de transformation de cellules en culture son pouvoir oncogénique (Johnson, et al., 1994; Singh, et al., 1994; Xu, et al., 1995). Au cours de cette dernière décennie, le développement de modèles de souris transgéniques a permis de confirmer la place importante de E2F1 dans ce processus, mettant en évidence des activités opposées de E2F1, oncogénique ou suppressive de tumeur.

II.3.1 Propriétés oncogéniques de E2F1

Le modèle murin de tumorigénèse cutanée a été souvent utilisé pour l'étude des fonctions de E2F1 "*in vivo*". Il consiste en la surexpression spécifique de E2F1 dans les cellules des couches basales de l'épiderme et autres muqueuses malpighiennes sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la Keratine 5 (K5-E2F1). De façon importante, l'expression du transgène K5-E2F1 résulte en une hyperplasie épidermique, une prolifération et une apoptose accrues des cellules basales de l'épiderme (Pierce, et al., 1998a). Ces souris développent tardivement mais spontanément des tumeurs cutanées (Pierce, et al., 1999b). Dans ce même modèle, E2F1 entraîne, en coopération avec l'oncogène v-Ha-ras, l'apparition de tumeurs plus précoces mais non invasives (Pierce, et al., 1998a). Chez ces souris transgéniques K5 E2F1, le développement tumoral est plus rapide et les tumeurs plus agressives lorsque p53 est inactivée, même partiellement (Pierce, et al., 1998b). Un autre modèle de la capacité oncogénique de E2F1 a été établi au cours de la tumorigénèse hépatique. L'expression d'un haut niveau de E2F1 sous le contrôle d'un promoteur de l'albumine dans les hépatocytes conduit à la formation de tumeurs hépatiques, possiblement en coopération avec le proto-oncogène c-Myc (Conner, et al., 2000). En outre, l'inactivation de E2F1 chez les souris hétérozygotes pour Rb (Rb^{+/-}) diminue nettement la fréquence des tumeurs thyroïdiennes et hypophysaires (Yamasaki, et al., 1998). Ces constatations plaident en faveur d'un rôle oncogénique de E2F1 et d'un effet protecteur de l'interaction E2F1/RB dans le contrôle préventif de l'activité oncogénique de E2F1. Par quels mécanismes?

Un des premiers mécanismes est sans doute la capacité de E2F1 à stimuler la prolifération cellulaire en induisant l'expression de gènes régulant la progression dans le cycle cellulaire et la réplication de l'ADN. Cependant, bien que l'expression transgénique de E2F1 et E2F4 entraîne des niveaux similaires de prolifération cellulaire et d'hyperplasie tissulaire, seules les souris transgéniques E2F1 développent des tumeurs spontanées (Wang, et al., 2000). Il est donc probable que d'autres fonctions plus spécifiques à E2F1 contribuent à son activité oncogénique. Dans ce contexte, la capacité

de E2F1 à inhiber la différenciation cellulaire (Dicker, et al., 2000; Scheijen, et al., 2003), à inhiber l'apoptose (Berton, et al., 2005; Wikonkal, et al., 2003) ou à créer une instabilité génétique (Pickering and Kowalik, 2006) pourrait contribuer à ses fonctions oncogéniques. De façon intéressante, une dérégulation de E2F1 pourrait aussi contribuer à l'aneuploïdie caractéristique des cellules tumorales puisque la surexpression chez la souris de Mad 2, une cible de E2F1 régulant le processus de ségrégation des chromosomes, génère une instabilité chromosomique et l'apparition de tumeurs variées, parmi lesquelles des tumeurs pulmonaires (Pickering and Kowalik, 2006; Sotillo, et al., 2007).

II.3.2 Propriétés suppressives de tumeur de E2F1

De façon concordante avec ses activités ambivalentes « *in vitro* », E2F1 a également démontré des propriétés suppressives de tumeur dans des modèles murins. L'inactivation de E2F1 chez la souris (Field, et al., 1996; Yamasaki, et al., 1996) conduit à des phénotypes variés en fonction du type de souches de souris utilisées. Field et coll. rapportent une résistance à l'apoptose des thymocytes et une croissance thymique nettement majorée chez les animaux jeunes, allant de pair avec l'apparition des thymomes et des lymphomes chez les souris plus âgées (Field, et al., 1996). L'équipe de Yamasaki et coll. décrit la formation de tumeurs variées dix fois plus fréquentes chez les souris *E2F1*^{-/-} que chez les souris sauvages incluant des sarcomes de l'appareil génital pour 33% des cas, des adénocarcinomes pulmonaires pour 20% des cas, des syndromes lymphoprolifératifs pour 16% des cas et des lymphomes pour 8% des cas (Yamasaki, et al., 1996). Les animaux *E2F1*^{+/-} développent aussi des tumeurs plus fréquentes que la population contrôle. Ces données apportent donc de solides arguments en faveur d'un rôle suppresseur de tumeur exercé par E2F1, avec une spécificité tissulaire. Les mécanismes par lesquels E2F1 exercerait ses fonctions suppressives de tumeur pourraient inclure sa capacité à induire l'apoptose, à stimuler l'entrée des cellules en sénescence prématurée (Russell, et al., 2006), à jouer un rôle au cours des processus de réparation de l'ADN ou à inhiber l'angiogénèse. L'importance de l'équilibre de la balance prolifération/apoptose contrôlée par E2F1 au cours du processus tumoral est attestée par des données récentes démontrant une corrélation entre la présence d'un programme apoptotique médié par E2F1 et un bon pronostic dans les cancers du sein et de l'ovaire (Hallstrom, et al., 2008).

II.3.3 L'expression de E2F1 est altérée dans les tumeurs humaines

Malgré un nombre croissant d'études suggérant une activité suppressive de tumeur de la protéine E2F1, des mutations inactivatrices du gène n'ont toujours pas été rapportées dans les tumeurs humaines à ce jour. Par contre, une amplification du nombre de copies du gène a été rapportée dans les métastases ganglionnaires de mélanomes (Nelson, et al., 2006) et dans de rares cas de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (Gorgoulis, et al., 2002) associant l'activité anormale de E2F1 au développement de tumeur hautement malignes. Un grand nombre d'études a révélé une altération de l'expression protéique de E2F1 dans différents types de tumeurs malignes mais de manière intéressante et en accord avec ses propriétés ambivalentes, l'expression protéique de E2F1 peut soit être augmentée, soit diminuée en fonction du type tumoral considéré (Zacharatos, et al., 2004). Ainsi, la protéine E2F1 est indétectable dans les cellules carcinomateuses prostatiques par rapport aux cellules du parenchyme prostatique normal. Au contraire, des hauts niveaux d'expression de E2F1 sont observés dans les carcinomes mammaires, coliques (Bramis, et al., 2004; Zacharatos, et al., 2004), œsophagiens (Ebihara, et al., 2004) ou dans les glioblastomes (Alonso, et al., 2005), comparativement au tissu normal.

Sur le plan pronostique, une association entre une surexpression de E2F1 et un mauvais pronostic a été décrite dans les carcinomes malpighiens œsophagiens (Ebihara, et al., 2004) et les tumeurs stromales gastro-pancréatiques (Yamazaki, et al., 2003). A l'inverse, un niveau faible de E2F1 corrèle avec la progression tumorale et un mauvais pronostic dans les adénocarcinomes coliques (Bramis, et al., 2004), les carcinomes de la langue (Kwong, et al., 2003), de la vessie (Rabbani, et al., 1999), mais aussi dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (Moller, et al., 2000).

Dans les cancers bronchiques, nous avons décrit une expression différentielle de E2F1 en fonction du type histologique considéré (Eymin, et al., 2001). Ainsi, une forte surexpression de la protéine E2F1 a été décrite dans 90% des CPC, tandis que la protéine reste faiblement exprimée ou quasi indétectable dans 90% des adénocarcinomes pulmonaires et dans 82% des carcinomes malpighiens en comparaison avec le tissu pulmonaire normal. Dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules, la surexpression de E2F1 apparaît tantôt comme un facteur de mauvais pronostic (Gorgoulis, et al., 2002), tantôt sans signification (Volm, et al., 1998).

III EPISSAGE DES PRE- ARNm CHEZ LES EUCARYOTES

III.1 Généralités sur l'épissage

III.1.1 Définition de l'épissage

Chez les eucaryotes, les gènes nucléaires codant les protéines comportent pour la plupart des séquences codantes appelées exons, interrompues par des séquences non codantes et non traduites (car elles contiennent entre autre des séquences répétées ou des codons d'arrêt de la traduction) appelées introns qui doivent être éliminées. Des séquences introniques sont également présentes dans des gènes codant des ARN stables (ARN de transfert, ARN ribosomiques), dans des gènes d'organites cellulaires (chloroplastes, mitochondrie), ainsi que dans certains gènes bactériens, mais le mécanisme d'élimination de ces introns est différent de celui utilisé pour les gènes nucléaires codant des protéines.

Le processus d'élimination des séquences introniques au sein des transcrits de gènes nucléaires de protéines a lieu dans le noyau. Ce processus post-transcriptionnel est appelé épissage constitutif. Au cours de cette réaction d'épissage, les séquences introniques des ARN pré-messagers (pré-ARNm) sont éliminées et les séquences exoniques sont jointes les unes aux autres pour former l'ARN messager (ARNm) mature. Ces ARNm sont ensuite transportés dans le cytoplasme où ils sont traduits en protéines au niveau des ribosomes.

Chez les eucaryotes supérieurs, l'épissage est un phénomène majeur. La plupart des gènes contiennent un intron. De plus, les introns de ces organismes sont en général de grande taille par rapport à ceux d'organismes tels que les levures. Ainsi, chez l'homme, la taille moyenne d'un exon est de 75 à 150 nucléotides tandis que les introns font en moyenne 3500 nucléotides (Deutsch and Long, 1999) et cette taille peut aller jusqu'à 500 000 nucléotides (Rowen, et al., 2002). On peut donc imaginer le défi relevé par la machinerie d'épissage pour identifier les exons au sein du génome.

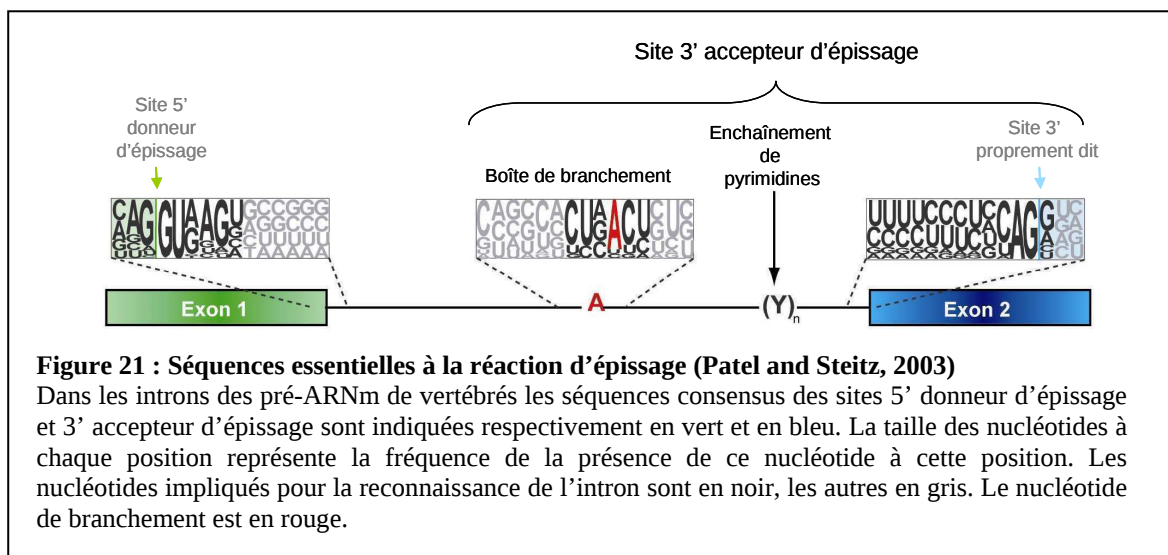
A côté de l'épissage constitutif éliminant les introns, il existe un second mode d'épissage dénommé alternatif. En effet, chez les vertébrés, les sites d'épissage sont généralement dégénérés par rapport aux séquences consensus. De ce fait, différentes séquences alternatives peuvent être utilisées en tant que sites d'épissage et plusieurs ARNm peuvent être produits à partir d'un seul gène. Ce processus est semblable à l'épissage constitutif et met en jeu les mêmes acteurs

moléculaires, mais dans ce cas des séquences exoniques peuvent aussi être excisées. Les eucaryotes supérieurs et les virus utilisent l'épissage alternatif pour accroître la capacité codante de leur génome. Chez l'homme, l'épissage alternatif concerne plus de 60 % des 30 000 gènes (Modrek and Lee, 2002) et sous-tend la diversité protéique. En effet, environ 80% des événements d'épissage alternatif ont pour conséquence de modifier la séquence codante conduisant à la production des protéines distinctes. L'épissage alternatif représente donc un moyen unique d'augmenter la diversité du protéome codé par un nombre limité de gènes. Au niveau physiologique, il participe au déroulement de programmes cellulaires multiples. En contrepartie, comme nous le verrons par la suite, il est aussi l'occasion de produire des transcrits aberrants aux conséquences pathologiques très diverses.

III.1.2 Mécanismes moléculaires de l'épissage

III.1.2.1 Séquences nécessaires à l'identification et l'élimination d'introns

Les introns renferment un ensemble de séquences conservées permettant leur reconnaissance par la machinerie d'épissage. Ces séquences conservées correspondent aux sites 5' donneur et 3' accepteur. A l'extrémité 5' de chaque intron se trouve une séquence consensus AG/GURAGU (R=purine et /= jonction intron/exon) appelée site 5' donneur d'épissage dans laquelle le dinucléotide GU en 5' de l'intron est le motif le plus conservé. La définition des sites 3' accepteurs d'épissage (situées à l'extrémité 3' de l'intron) est plus complexe. En effet, chez les vertébrés, ils renferment la boîte de branchement, une séquence polypyrimidine et le site 3' proprement dit. La boîte de branchement est située 18 à 400 nucléotides en amont des sites 3' d'épissage. La séquence consensus établie pour la boîte de branchement des introns de vertébrés est très dégénérée : YNYURAC (Y= pyrimidine) avec un résidu adénosine conservé et important pour la réaction d'épissage. La séquence polypyrimidine correspond à un enchaînement de 10 à 20 résidus pyrimidines, les résidus U étant plus favorable à sa fonction. Enfin, le site 3' d'épissage proprement dit se situe à la bordure intron/exon 3' et est caractérisé par une courte séquence conservée YAG/G (Y = U ou C) (Patel and Steitz, 2003) (**Figure 21**).

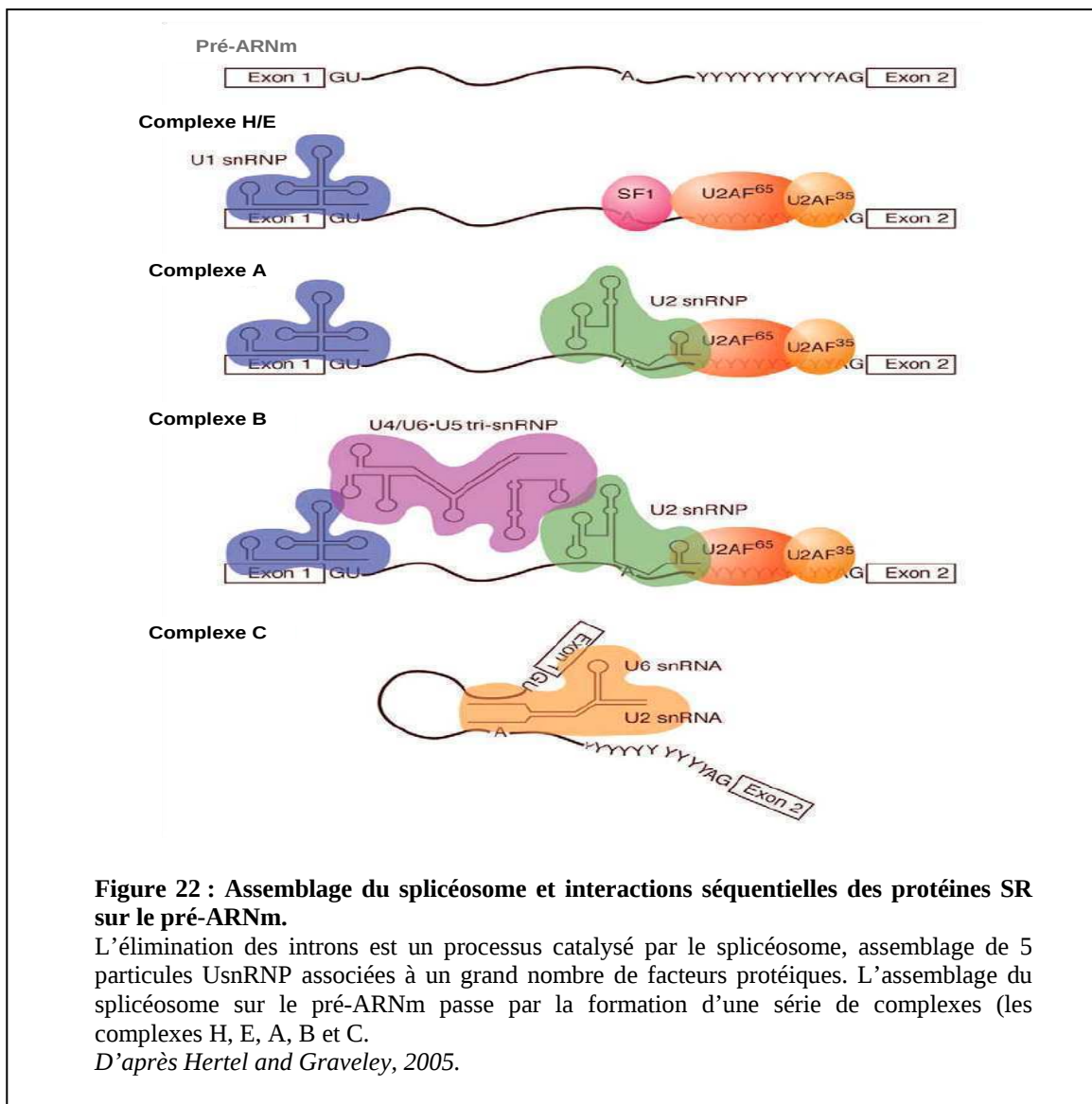


III.1.2.2 Assemblage des complexes splicéosomaux et facteurs protéiques participant à cet assemblage

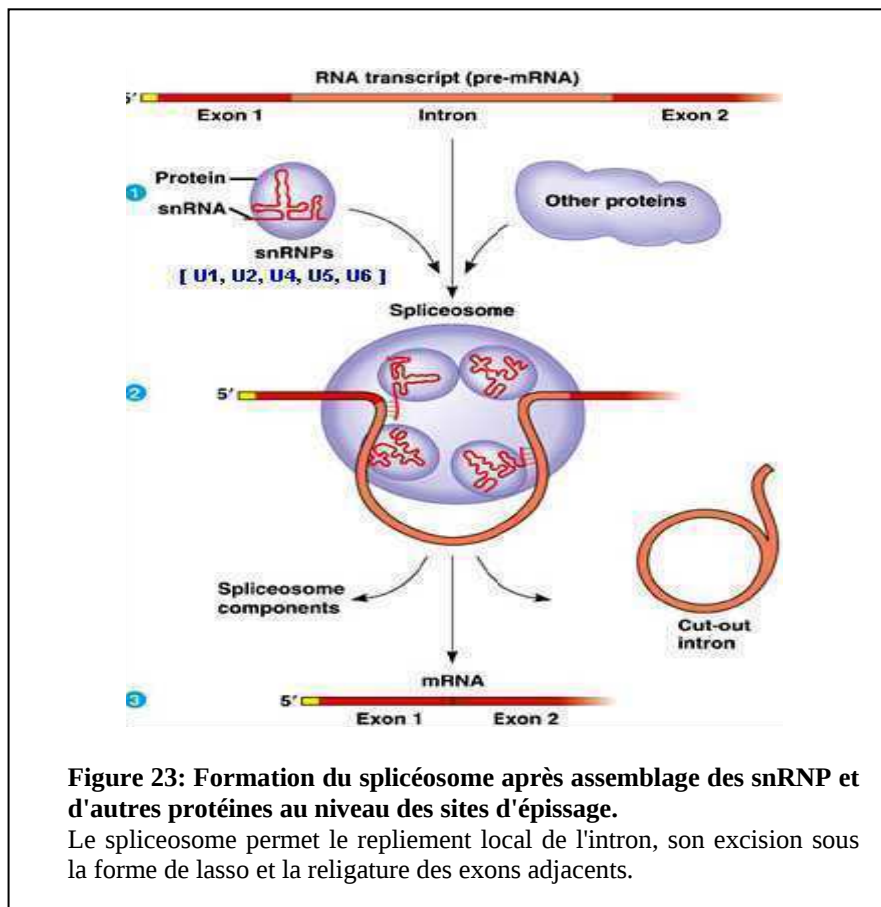
Au cours de l'épissage, l'élimination des introns est catalysée et régulée par un complexe macromoléculaire appelé splicéosome. Ce complexe comprend 5 particules ribonucléoprotéiques appelés UsnRNP (Uridine-rich Small Nuclear Ribonucleoparticle) et de nombreuses protéines non-snRNP. Les particules snRNP U1, U2, U4/U6, U5 sont 4 éléments majeurs pour la formation des complexes splicéosomaux. Chaque particule UsnRNP est constituée d'un ou plusieurs UsnRNA (Uridine-rich small nuclear ribonucleic acids), d'un ensemble de 7 protéines communes, les protéines Sm, et de plusieurs protéines spécifiques à chaque UsnRNP. Les UsnRNA sont des petits ARN (de 100 à 300 nucléotides) riches en résidus uridine dont la séquence et la structure 2D sont très conservées chez les eucaryotes (Branlant, et al., 1980; Branlant, et al., 1982; Branlant, et al., 1983; Krol, et al., 1981; Mougin, et al., 2002; Will and Luhrmann, 1997).

Ces dernières années, de nombreux progrès ont été faits dans l'identification des composants des complexes splicéosomaux. Récemment, des approches de protéomique ont permis de purifier certains de ces complexes et d'analyser leur contenu en protéines, y compris celles associées de manière transitoire (Hartmuth, et al., 2002; Jurica and Moore, 2003). Les complexes splicéosomaux s'assemblent autour de l'intron à éliminer de manière séquentielle. Chez les vertébrés, les premiers facteurs d'épissage s'associant au pré-ARNm ont pour rôle de reconnaître les sites donneurs et accepteurs d'épissage. Une fois ces sites définis, les autres facteurs d'épissage s'assemblent à leur tour sur le pré-ARNm.

Les études de l'assemblage des complexes splicéosomaux sur le pré-ARNm réalisées "*in vitro*" ont permis de mettre en évidence la formation de 5 complexes possédant une mobilité électrophorétique différente lorsqu'ils sont fractionnés par électrophorèse sur gel non dénaturant (Jurica and Moore, 2002) : les complexes H, E, A, B et C (**Figure 22**). Chacun de ces complexes correspond à l'assemblage ordonné de particules snRNP et de protéines non-snRNP. De nombreuses protéines splicéosomales n'appartenant pas aux particules UsnRNP participent également à l'assemblage des UsnRNP sur le pré-ARNm. Ces protéines sont soit associées de manière stable aux complexes splicéosomaux, soit de façon transitoire.

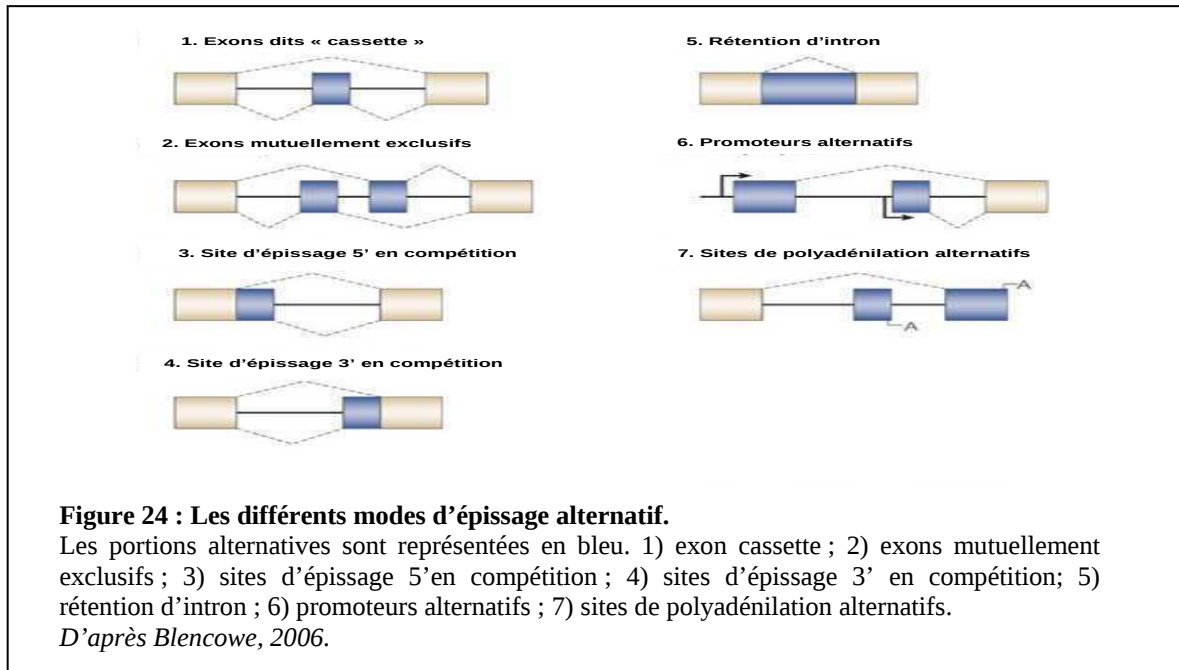


De façon très intéressante, l'assemblage se fait par étapes (**Figure 22**) et est initié par la fixation de la snRNP U1 en 5' (Michaud and Reed, 1991) permettant la formation d'un complexe précoce (complexe E) qui renferme les facteurs généraux d'épissage U2AF, mBBP/SF1 et des protéines SR. A cette étape, il y a un rapprochement spatial des sites accepteurs et donneurs d'épissage au niveau de l'intron à éliminer. Des données montrent que le réseau d'interactions ARN-ARN, ARN-protéines et protéine-protéine au sein du complexe E place les sites 5' et 3' d'épissage à une distance d'environ 10 à 20 Å (Kent and MacMillan, 2002). En présence d'ATP, le complexe E est converti en complexe A ou pré-splicéosome. Ce complexe est caractérisé par l'association stable de la particule snRNP U2 au niveau de la boîte de branchement. Enfin, l'incorporation de la tri-snRNP (U4/U6.U5) au sein des complexes pré-splicéosomaux suivis des changements conformationnels conduit à la formation des complexes catalytiques actifs B et C. Au cours de la formation de ces deux derniers complexes splicéosomaux, l'excision des sites terminaux de l'intron a lieu par deux réactions de transestérification où des liaisons ester sont rompues, puis reconstituées différemment, l'intron étant éliminé sous la forme d'un lasso tandis que les deux exons sont réunis puis libérés (**Figure 23**).



III.1.2.3 Les différents modes d'épissage alternatif

Parallèlement à l'épissage constitutif, des ARNm distincts peuvent être produits à partir d'un même gène par différents modes d'épissage. Il existe 5 types d'épissage alternatif décrits dans la littérature (**Figure 24**).



Les exons dit « cassette » sont soit inclus, soit exclus de l'ARNm mûre. Ils sont en général de petite taille et exprimés de manière tissu-spécifique (Brown and Cooper, 1996; Grabowski and Black, 2001). Dans ce cas, l'utilisation des sites 5' et 3' d'épissage correspondants est tissu-spécifique. Par exemple, le proto-oncogène c-SRC codant une tyrosine kinase subit un épissage tissu-spécifique. L'inclusion de l'exon N1 spécifiquement dans les neurones conduit à l'insertion de 6 acides aminés dans le domaine SH3 de la protéine kinase altérant sa capacité d'interaction avec les autres protéines (Brown and Cooper, 1996).

Les exons dits mutuellement exclusifs (Miki, et al., 1992; Smith and Nadal-Ginard, 1989) ne sont jamais présents ensemble dans les ARNm matures bien qu'ils aient des sites 5' et 3' fonctionnels. Par exemple, le pré-ARNm FGFR2 contient deux exons mutuellement exclusifs, qui sont appelés IIIb et IIIc chez la souris. La forme IIIb est capable de fixer les facteurs de croissance FGF7 et 10, ce que ne peut pas faire la forme FGFR2 IIIc (Miki, et al., 1992).

Sites d'épissage 5' et 3' alternatifs

Plusieurs sites d'épissage 5' et 3' alternatifs en compétition les uns avec les autres peuvent être présents dans une même séquence exonique (Akusjarvi and Stevenin, 2003; Purcell and Martin, 1993). La sélection d'un de ces sites conduit à des ARNm distincts codant des isoformes protéiques différentes.

La rétention d'intron

Un intron peut être inclus dans l'ARNm. Dans ce cas on parle de rétention d'intron. Cette rétention peut être tissu-spécifique. Par exemple, chez la drosophile, l'épissage du 3^{ème} intron de l'élément P produit une transposase dans les cellules germinales, alors que sa rétention dans les cellules somatiques conduit à la production d'une protéine qui réprime la transposition (Rio, 1988).

Promoteurs ou sites de polyadénylation alternatifs

Le choix des promoteurs transcriptionnels et des sites de polyadénylation influence l'identité des exons terminaux d'un ARNm. C'est le cas du transcrit primaire CT/CGRP commun à la calcitonine et au neuropeptide CGRP. Dans la thyroïde, l'utilisation des sites de polyadénylation de l'exon 4 conduit à la production de calcitonine, une hormone impliquée dans l'homéostasie du calcium, tandis que dans les neurones, le neuropeptide CGRP est produit par utilisation du site de polyadénylation de l'exon 6 (Lou and Gagel, 1998).

Plusieurs mécanismes d'épissage alternatif peuvent être combinés dans un même pré-ARNm. La production des variants d'épissage est régulée selon la nature des sites d'épissage et par la présence de séquences régulatrices. Le choix des sites d'épissage peut dépendre du type cellulaire, de l'état de différenciation de la cellule, de l'activation des voies de signalisation ou encore, du sexe de l'individu. Tous les pré-ARNm pouvant être épissés de manière alternative ont la caractéristique d'avoir des sites d'épissage faibles.

III.1.3 Régulation de l'épissage alternatif

L'épissage alternatif n'est pas le fait du hasard. Des études ont démontré que les patrons d'épissage d'un même gène varient au cours du développement, selon le tissu ou l'activité cellulaire. De plus, les données montrent que l'expression des isoformes d'un même gène peut varier en réponse par exemple à une stimulation par des facteurs de croissance (cytokines, hormones) ou la stimulation antigénique du TCR des lymphocytes T (Matter, et al., 2000; Weg-Remers, et al., 2001). Ces données prouvent que l'épissage alternatif est un mécanisme hautement régulé et que les signaux extracellulaires influencent l'apparition de tel ou tel transcrit. Cette régulation fait intervenir des séquences exoniques ou introniques régulatrices agissant en "*cis*" et des facteurs protéiques liant ces séquences agissant en "*trans*".

III.1.3.1 Des sites d'épissage sous-optimaux et des éléments de séquences régulatrices agissant en "*cis*"

Alors que les sites d'épissage forts utilisés constitutivement possèdent des séquences fortement similaires aux séquences consensus établies pour les sites 5' et 3' d'épissage, les sites d'épissage alternatifs ont souvent des séquences dégénérées par rapport aux séquences consensus. La force des sites 3' d'épissage dépend, en plus de la séquence du site 3' proprement dite, de la séquence polypyrimidine et de la séquence de branchement. Les sites 3' faibles ont souvent un enchaînement de pyrimidine entrecoupé de purines et/ou une séquence de branchement non canonique, parfois le nucléotide utilisé pour le branchement n'est même pas une adénosine. Ces caractéristiques rendent moins efficaces l'interaction des composants splicéosomaux avec les séquences aux jonctions exon-intron et intron-exon. Dans ce cas, l'assemblage des complexes splicéosomaux est guidé et facilité par des facteurs protéiques qui se fixent à des éléments régulateurs présents au niveau des exons et/ou des introns. Il existe deux types de séquences régulatrices: des séquences activatrices et inhibitrices. Les séquences exoniques ESE (Exonic Splicing Enhancer) sont les sites de liaison des protéines SR. Une fois fixées, celles-ci peuvent promouvoir la phase de définition de l'exon en recrutant la machinerie d'épissage par leur domaine RS. Les séquences introniques ISE (Intronic Splicing Enhancer) peuvent stimuler l'étape de définition de l'exon et activer des exons "faibles" ou cryptiques. A l'inverse, les séquences inhibitrices ESS (Exonic Splicing Silencer) et ISS (Intronic Splicing Silencer) inhibent la phase de définition de l'exon en recrutant des répresseurs de la famille des hnRNP aux sites d'épissage ou aux sites proximaux (**Figure 25**). D'une manière générale, la distribution des séquences

activatrices et inhibitrices varie en fonction des exons constitutifs, des exons alternatifs et des introns. En effet, dans les introns, on trouve une forte proportion de séquences inhibitrices tandis que dans les exons constitutifs on trouve une plus forte proportion de séquences activatrices. Par contre, dans les exons alternatifs, on trouve environ autant de séquences activatrices que de séquences inhibitrices (Blencowe, 2006).

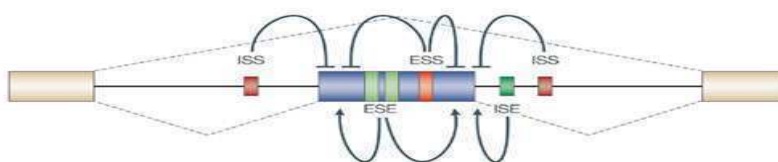


Figure 25 : Régulation de l'épissage alternatif par des éléments de séquences régulatrices.

L'épissage alternatif est régulé par l'existence au niveau du pré-ARNm de séquences régulatrices qui fixent des constituants du spliceosome. Ces séquences sont définies sur la base de leur localisation et leur activité comme ESEs et ESSs (Exonic Splicing Enhancer ou Silencer), et ISEs et ISSs (Intronic Splicing Enhancer ou Silencer). Les ESE ou ISE fixent des protéines de la famille SR qui vont activer les sites d'épissage les plus proches ou inhiber les ESS ou ISS, tandis que les ESS ou ISS répriment les sites d'épissage ou les séquences activatrices en fixant les protéines de la famille hnRNP. Le choix des exons alternatifs dépend de la balance entre ces éléments régulateurs sur le pré-ARNm et du ratio des protéines régulatrices interagissant avec eux.

D'après Blencowe, 2006.

III.1.3.2 Facteurs protéiques impliqués dans l'épissage et agissant en "trans"

Deux grandes familles protéiques jouent un rôle crucial dans la régulation de l'épissage et le choix des exons à épisser. Ce sont les protéines de la famille SR (Serine-Rich Arginine) et les protéines de la famille hnRNP (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein). Ces protéines influencent toutes de façon dépendante de leur concentration et/ou de leur activation, l'assemblage du spliceosome aux sites d'épissage, en interagissant avec d'autres facteurs d'épissage et/ou les séquences régulatrices présentes au niveau du pré-ARNm.

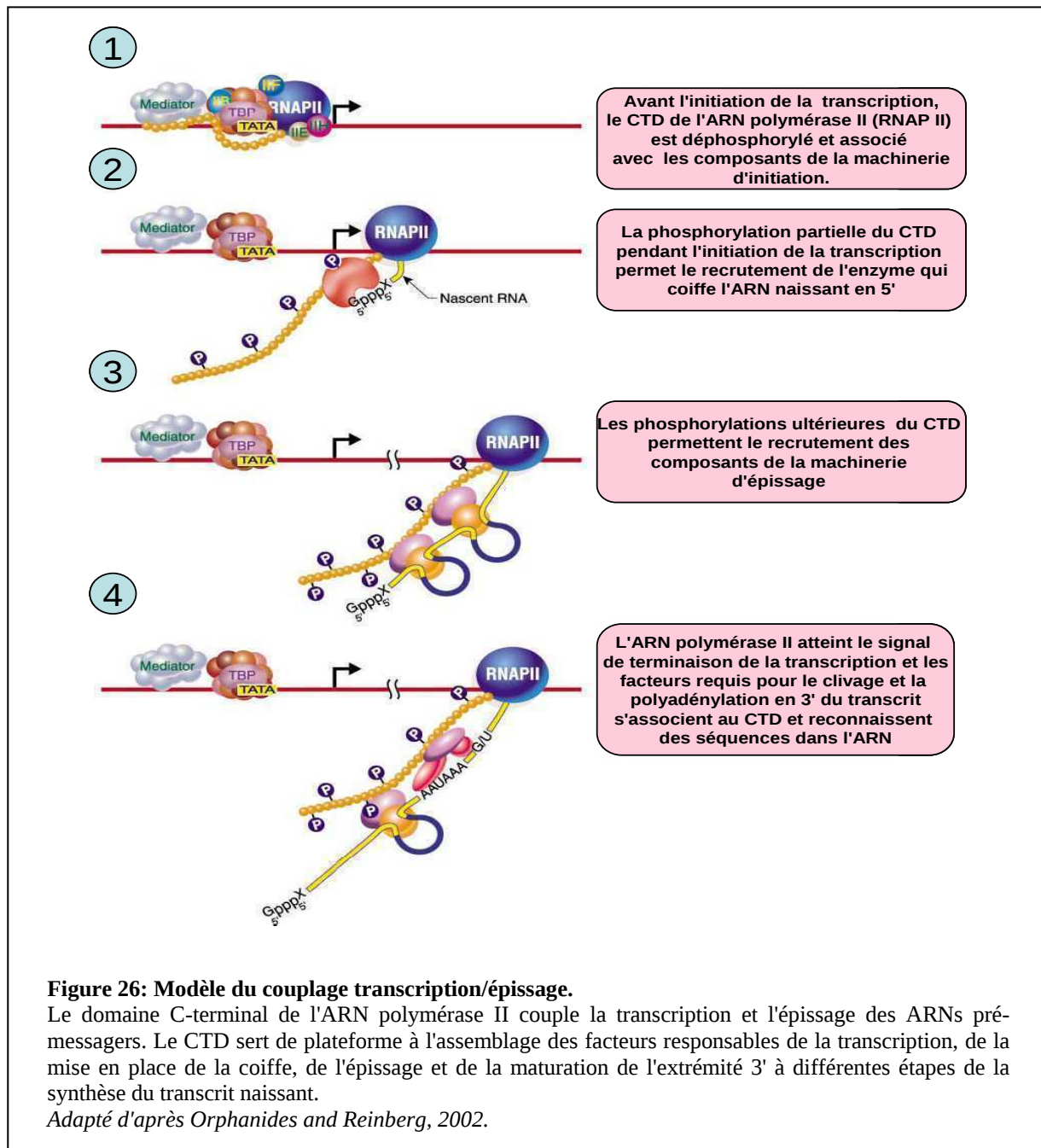
La famille des protéines hnRNP comprend plus de 25 protéines, découvertes d'abord dans des cellules HeLa, et nommées hnRNP A-U (Beyer, et al., 1977; Dreyfuss, et al., 1993). Dans cette famille, les protéines les plus représentées sont hnRNP A1, A2, B1, B2, C1 et C2. Elles sont très abondantes dans la cellule, jusqu'à 100 millions de copies par cellule (Dreyfuss, et al., 2002). Ces protéines contiennent un ou plusieurs domaines de fixation à l'ARN appelés domaines RRM (RNA Recognition Motif) ainsi que des domaines dits auxiliaires. Elles se lient à l'ARN, soit de manière peu spécifique, soit de manière séquence spécifique. Au sein du noyau, les protéines

hnRNP sont majoritairement localisées dans le nucléoplasme. Certaines sont capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, comme c'est le cas de la protéine hnRNP A1 (Pinol-Roma and Dreyfuss, 1992). Dès leur transcription, les ARN produits par l'ARN polymérase II sont associés avec un grand nombre de protéines hnRNP. Les protéines hnRNP sont donc présentes sur chaque transcrit de gène codant une protéine et peuvent intervenir indirectement sur la maturation des transcrits. Elles peuvent aussi agir de manière spécifique sur la régulation de l'épissage alternatif d'un pré-ARNm en se fixant avec une plus grande affinité sur les séquences régulatrices ESS et en réprimant l'épissage. La protéine hnRNP A1 est un régulateur négatif de l'utilisation des sites d'épissage, aussi bien 5' que 3' (Pozzoli and Sironi, 2005). Au niveau du site 5' d'épissage, de nombreuses recherches ont montré que la protéine hnRNP A1 est un antagoniste des activités des protéines SR (Caceres, et al., 1994; Mayeda, et al., 1993; Mayeda and Krainer, 1992; Yang, et al., 1994). La protéine hnRNP A1 est aussi capable de se fixer sur des séquences inhibitrices exoniques (ESS) et de réprimer l'utilisation du site 3' en amont, en empêchant l'assemblage des complexes spliceosomaux autour de ce site d'épissage (Caputi, et al., 1999; Del Gatto-Konczak, et al., 1999; Marchand, et al., 2002).

A côté de la famille des protéines hnRNP, la famille des protéines SR joue un rôle crucial dès les étapes précoces de l'assemblage des complexes spliceosomaux. Ces protéines se caractérisent par un ou deux domaines de fixation à l'ARN, de type RRM, et un domaine RS riche en résidus sérine et arginine. Les protéines SR sont essentielles à la définition des exons chez les eucaryotes supérieurs (Graveley, 2000). Elles sont aussi bien impliquées dans l'épissage constitutif que dans les régulations de l'épissage alternatif. Nous reviendrons dans un prochain chapitre sur cette famille de régulateurs cruciaux de l'épissage. D'autres protéines que les protéines SR présentent des domaines RS avec parfois des domaines RRM. Elles ont été classées dans la famille SRrp (SR related protein) également nommées protéines SR-like (Graveley, 2000). Certaines de ces protéines sont des facteurs d'épissage comme U2AF³⁵ et U2AF⁶⁵, d'autres sont des protéines de particules UsnRNP (U1-70K, U5-100K et (U4/U6.U5)-27K), d'autres enfin sont des protéines régulatrices de l'épissage (hTra2 α et hTra2 β) ou des protéines co-activatrices (SRm160 et SRm300). On trouve également dans cette famille des ARN hélicases (HPrp16, HRH1) et de manière intéressante, une famille de protéines kinases responsables de la phosphorylation du domaine RS des protéines SR (Clk/Sty 1, 2, 3).

III.1.4 Couplage entre transcription et épissage

Il est établi depuis quelques années que la transcription et l'épissage des ARN pré-messagers sont des événements cellulaires couplés dans le temps et dans l'espace (Bauren and Wieslander, 1994; Beyer and Osheim, 1988). De plus, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, des inter-relations ont aussi lieu avec des étapes ultérieures à l'épissage, comme le transport des ARN et la traduction. L'ARNm produit lors de la transcription est immédiatement pris en charge pour sa maturation; mise en place de la coiffe, épissage et polyadénylation, sont ainsi concomitants de la transcription. Le couplage transcription/épissage repose sur diverses observations. La première est que les acteurs régulant la transcription et l'épissage co-localisent à l'intérieur de la cellule. Ainsi, les facteurs d'épissage s'accumulent au sein de structures nucléaires appelées speckles (20 à 40 par noyau) (Huang and Spector, 1991; Zhang, et al., 1994) et les marquages des transcrits poly (A) avec un oligo (dT) marqué ou le marquage d'une sous-unité de l'ARN polymérase II ont montré leur localisation dans les speckles (Carter, et al., 1993; Carter, et al., 1991; Mortillaro, et al., 1996). De plus, plusieurs gènes se localisent à la périphérie ou à l'intérieur des speckles (Brown, et al., 2008; Huang and Spector, 1991; Jolly, et al., 1999; Lawrence, et al., 1993; Lawrence and Clemson, 2008). De façon intéressante, il a été récemment montré que cette localisation de gènes activement transcrits au sein des speckles dépendait aussi de l'environnement chromatinien suggérant un rôle des facteurs de remodelage de la chromatine dans les processus d'épissage (Brown, et al., 2008). En accord avec ces données, il a été montré que la trichostatine A (un inhibiteur de HDAC) affecte l'épissage (Nogues, et al., 2002), et que le complexe de remodelage SWI/SNF régule l'épissage de divers gènes, incluant la E-cadhérine, BIM, la cycline D1 ou CD44 (Batsche, et al., 2006). Cet effet met en jeu l'ARN polymérase II et son domaine C-terminal (CTD) qui agit comme une plateforme de recrutement de nombreux facteur d'épissage et joue un rôle crucial dans la coordination de la transcription, l'épissage et la polyadénylation (Bentley, 2005; Che, et al., 1997; Hirose and Manley, 1998; Listerman, et al., 2006; Misteli and Spector, 1999). Le domaine CTD de l'ARN polymérase II est constitué chez l'homme de 52 répétitions de 7 acides aminés contenant 3 résidus sérine (YSPTSPS). Un jeu de phosphorylation /déphosphorylation des résidus sérines des éléments des séquences répétées du domaine CTD ponctue les phases successives de son activité (Orphanides and Reinberg, 2002) (**Figure 26**).

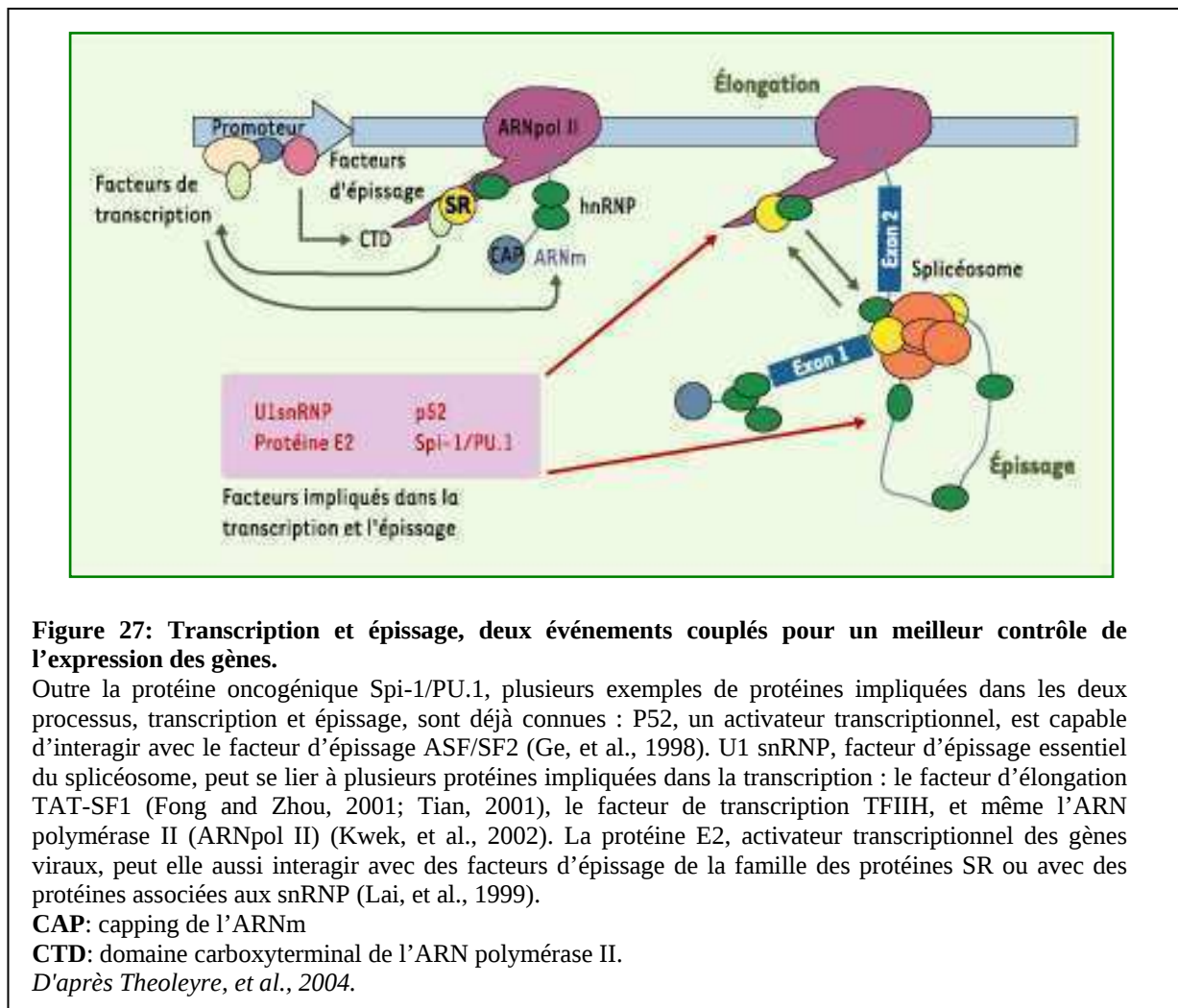


A la fin de l'initiation de la transcription, les sérines en position 5 de chaque répétition sont progressivement phosphorylées, ce qui conduit à la dissociation des facteurs d'initiation de la transcription et à l'association des enzymes synthétisant la coiffe. L'ARN en cours de synthèse a alors une longueur de 20 à 40 nucléotides. Des expériences d'épissage "*in vitro*" ont montré qu'en plus d'avoir une action protectrice de l'ARN, la présence de la coiffe augmente l'efficacité d'épissage (Proudfoot, et al., 2002). Les protéines fixées sur la coiffe interagiraient avec des facteurs d'épissage afin de faciliter la reconnaissance du premier exon (Lewis and Izaurralde, 1997; Maniatis and Reed, 2002; Proudfoot, et al., 2002). Pendant l'étape d'élongation, les sérines

en seconde position des répétitions sont à leur tour phosphorylées, ce qui provoque la dissociation des protéines de la coiffe et l'association des facteurs d'épissage. Par exemple, les protéines de la famille SR interagissent avec l'ARN polymérase II (Das, et al., 2007), de même que d'autres composants du spliceosome incluant PSF/p54nrb, U2AF, et une ou plus des 5 protéines snRNPs (U1, U2, U4, U5 et U6) (Corden and Patturajan, 1997; Emili, et al., 2002; Kameoka, et al., 2004; Mortillaro, et al., 1996). Ces interactions permettraient le positionnement des facteurs d'épissage en proximité étroite avec l'ARN naissant, et favoriserait un épissage co-transcriptionnel plus efficace. A côté de son rôle en tant que plateforme de recrutement, la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II joue également un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif (de la Mata, et al., 2003; Kadener, et al., 2002; Kornblihtt, 2005; Kornblihtt, 2006). Ainsi, une ARN polymérase II peu processive ou faisant des pauses internes au cours de l'élongation favoriserait l'inclusion d'exons alternatifs possédant des sites d'épissage sous-optimaux. Il a été montré que les changements dans la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II mettent en jeu des modifications de la phosphorylation de son domaine CTD (Batsche, et al., 2006; Kornblihtt, 2006). Ainsi, une étude récente a montré que le facteur d'épissage de la famille des protéines SR, SC35, régulait positivement l'étape d'élongation de la transcription au niveau de gènes spécifiques via une augmentation de la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II au niveau du second résidu sérine (Lin, et al., 2008). A l'inverse, il a été observé que le ralentissement de la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II au niveau du gène CD44 en réponse à l'expression de Brm, la sous-unité catalytique du complexe de remodelage SWI/SNF, s'accompagnait d'une accumulation de sa forme phosphorylée sur la sérine en position 5' du CTD (Batsche, et al., 2006). Finalement, une dernière observation en faveur du couplage entre transcription et épissage repose sur les résultats démontrant que l'épissage alternatif peut aussi être modifié par des variations dans la région du promoteur (Auboeuf, et al., 2002; Cramer, et al., 1999; Cramer, et al., 1997). Ces résultats indiquent que des facteurs de transcription pourraient aussi réguler l'épissage des transcrits. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que les co-régulateurs transcriptionnels de certains facteurs de transcription recrutés au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles étaient non seulement capables d'augmenter la quantité de transcrit, mais aussi de modifier la nature des variants d'épissage synthétisés par ces gènes (Auboeuf, et al., 2005; Auboeuf, et al., 2004a; Auboeuf, et al., 2004b; Auboeuf, et al., 2002). Dans certains cas, les effets sur l'épissage de ces co-régulateurs transcriptionnels sont dépendants du promoteur. De plus, certains facteurs de transcription interagissent directement avec des facteurs d'épissage (Davis, et al., 1998; Ge, et al., 1998; Hallier, et al., 1998) et modifient l'épissage tels que le facteur de transcription SP1/PU (Hallier, et al., 1998; Hallier, et al., 1996) qui contrôle l'épissage de façon dépendante de sa liaison

au promoteur de ses gènes cibles (Guillouf, et al., 2006). Enfin, il a été récemment montré que le facteur de transcription oncogénique EWS-FLi1 affectait le ratio des variants d'épissage de la cycline D1 en diminuant la vitesse d'élongation de l'ARN pol II au niveau de ce gène (Sanchez, et al., 2008).

L'ensemble de ces données confirme donc l'existence d'un couplage entre transcription et épissage et indique une inter-connexion étroite et fonctionnelle entre les protéines régulant la transcription, les facteurs de la transcription notamment, et celles contrôlant l'épissage (**Figure 27**).



III.2 Les protéines SR

Parmi toutes les protéines nécessaires à l'épissage, la famille des protéines SR joue un rôle crucial dès les étapes précoces d'assemblage des complexes splicéosomiaux. La dénomination de ces protéines est liée à la présence à leur extrémité C-terminale, d'un domaine riche en résidus Sérine (S) et Arginine (R): le domaine RS. Cette famille de facteurs d'épissage est particulièrement conservée chez les métazoaires et également chez les plantes (Graveley, 2000). Néanmoins, certains eucaryotes n'expriment pas de protéines SR, comme *S. cerevisiae* (Graveley, 2000). Elles sont essentielles à la définition des exons chez les eucaryotes supérieurs (Graveley, 2000). Ces protéines sont aussi bien impliquées dans l'épissage constitutif que dans les régulations de l'épissage alternatif, mais elles jouent aussi un rôle au cours des processus post-épissage.

Malgré leur expression ubiquitaire, des variations de l'expression des protéines SR sont observées selon les tissus considérés suggérant que le ratio entre les différentes protéines SR pourrait affecter l'épissage alternatif de façon tissu dépendante. Les protéines SR ont un rôle à jouer au cours du développement. Chez la drosophile, les protéines SF2/ASF et SC35 participent au développement du système oculaire (Gabut, et al., 2007). De plus, l'inactivation de SF2/ASF chez *C.Elegans* conduit à la mort embryonnaire (Longman, et al., 2000). Chez la souris, l'inactivation du gène SRp20 bloque le développement à un stade très précoce (Jumaa, et al., 1999) et l'inactivation de SC35 dans le thymus conduit à un défaut de maturation des cellules T, via la modification de l'épissage du récepteur CD45 (Wang, et al., 2001). De même, l'ablation tissu-spécifique de SC35 dans le cœur de souris transgéniques conduit à des hypertrophies cardiaques via la diminution de l'expression des récepteurs à canaux calciques cardiaques RyR2 (Ding, et al., 2004). Ces données corrélient avec des résultats liant expression de SC35 et dysfonctionnement cardiaque chez l'homme (Hein and Schmitt, 2003).

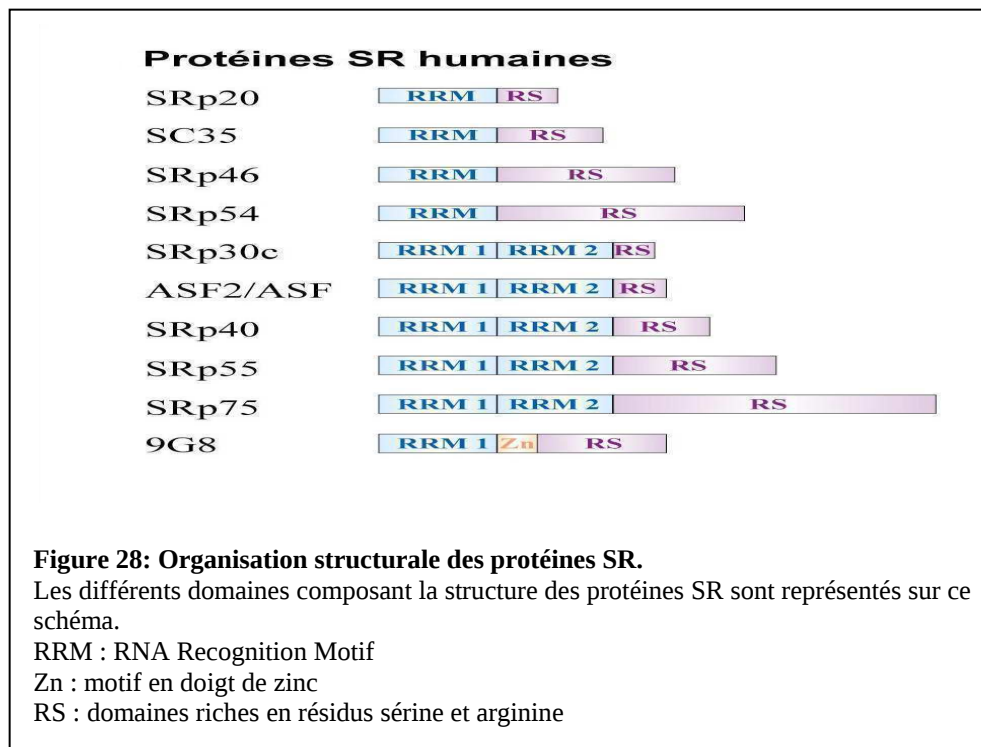
III.2.1 Présentation de la famille et caractéristiques structurales

A l'heure actuelle, dix protéines SR de poids moléculaire variant de 20 à 75kDa ont été identifiées. Ce sont ASF/SF2 (Ge, et al., 1991; Krainer, et al., 1991), SC35 ou SRp30b (Fu and Maniatis, 1992a; Fu and Maniatis, 1992b), SRp20 (Ayane, et al., 1991; Zahler, et al., 1993), SRp30c, SRp40, SRp55 (Screaton, et al., 1995), 9G8 (Cavaloc, et al., 1994), SRp75 (Zahler, et al., 1993), SRp54 (Chaudhary, et al., 1991; Zhang and Wu, 1996) et SRp46 (Soret, et al., 1998) (**Figure 28**).

Certaines protéines SR sont codées par des gènes essentiels. Chez la drosophile, la délétion du gène correspondant à la protéine humaine SRp55 entraîne une létalité dans la première ou deuxième étape de la vie larvaire (Ring and Lis, 1994). SC35 est également une protéine essentielle au développement. Chez *C. elegans*, l'inactivation des autres membres de la famille ne donne aucun phénotype. Ces résultats suggèrent une redondance fonctionnelle des protéines SR, mais elles pourraient aussi agir en alternance à différents stades de la vie cellulaire.

Sur le plan structural, les protéines SR ont une organisation modulaire caractéristique (**Figure 28**). Elles contiennent un ou deux motifs de reconnaissance et de fixation à l'ARN dénommés RRM (RNA Recognition Motif) en N-terminal, et un domaine riche en sérine et arginine (RS) en C-terminal. Le domaine RRM détermine la spécificité de liaison à l'ARN, tandis que le domaine RS fonctionne comme un module d'interaction protéine-protéine, mais est aussi capable d'interagir avec l'ARN (Hertel and Graveley, 2005; Shen, et al., 2004). De façon intéressante, le domaine RRM est interchangeable entre protéines SR (Chandler, et al., 1997; Mayeda, et al., 1999) et peut lier l'ARN en absence de domaine RS (Caceres and Krainer, 1993; Tacke and Manley, 1995). De même, le domaine RS est interchangeable (Chandler, et al., 1997).

Selon que leur domaine de fixation à l'ARN renferme respectivement un ou deux motifs RRM, les protéines SR sont sub-divisées en 2 sous-familles: (i) de type SC35 ou (ii) de type ASF/SF2 (**Figure 28**).



III.2.1.1 Le domaine RRM de fixation à l'ARN des protéines SR

Les domaines RRM (ou RBD, ou RNP) sont les motifs structuraux de fixation à l'ARN les plus fréquemment retrouvés chez l'homme et ils déterminent la spécificité de liaison à l'ARN des protéines qui les renferment. Ces domaines contiennent environ 90 acides aminés et sont caractérisés par 2 séquences signature, l'une constituée de 8 résidus, RNP-1 (RGFGFVxF) et l'autre constituée de 6 résidus, RNP-2 (LFVGNL). L'unique domaine RRM de SC35 ainsi que le domaine RRM1 d'ASF/SF2 portent chacun les deux séquences signature (**Figure 28**) et seraient capables de conférer une spécificité de sélection du site d'épissage (Dauksaite and Akusjarvi, 2004).

Les protéines SR reconnaissent un large éventail de séquences ARN mais toutes les protéines SR n'ont pas la même spécificité de fixation à l'ARN. Cela conduit à une activité différentielle de ces protéines dans la régulation de l'épissage alternatif (Tacke and Manley, 1999). Les premières données démontrant une spécificité des protéines SR viennent des études sur les protéines SC35 et ASF/SF2 mettant en évidence une différence significative des deux protéines dans leur capacité à se fixer sur le pré-ARNm (Fu, 1995). Des expériences de SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) ont permis ensuite d'établir des séquences ARN de haute affinité ou des ESEs-spécifiques pour beaucoup de protéines SR (Cavaloc, et al., 1999; Tacke, et al., 1997; Tacke and Manley, 1995; Tacke and Manley, 1999; Tuerk and Gold, 1990). Cependant, ces études ont aussi montré que ces ESEs spécifiques pour les protéines SR peuvent contenir des séquences dégénérées de faible affinité (Liu, et al., 1998). Parallèlement à leur capacité à lier l'ARN, des études structurales biochimiques récentes ont aussi montré que certains domaines RRM sont utilisés pour établir des interactions protéine-protéine (Maris, et al., 2005).

III.2.1.2 Le domaine RS des protéines SR

Le domaine C-terminal des protéines SR contient un grand nombre d'enchaînement de dipeptide RS (jusqu'à 80% dans le domaine de SC35). La longueur du domaine RS varie de 24 (SRp30c) à 316 résidus (SRp75). Il a été démontré que le domaine RS agit comme une plateforme d'interaction protéine-protéine. Ainsi, les protéines SR interagissent via leur domaine RS avec les domaines RS d'autres protéines SR, mais aussi d'autres facteurs de régulation d'épissage, tels que les protéines Tra et Tra 2 ou les composants de la machinerie d'épissage, comme U1-70K et U2AF³⁵ (Amrein, et al., 1994; Graveley, 2000; Kohtz, et al., 1994; Wu and Maniatis, 1993). Ces interactions via le domaine RS impliquent des arginines chargées positivement et des sérines

phosphorylées, indiquant clairement que la phosphorylation du domaine RS conditionne fortement les interactions des protéines SR avec leurs partenaires (voir aussi §4 de ce chapitre) et donc leur activité (Graveley, et al., 1998). Parallèlement, le degré de phosphorylation du domaine RS conditionne aussi la localisation sub-cellulaire des protéines SR, et notamment leur recrutement au niveau des sites actifs de transcription (Misteli, et al., 1998; Misteli and Spector, 1998). Le domaine RS est aussi impliqué dans le transport noyau-cytoplasme de certaines protéines SR (Caceres, et al., 1998), mais aussi dans la rétention nucléaire de la protéine SC35 (Cazalla, et al., 2002). Enfin, des données récentes ont montré que le domaine RS pouvait aussi interagir avec le pré-ARNm au niveau de la boîte de branchement (Hertel and Graveley, 2005; Shen, et al., 2004). Ce domaine RS est donc essentiel à l'activation des protéines SR tant par les interactions protéine-protéine et protéine-ARN qu'il engage, mais aussi par son effet sur la localisation sub-cellulaire de ces protéines.

III.2.2 Mécanismes d'action des protéines SR

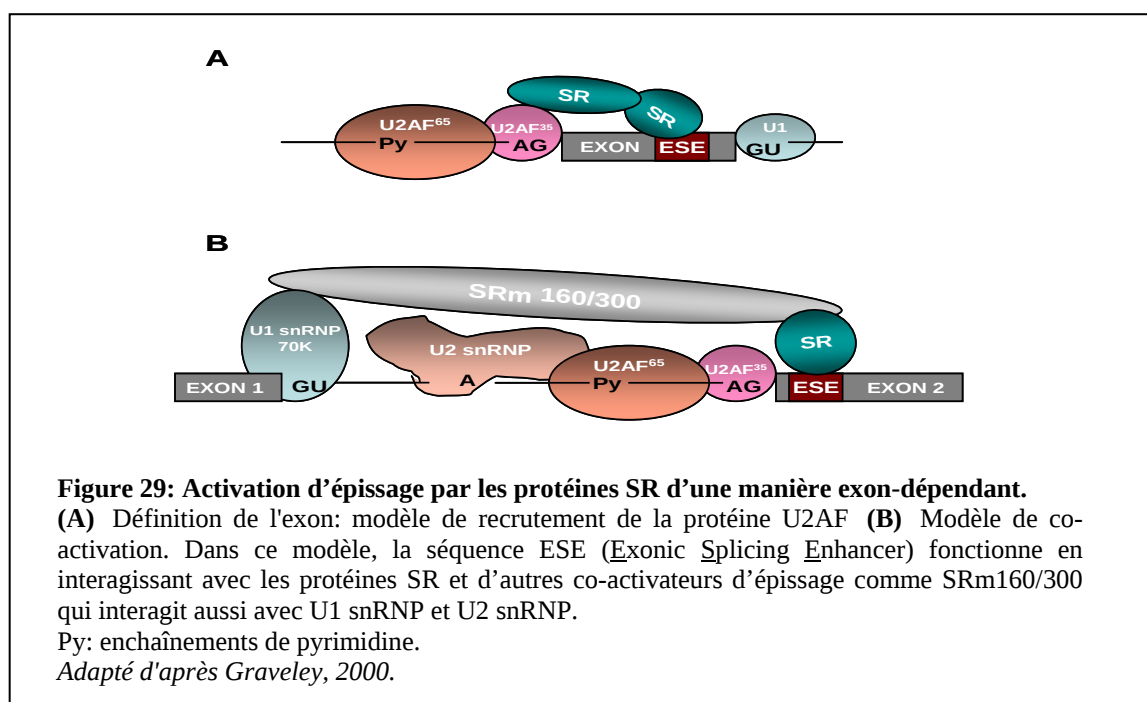
III.2.2.1 Rôle des protéines SR dans l'épissage constitutif et alternatif

Les protéines SR participent à de multiples étapes dans l'assemblage du spliceosome ce qui les rend indispensables, aussi bien au niveau de l'épissage constitutif que de l'épissage alternatif. Dans l'épissage constitutif, les protéines SR assurent un rôle de «ciment» dès les étapes précoces de l'assemblage des complexes spliceosomaux et contribuent aussi à la définition des exons et des introns (Sanford, et al., 2005). Ces effets nécessitent leur fixation via leur RRM à des séquences exoniques spécifiques (rôle exon dépendant), mais aussi leur interaction via leur domaine RS avec des partenaires protéiques (rôle exon indépendant).

a) Rôle dans l'épissage constitutif

La sélection des sites d'épissage est médiée par la fixation des protéines SR via leur domaine RRM sur les séquences exoniques (ESE) du pré-ARNm. Ainsi, au cours de la formation du complexe E, les protéines SR fixées sur leur ESE interagissent physiquement avec la protéine U2AF³⁵ via son domaine RS (Wu and Maniatis, 1993) conduisant au recrutement de la sous-unité U2AF⁶⁵ sur l'enchaînement de pyrimidine située en amont du site 3' d'épissage de l'intron précédent (Tian and Maniatis, 1993; Wu and Maniatis, 1993) (**Figure 29, A**). Par la suite, ce

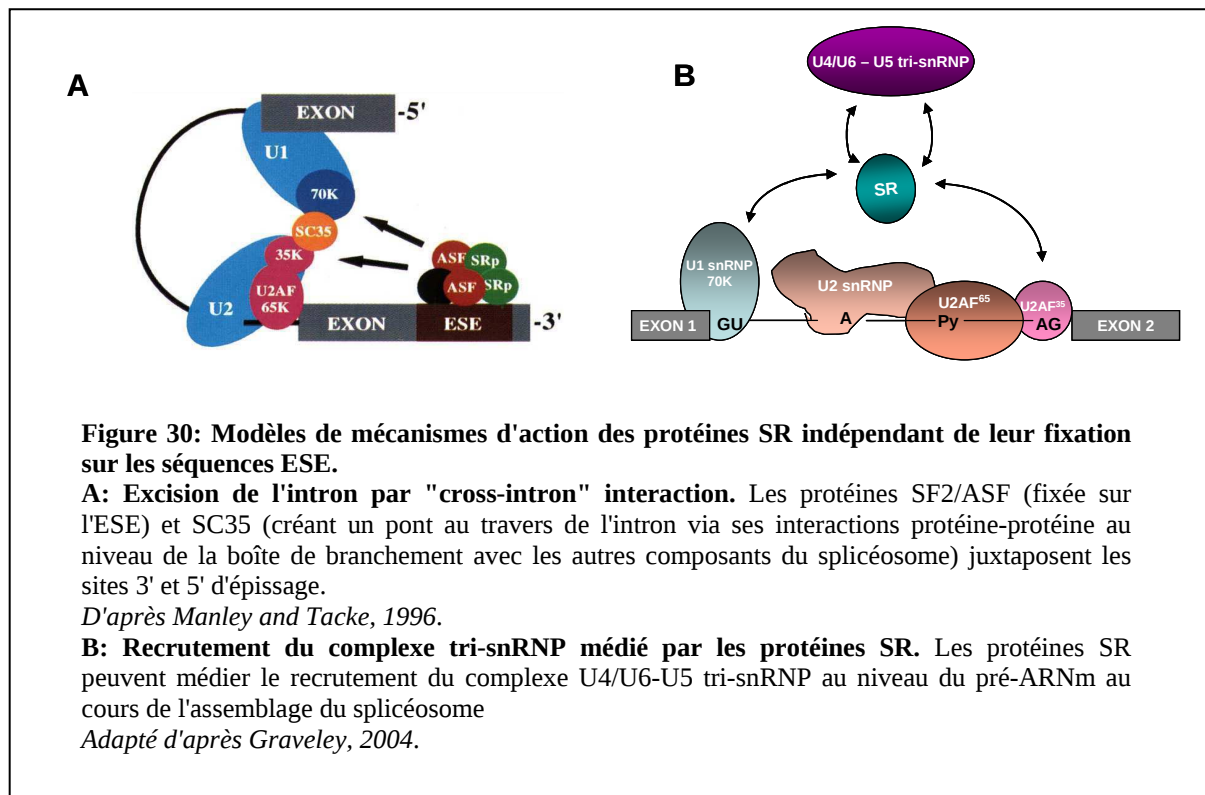
complexe stimule le recrutement de la protéine U1 snRNP sur le site d'épissage 5' situé en aval de l'exon (Graveley, 2000) (**Figure 29, A**). Ce processus initié par les protéines SR permet la définition des exons (Boukis and Bruzik, 2001; Sanford and Caceres, 2004). L'activation de l'épissage par les éléments ESE peut aussi mettre en œuvre d'autres facteurs protéiques, en plus des protéines SR, tels que les co-activateurs d'épissage SRm160/300 ou la protéine Tra2 (Eldridge, et al., 1999; Graveley, 2000) (**Figure 29, B**). Ces co-activateurs favorisent et stabilisent les interactions entre les particules U snRNP et les protéines SR initiées dans les premières étapes des processus d'épissage.



Les protéines SR régulent aussi l'épissage d'une manière exon indépendante, c'est-à-dire par des mécanismes qui n'exigent pas leur fixation sur des séquences exoniques (ESE). Ainsi, il a été proposé que les protéines SR servent de médiateurs pour rapprocher les sites 3' et 5' d'épissage par un mécanisme nommé "cross-intron interaction" et permettre l'excision d'introns de longue taille (Graveley, 2000) (**Figure 30**). Dans ce modèle (premièrement décrit pour la protéine SC35), les protéines SR forment des "ponts" au travers de l'intron en interagissant via leur domaine RS simultanément avec d'autres protéines SR et les protéines U1-70K (fixée sur le site 5' d'épissage) et U2AF³⁵ (fixée sur le site 3' d'épissage) (**Figure 30, A**).

De plus, parallèlement à leur rôle dans la formation du complexe E, les protéines SR jouent aussi un rôle important dans le recrutement du complexe protéique U4/U6-U5 tri-snRNP (Roscigno and Garcia-Blanco, 1995; Tarn and Steitz, 1995). Le mécanisme exact de ce recrutement n'est pas encore connu, mais il a été proposé un modèle selon lequel les protéines SR

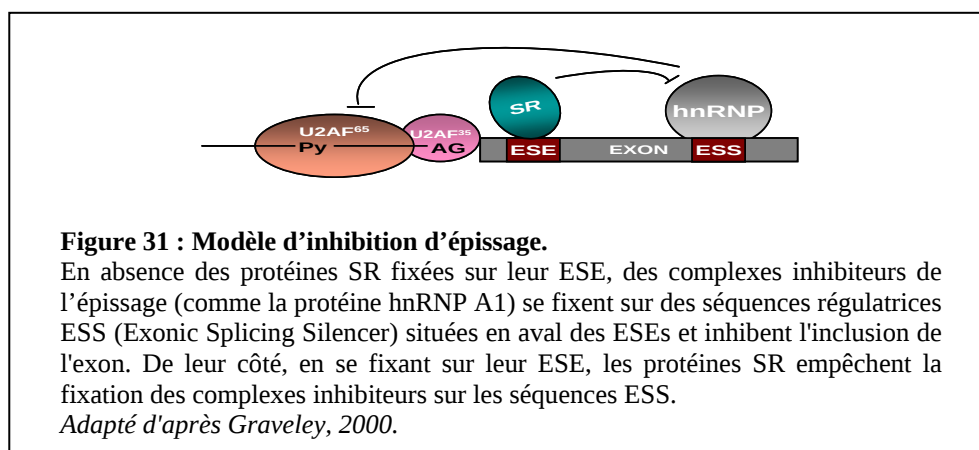
interagissent avec deux protéines spécifiques de 65 et 110 kDa (Graveley, 2000 2005; Roscigno and Garcia-Blanco, 1995; Sanford, et al., 2005) (**Figure 30, B**) qui possèdent des domaines RS (Fetzer, et al., 1997; Teigelkamp, et al., 1997).



b) Rôle des protéines SR dans l'épissage alternatif

Certains exons alternatifs se caractérisent par des séquences d'épissage non optimales. Par exemple, plusieurs sites d'épissage alternatif en 3' contiennent un enchaînement de polypyrimidine insuffisant pour être reconnu par la protéine U2AF résultant en l'exclusion de l'exon situé en aval. La fixation des protéines SR sur les séquences ESE peut compenser cette faiblesse des séquences polypyrimidine en recrutant la protéine U2AF et en initialisant le processus de définition de l'exon (Blencowe, et al., 2000; Sanford and Caceres, 2004). D'autre part, les protéines SR fixées sur des séquences ESE peuvent réguler l'inclusion d'exons alternatifs en supprimant l'effet négatif des protéines de la famille hnRNP, dont la protéine hnRNP A1 qui se fixe sur des séquences exoniques ESS. Plusieurs études ont permis de montrer que les protéines SR et hnRNP A/B inhibitrices agissent de manière antagoniste par un mécanisme dépendant de leur concentration (Smith and Valcarcel, 2000). Leurs sites de fixation sur l'ARN sont en général juxtaposés, ce qui empêche, par encombrement stérique, la fixation simultanée des 2 types de protéines. Ainsi, en absence de protéines SR sur les séquences ESE, la fixation de hnRNP A1 sur

des séquences ESS de l'exon bloque le recrutement de la protéine U2AF au site 3' d'épissage et prévient l'inclusion de l'exon alternatif (**Figure 31**). La balance d'expression entre les protéines SR et hnRNP A/B et leur activité représentent donc des facteurs importants dans la régulation de l'épissage alternatif d'une manière tissu-spécifique ou au cours du développement. De plus, comme nous l'avons déjà dit, certaines des protéines SR pourraient agir en modifiant la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II via la modification de la phosphorylation de son domaine CTD résultant en l'inclusion ou l'exclusion d'exons contenant des sites d'épissage sous-optimaux (Lin, et al., 2008).



Dans des conditions spécifiques, certaines protéines SR peuvent avoir un effet complètement opposé sur la sélection des sites d'épissage alternatifs. Par exemple, les protéines SF2/ASF et SC35 agissent de façon antagoniste dans la régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm β -tropomyosin (Gallego, et al., 1997), où SC35 se comporte comme un répresseur de l'épissage d'une manière tissu-spécifique. Une autre étude très récente montre aussi la capacité de SC35 et SF2/ASF à fonctionner comme antagonistes dans la régulation de l'épissage alternatif du gène IGHD II (Isolated Growth Hormone Deficiency type II). Dans ce cas encore, SC35 se comporte comme répresseur pour la sélection de l'exon 3 (Solis, et al., 2008). Dans la régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm SRp20, SF2/ASF est antagoniste de SRp20 (Jumaa and Nielsen, 1997). Il existe une hypothèse selon laquelle cette capacité des protéines SR à réprimer la sélection des sites d'épissage dépendrait de la localisation des séquences riches en purine sur le pré-ARNm (Zuo and Manley, 1993). Ainsi, si ces séquences sont situées sur l'intron en amont du site 3' d'épissage, les protéines SR qui s'y fixent exerceraient un effet répresseur. A l'inverse, le déplacement de ces séquences sur l'exon en aval modifierait l'activité des protéines SR, les transformant de répresseurs en activateurs de l'épissage (Kanopka, et al., 1996). De même, comme

nous le verrons, la phosphorylation des protéines SR peut aussi conditionner leur effet répresseur versus activateur (Feng, et al., 2008).

III.2.2.2 Rôle des protéines SR dans les mécanismes cellulaires post-épissage

Les protéines SR qui font la navette entre le noyau et le cytoplasme peuvent avoir des fonctions supplémentaires dans le contrôle des processus post-épissage (**Tableau 4**). Il a été démontré que les protéines SF2/ASF, SRp20 et 9G8 stimulent l'export des ARNms épissés en recrutant sous leur forme hypophosphorylée le récepteur principal de l'export NXF1/TAP (Huang, et al., 2003). De plus, les protéines SR ont été impliquées dans le contrôle de la stabilité des ARNm et aussi dans la surveillance et l'élimination des ARNm anormaux. Le NMD (Non Sense Mediated mRNA Decay) est un mécanisme post-transcriptionnel utilisé par les cellules eucaryotes pour dégrader les ARNm anormaux présentant des codons stops prématurés et éviter la production de protéines tronquées pouvant avoir des effets néfastes dans les cellules. De façon intéressante, la surexpression de certaines protéines SR induit fortement le mécanisme de NMD et cet effet nécessite la présence du domaine RS, mais ne corrèle pas avec la navette des protéines SR entre le noyau et le cytoplasme (Zhang and Krainer, 2004). Les protéines SR peuvent aussi moduler la stabilité de l'ARNm par un mécanisme différent du NMD. Lemaire et collaborateurs ont montré que la protéine SF2/ASF régule la stabilité cytoplasmique de l'ARNm de PKCI-1 (Protein Kinase C-Interacting protein) dans des fibroblastes de poulet en se liant à des séquences spécifiques sur le site 3' UTR de PKCI-1 et déstabilisant ainsi son ARNm (Lemaire, et al., 2002). Une autre étude montre que la protéine SC35 à concentration élevée joue aussi un rôle dans la stabilisation et le transport de l'ARNm de SV40 (Wang and Manley, 1995).

Enfin, les protéines SR sont impliquées dans le contrôle de la traduction des ARNms. Ainsi, SF2/ASF s'associe aux polyribosomes et stimule la traduction par un mécanisme mettant en jeu la phosphorylation de 4E-BP1, un inhibiteur de l'initiation de la traduction, via la voie de signalisation mTORC1 (Karni, et al., 2008; Michlewski, et al., 2008). De façon intéressante, la capacité de SF2/ASF à co-réguler l'épissage dans le noyau et la traduction dans le cytoplasme d'un même ARN messager a été récemment mise en évidence (Sanford, et al., 2008), indiquant que les protéines SR peuvent agir à différentes étapes de l'expression génique d'un même gène. De la même façon, la phosphorylation de 9G8 ou SF2/ASF par la voie AKT modifie non seulement l'épissage, mais aussi la traduction de l'ARNm épissé (Blaustein, et al., 2005).

Protéines SR	Epissage constitutif	Epissage alternatif	Répression de l'épissage	Navette entre le noyau et la cytoplasme	Export de l'ARNm	Stabilité de l'ARN	NMD	Traduction de l'ARNm
SF2/ASF	+	+	+	+	-	+	+	+
SC35	+	+	+	-	-	ND	+	-
SRp20	+	+	-	+	+	ND	-	-
9G8	+	+	-	+	+	ND	-	+
SRp30c	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
SR38	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND
SRp40	+	+	-	-	ND	ND	+	-
SRp46	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
SRp54	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
SRp55	+	+	-	ND	ND	ND	+	ND
SRp75	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau 4: Rôles des protéines SR dans l'expression post-transcriptionnelle des gènes.

Les divers rôles décrits pour les protéines SR dans le métabolisme de l'ARNm suggèrent que les membres de cette famille sont des acteurs multifonctionnels qui régulent aussi bien l'épissage, l'export des ARNms et leur traduction.

NMD: Non Sense Mediated Decay

(+): effet démontré

(-): pas d'effet

ND: effet non déterminé

Adapté d'après Sanford, et al., 2005.

III.2.3 Fonctions biologiques des protéines SR

De part leurs fonctions essentielles dans le contrôle de l'expression des gènes, les protéines SR participent au niveau physiologique à la régulation de la croissance cellulaire. Cependant, à l'heure actuelle, peu de travaux ont identifié leurs gènes cibles dans ce contexte. De plus, leur rôle dans le contrôle de processus cellulaires tels que l'apoptose ou la prolifération commence seulement à émerger.

III.2.3.1 Rôle des protéines SR dans l'apoptose et la réponse aux dommages sur l'ADN

Un grand nombre des gènes impliqués dans le contrôle des voies de l'apoptose est régulé par épissage alternatif. Dans la plupart des cas, l'épissage alternatif du même transcrit génère différentes isoformes protéiques aux propriétés souvent antagonistes, pro- ou anti-apoptotiques (**Tableau 5**).

	Protéines	Fonctions cellulaires	Conséquences fonctionnelles de l'épissage
Ligands et récepteurs			
	FasL	Activation de l'apoptose médiée par les récepteurs de mort	Altération de la solubilité et du potentiel apoptotique, phénotype dominant-négatif
	LARD	Apoptose par la voie extrinsèque (dans les lymphocytes)	Altération de la solubilité et du potentiel apoptotique
Protéines Adaptatrices et Régulatrices			
	TRAF2	Voie de signalisation TNF	Phénotype dominant-négatif
	TRAF3	Voie de signalisation TNF	Fonctions distinctes dans la transduction du signal
	MADD	Activation de la voie des MAPK	Fonctions antagonistes au cours de l'apoptose
	Apaf-1	Composant de l'apoptosome	Fonctions antagonistes au cours de l'apoptose
	Survivine	Régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire	Changement de la localisation subcellulaire et de son potentiel apoptotique
	SMAC/Diablo	Protéine de liaison à la protéine IAP	Modifications de son potentiel apoptotique
Famille des protéines Bcl-2			
	Bcl-x	Protéine anti-apoptotique	Fonctions antagonistes au cours de l'apoptose
	Bak	Protéine pro-apoptotique	Modifications de son potentiel apoptotique (dépendant du type cellulaire)
	Bid	Connexion entre les voies intrinsèque et extrinsèque	Modifications de son potentiel apoptotique
	Bim	Protéine pro-apoptotique	Changement de la localisation cellulaire (fixation sur les microtubules)
Caspases et Caspase-like protéines			
	caspase-8	Caspase initiateur	Fonctions antagonistes au cours de l'apoptose
	caspase-2	Caspase initiateur	Fonctions antagonistes au cours de l'apoptose
	caspase-9	Caspase initiateur	Phénotype dominant-négatif
	caspase-10	Caspase initiateur	Changement de l'activité
	caspase-3	Caspase effectrice	Changement de l'activité
	FLIP	Régulation de l'apoptose médiée par les récepteurs de mort	Fonctions potentiellement antagonistes au cours de la réponse immunitaire
Famille des protéines p53			
	p53, p63 et p73	Régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire	Modifications du potentiel apoptotique

Tableau 5: Exemples de facteurs apoptotiques régulés par épissage alternatif et conséquences fonctionnelles.

L'expression d'un grand nombre des gènes impliqués dans les processus de l'apoptose est régulée par épissage alternatif et les isoformes produites ont des fonctions distinctes et souvent complètement opposées au cours de l'apoptose cellulaire.

D'après Schwerk and Schulze-Osthoff, 2005.

Ainsi, certaines caspases, telles que les caspases -2, -8 et -9 sont régulées par épissage alternatif donnant lieu à des isoformes pro- et anti-apoptotiques (Himeji, et al., 2002; Horiuchi, et al., 2000; Jiang, et al., 1998; Kisenge, et al., 2003; Srinivasula, et al., 1999; Wang, et al., 1994). De façon intéressante, un rôle des protéines SR dans le contrôle de l'épissage des caspases a été rapporté. Par exemple, les protéines SC35 et SF2/ASF régulent l'épissage de la caspase-2 en faveur de l'isoforme longue pro-apoptotique via l'exclusion d'un exon alternatif, alors que hnRNP A1 favorise l'expression de l'isoforme courte anti-apoptotique (Jiang, et al., 1998). SF2/ASF est aussi capable de réguler l'épissage de la caspase-9 en réponse aux céramides en faveur de l'isoforme pro-apoptotique (Chalfant, et al., 2002; Massiello and Chalfant, 2006). En accord avec un rôle des protéines SR au cours de l'apoptose, la surexpression de SC35 dans les cellules HeLa induit leur apoptose (Jiang, et al., 1998) et la neutralisation de SF2/ASF dans les cellules de poulet (DT40) provoque l'arrêt du cycle cellulaire en G2 et l'apoptose (Li and Manley, 2005a). L'inactivation de SF2/ASF dans ce contexte prévient la fragmentation internucléosomale de l'ADN via une modulation de l'épissage alternatif de ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase I). De plus, le statut de phosphorylation des protéines SR pourrait jouer un rôle au cours du processus apoptotique. Par exemple, dans les cellules Jurkat, les protéines SR sont déphosphorylées spécifiquement par la phosphatase PP1 en réponse à l'activation du récepteur Fas ou au traitement par les céramides (Chalfant, et al., 2001). De plus, l'activation des kinases SRPK1 et SRPK2 qui phosphorylent les protéines SR, a été décrite dans les étapes précoces de l'apoptose suivie de leur inactivation dans les phases tardives (Kamachi, et al., 2002).

De part leurs effets sur l'apoptose, les protéines SR pourraient aussi jouer un rôle au cours de la réponse aux stress génotoxique. Certaines données vont dans ce sens. Ainsi, la protéine SC35 s'accumule dans des fibroblastes BALB/3T3 en réponse aux gamma-radiation (Cardoso, et al., 2002) et la mitomycine C, un agent anticancéreux, augmente l'activité de la topoisomérase I conduisant à la phosphorylation de SF2/ASF et l'accumulation de p53 (Gobert, et al., 1996). De plus, en réponse à la mitomycine C, le niveau d'expression de certaines protéines SR (SRp55, SRp40, SRp30) augmente et est corrélé à des modifications du profil d'expression de certains variants d'épissage, tels que CD44 (Filippov, et al., 2007). Enfin, la neutralisation de SRp55 dans les cellules traitées augmente leur viabilité suggérant aussi un rôle de SRp55 dans la réponse au stress génotoxique (Filippov, et al., 2007).

III.2.3.2 Rôle des protéines SR au cours du cycle cellulaire

Récemment, une nouvelle fonction des protéines SR dans le contrôle du cycle cellulaire a été décrite. Chez la drosophile, Rasheva et collaborateurs ont montré que la protéine SR, B52, joue un rôle dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire via la régulation de l'épissage alternatif du gène d'*E2F2* un répresseur transcriptionnel de la famille E2F et le contrôle de son expression (Rasheva, et al., 2006). De plus, la perte d'expression de SC35 dans des fibroblastes embryonnaires de souris MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) induit l'arrêt des cellules en G2/M du cycle cellulaire et une instabilité génomique, résultant en partie de l'accumulation de p53 sous une forme hyperphosphorylée et hyperacétylée (Xiao, et al., 2007). Ces résultats révèlent l'implication de la protéine SC35 dans le contrôle de voies spécifiques régulant la prolifération cellulaire et la stabilité du génome (Xiao, et al., 2007). Dans une autre étude, Li et collaborateurs ont montré que la réduction du niveau d'expression de certaines protéines SR dans des cellules MEF immortalisées par l'antigène T de SV40 ralentit leur croissance cellulaire via une diminution de l'entrée en phase S du cycle cellulaire (Li, et al., 2005). Ces résultats suggèrent que les protéines SR pourraient contrôler l'expression de composants de la machinerie du cycle cellulaire. En accord avec ces données, il a été montré une dynamique différentielle d'expression et de localisation subcellulaire de certaines protéines SR au cours des différentes phases du cycle. (Tripathi and Parnaik, 2008). Par exemple, en interphase et au début de la mitose, la protéine SC35 se localise sous sa forme phosphorylée active dans les "speckles" et SF2/ASF s'accumule dans les cellules en interphase (Kruhlak, et al., 2000; Phair and Misteli, 2000). L'accumulation des transcrits codant pour une autre protéine SR, SRp20, à la fin de la phase G1 et au début de la phase S du cycle cellulaire a aussi été décrite (Jumaa, et al., 1997). De façon intéressante, des sites consensus de liaison pour les facteurs de transcription de la famille E2F ont été trouvés sur le promoteur de SRp20, suggérant un rôle de cette protéine SR dans le contrôle du cycle cellulaire par les facteurs de transcription E2Fs.

III.2.3.3 Rôle des protéines SR dans la stabilité génomique

Les protéines SR jouent aussi un rôle dans la maintenance de la stabilité génomique. Ainsi, Li et collaborateurs ont montré que l'absence de SF2/ASF dans les cellules DT40 conduit à la formation de structures dites en "R-loops" constituées d'un hybride entre l'ARNm nouvellement transcrit et l'ADN, qui entraînent l'apparition de cassures double brin sur l'ADN à l'origine d'instabilité génétique (Li, et al., 2005). Le même groupe a démontré que la neutralisation d'une

autre protéine SR, SC35, dans des cellules HeLA conduit aux mêmes effets sur l'ADN et la stabilité génomique (Li and Manley, 2005b). Ces résultats suggèrent que les protéines SR participent à la protection de l'intégrité du génome en empêchant l'hybridation des ARNm naissants avec l'ADN source et donc la formation de structures mutagènes.

III.2.4 Régulation de l'activité des protéines SR

De nombreuses études ont montré que les résidus sérine au sein du domaine RS des protéines SR sont phosphorylés et déphosphorylés d'une manière dynamique dans différents compartiments cellulaires. Ces cycles de phosphorylation/déphosphorylation des protéines SR contrôlent leurs interactions protéine-protéine et protéine-ARN au cours de la réaction d'épissage, mais conditionnent aussi leur localisation subcellulaire, et leur capacité à faire la navette noyau-cytoplasme (Bourgeois, et al., 2004; Hall, et al., 2006; Ma and He, 2003; Misteli, 1999; Stamm, 2008) (**Figure 32**). "In fine" la balance phosphorylation/déphosphorylation conditionne donc l'activité globale des protéines SR.

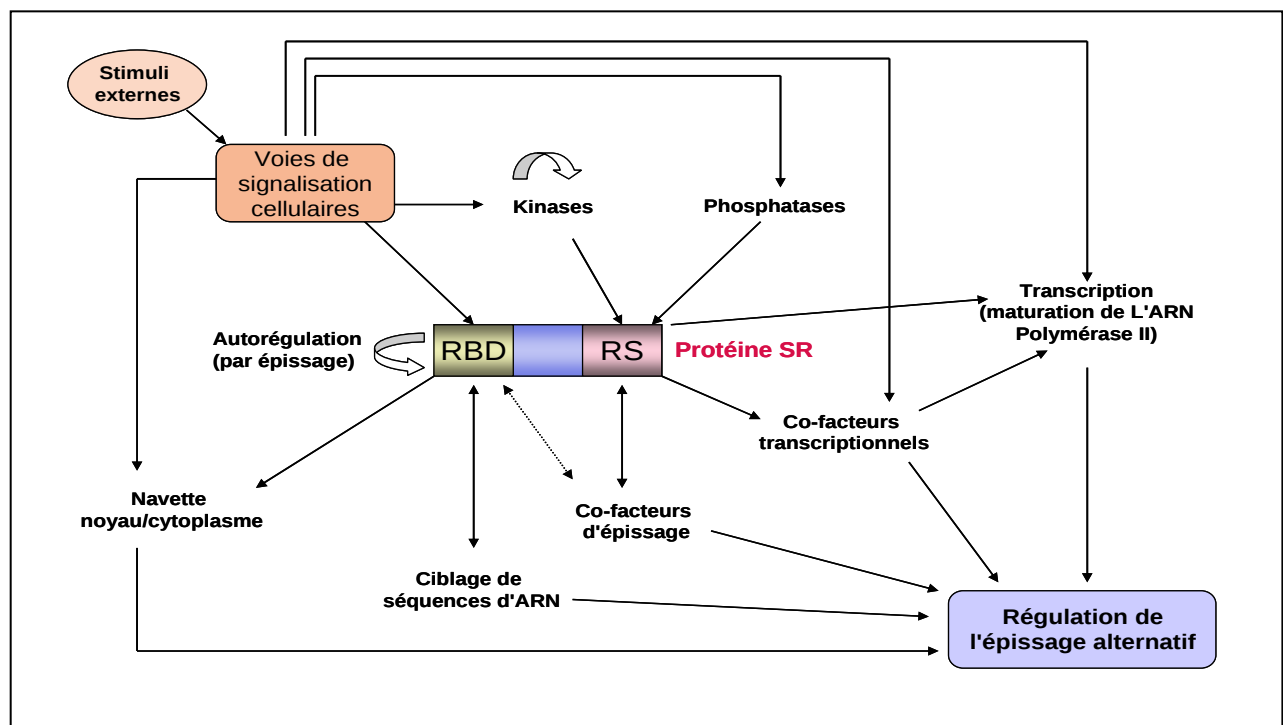


Figure 32: Rôle central des protéines SR dans le réseau des voies de signalisation cellulaires impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif.

Les doubles flèches représentent les différentes interactions des protéines SR par leurs domaines RS (Sérine/Arginine Rich) ou RBD (RNA-Binding Domain) avec des séquences de l'ARN ou avec différents co-facteurs protéiques, conduisant à la régulation notamment de l'épissage alternatif des transcrits. La phosphorylation des protéines SR par des kinases ou leur déphosphorylation par des phosphatases contribue à leur activité biologique globale.

III.2.4.1 Rôle de la phosphorylation des protéines SR dans la réaction d'épissage

La phosphorylation des protéines SR est essentielle aux étapes précoces de l'assemblage du spliceosome via la stimulation de l'interaction des protéines SR avec la protéine U170KDa par exemple (Xiao and Manley, 1997; Xiao and Manley, 1998). De plus, la phosphorylation des protéines SR est nécessaire pour leur interaction avec le domaine CTD de l'ARN polymérase II (Hirose and Manley, 2000; Misteli and Spector, 1999), indiquant un rôle de cette phosphorylation au cours du couplage transcription/épissage. A l'inverse, la déphosphorylation est critique pour la réaction d'épissage après l'assemblage du spliceosome. En accord avec ces données, le traitement d'extraits nucléaires par des inhibiteurs de phosphatases ne prévient pas l'assemblage du spliceosome mais bloque l'épissage (Mermoud, et al., 1994). Ces études indiquent qu'un cycle dynamique de phosphorylation/déphosphorylation est nécessaire à la réaction d'épissage. D'ailleurs, le maintien des protéines SR sous une forme hyper- ou hypophosphorylée inhibe leur activité biologique et la sélection d'exons alternatifs (Kanopka, et al., 1998; Prasad, et al., 1999; Sanford and Bruzik, 1999). La sélection du site d'épissage peut être aussi modulée en fonction du degré de phosphorylation des protéines SR. Chez la drosophile, la mutation d'une kinase affecte le choix d'un site 3' d'épissage (Du, et al., 1998). La modulation du niveau de phosphorylation apparaît donc comme un moyen de contrôle de l'activité, mais aussi, de la spécificité des protéines SR. Enfin, la phosphorylation semble capable de conditionner aussi le type d'activité des protéines SR puisque la phosphorylation de la protéine SR SRp38 qui possède des fonctions de répresseur distinctes des autres membres de la famille SR (Shin, et al., 2005) la transforme en activateur d'épissage via la stimulation du recrutement des protéines snRNP U1 et U2 sur l'ARN pré-messenger (Feng, et al., 2008).

III.2.4.2 Rôle de la phosphorylation dans la localisation sub-nucléaire des protéines SR

Dans le noyau, les protéines SR sont présentes dans le nucléoplasme mais sont aussi concentrées dans des foyers nucléaires nommés "speckles" ou encore "domaines SC35" ou SFCs (Splicing Factor Compartments) (Fu and Maniatis, 1990; Hall, et al., 2006; Misteli, et al., 1997; Misteli and Spector, 1997). La localisation subnucléaire des protéines SR dans les speckles et leur recrutement au niveau des sites actifs de transcription, est fortement dépendante de leur degré de phosphorylation (Misteli, et al., 1998; Misteli and Spector, 1998).

Les speckles sont des structures nucléaires hétérogènes entre 10-30 par cellule qui varient par leur forme et taille (entre 0.5 -3 μm) en fonction des caractéristiques métaboliques de la cellule. Ainsi, il a été suggéré que les speckles transcriptionnellement actifs ont une forme irrégulière, alors que les speckles ronds se forment en absence d'une activité transcriptionnelle (Kavanagh, et al., 2005). Dans les speckles sont concentrées environ 100 protéines différentes incluant des facteurs de transcription, d'épissage et de transport de l'ARNm. Après leur découverte, les speckles ont été longtemps considérés comme de simples sites de stockage des différents facteurs d'épissage (Lamond and Spector, 2003; Mattaj, 1994; Zhang, et al., 1994). Ainsi, les premières études montrent que le relargage des protéines SR des speckles dans le nucléoplasme via la phosphorylation de leur domaine RS est nécessaire à leur fonction d'épissage et à leur accumulation aux sites actifs de transcription (Caceres, et al., 1997; Duncan, et al., 1998; Gui, et al., 1994; Misteli, et al., 1998). Si ce modèle est sans doute valable pour certains nombres de gènes, des études plus récentes suggèrent cependant un rôle beaucoup plus actif des speckles dans le couplage transcription/épissage (Hall, et al., 2006; Stamm, 2008). Ainsi l'expression de plusieurs gènes est directement associée avec ces domaines nucléaires (Brown, et al., 2008; Wei, et al., 1999) qui semblent capable de lier d'une manière spatiale les processus d'expression et de maturation des pré-ARNms. Le couplage de ces processus dans un même compartiment nucléaire pourrait faciliter l'efficacité et l'intégration des différentes étapes, de la transcription du gène jusqu'à l'export nucléaire de son ARNm.

Selon le modèle le plus récent de la structure des speckles, les sites actifs de transcription et d'épissage des pré-ARNms se localisent à la périphérie des speckles dans une région dénommée "paraspeckles" (**Figure 33**). Cette région est enrichie significativement en ARN poly (A), est associée avec plusieurs fibres péri-chromatiniennes et contient aussi différents facteurs d'épissage dont les protéines SR (**Figure 33**). Une fois épissé, l'ARN mature diffuse vers l'intérieur des speckles et s'associe avec des facteurs d'export concentrés à ce niveau, permettant le transport de l'ARNm vers le cytoplasme. Il a aussi été suggéré que les speckles peuvent fonctionner comme des sites "contrôle qualité" de l'ARNm avant son export vers le cytoplasme (Molenaar, et al., 2004). En accord avec cette idée, certains facteurs impliqués dans les processus de NMD (dont Y14 et RNPS-1) sont retrouvés dans les speckles (Kataoka and Dreyfuss, 2004; Mayeda, et al., 1999).

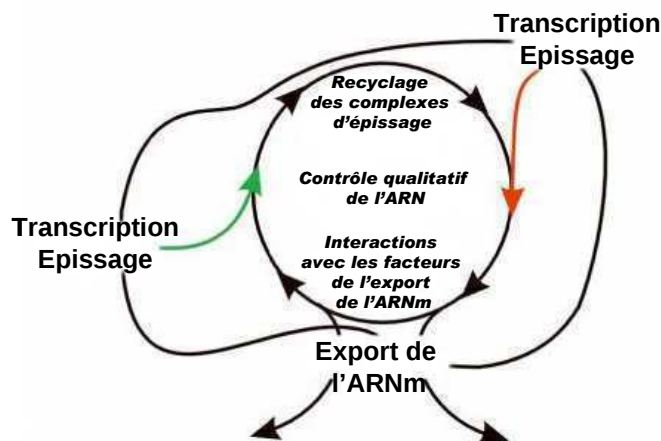


Figure 33 : Modèle de la structure des speckles.

Ce modèle suggère un couplage fonctionnel des processus de transcription, de maturation du pré-ARNm et de l'export de l'ARNm dans un même compartiment nucléaire, dans lequel sont concentrés des facteurs de transcription, d'épissage et d'export de l'ARN. La transcription et l'épissage sont effectués à la périphérie de ces domaines appelés "speckles".

D'après Hall, et al., 2006.

III.2.4.3 Rôle de la phosphorylation des protéines SR dans la navette noyau-cytoplasme

Certaines protéines SR, comme ASF/SF2, SRp20 et 9G8, sont capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Caceres, et al., 1998). C'est leur phosphorylation/déphosphorylation qui conditionne leur interaction avec les systèmes d'export et d'import nucléaires. Au cours des processus d'épissage, les protéines SR faisant la navette, interagissent d'une part avec l'ARNm épissé et d'autre part avec le facteur d'export nucléaire TAP. Cette interaction avec TAP se fait via des séquences dans leur domaine RRM et nécessite la déphosphorylation de leur domaine RS (Huang, et al., 2003; Huang and Steitz, 2001; Lai and Tarn, 2004). Une fois dans le cytoplasme, les protéines SR sont réimportées dans le noyau via leur interaction avec le récepteur d'import hMtr10/Transportine-SR de façon dépendante de leur phosphorylation (Lai, et al., 2000; Lai, et al., 2001; Yun and Fu, 2000; Yun, et al., 2003). La phosphorylation des protéines SR dans le cytoplasme pourrait donc agir comme un "switch" entre le dépôt des ARNm et le réimport nucléaire des protéines SR (Gilbert and Guthrie, 2004) (**Figure 34**).

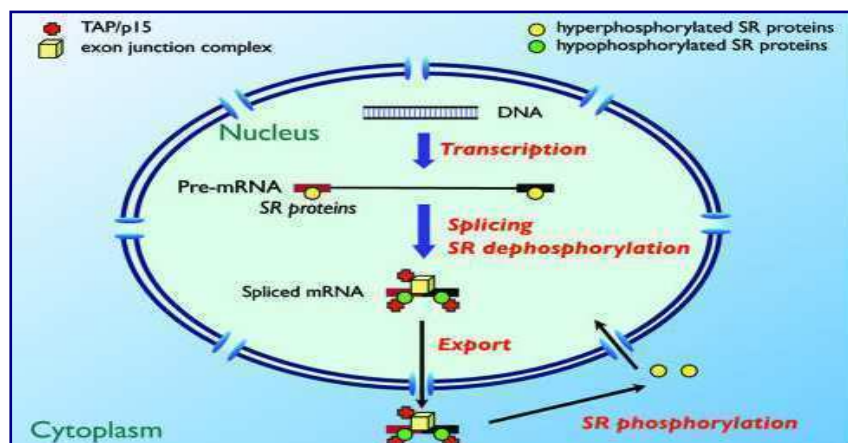


Figure 34: Rôle de la phosphorylation réversible de certaines protéines SR qui font la navette entre le noyau et le cytoplasme pour leur localisation subcellulaire et leur activité biologique.

Selon ce modèle les protéines SR hyperphosphorylées sont recrutées sur le pré-ARNm et se fixent sur leurs ESEs. Au cours de l'épissage, les protéines SR sont déphosphorylées mais certaines d'entre elles restent associées avec l'ARNm et recrutent avec le complexe EJC (Exon Junction Complex) plusieurs copies de la protéine TAP augmentant ainsi l'efficacité d'export de l'ARNm vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, les protéines SR se dissocient de l'ARNm afin d'être phosphorylées de nouveau et importées vers le noyau.

D'après Huang, et al., 2004.

Les protéines qui ne font pas la navette, comme c'est le cas de la protéine SC35, présentent un signal de rétention nucléaire NRS (Nuclear Retention Signal) au niveau de leur domaine RS (Cazalla, et al., 2002). La phosphorylation de la protéine SC35 induit sa localisation dans les speckles, mais contrairement aux protéines SR "navette" qui subissent une déphosphorylation à l'issue de l'épissage de l'ARNm et sortent associées avec lui dans le cytoplasme où elles sont recyclées, la protéine SC35 reste séquestrée dans le noyau. Des données récentes ont montré que les voies de recyclage des protéines SR qui font la navette et les protéines SR nucléaires sont différentes (Lin, et al., 2005; Tenenbaum and Aguirre-Ghiso, 2005) (**Figure 35**). Le groupe de Lin a démontré que la protéine SC35 est fortement résistante à la déphosphorylation par les phosphatases. Le domaine NRS de la protéine SC35 est responsable de cette résistance mais les mécanismes par lesquels SC35 et les autres protéines SR qui restent dans le noyau sont recyclées ne sont pas encore bien connus. L'accessibilité du domaine RS de la protéine SC35 pour la phosphorylation par les kinases mais sa résistance à l'action des phosphatases suggèrent que: (1) soit ce domaine subit des changements conformationnels spécifiques après sa phosphorylation au cours de l'épissage et l'assemblage du splicéosome; (2) soit il recrute spécifiquement des co-facteurs, qui masquent le domaine RS et bloquent ainsi l'accès des phosphatases (Tenenbaum and Aguirre-Ghiso, 2005) (**Figure 35**). En accord avec ce modèle, le transfert du signal NRS dans la structure de la protéine SF2/ASF induit une résistance de son domaine RS pour l'activité des

phosphatases et sa rétention dans le noyau (Lin, et al., 2005). Les auteurs suggèrent aussi la possibilité que la capacité du NRS à séquestrer les protéines SR dans le noyau peut être liée à une hyperphosphorylation de ces protéines à la fin de processus de la maturation de l'ARNm par des kinases nucléaires de la famille "cdc2-like" situées dans les speckles, dont les membres Sty/Clk1 et Clk2-4).

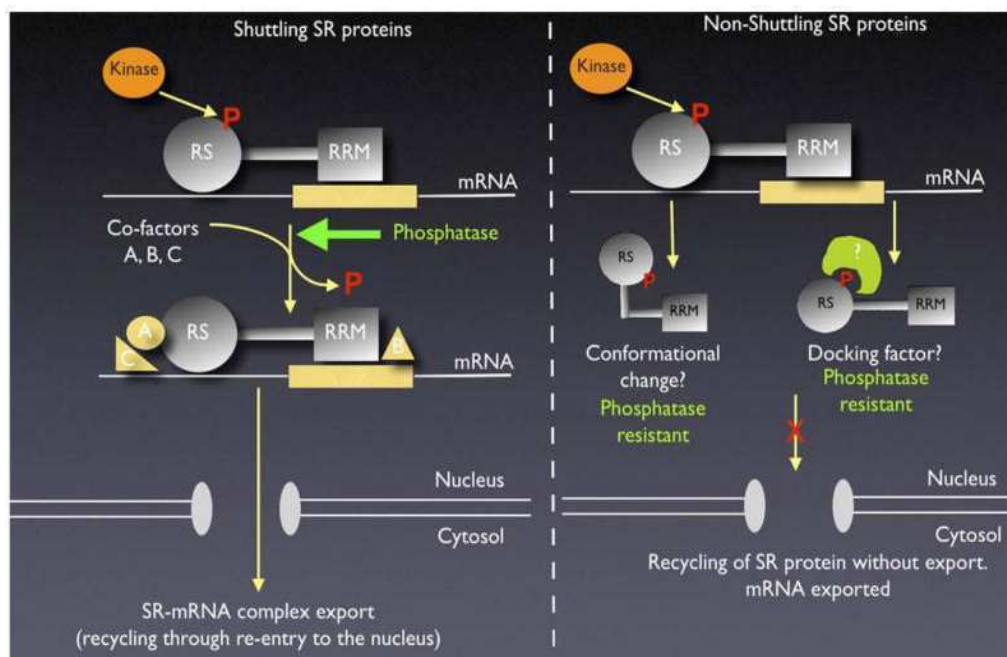


Figure 35: Deux voies distinctes de recyclage des protéines SR au cours de l'épissage et la maturation de l'ARNm.

Les protéines SR sous forme phosphorylée se concentrent dans les speckles nucléaires où ces protéines induisent les processus d'épissage du pré-ARNm. A la fin de la maturation de l'ARN, les protéines SR qui font la navette (à gauche) sont déphosphorylées par des phosphatases et le complexe protéine SR-ARNm sort dans le cytoplasme. Les protéines SR sont ensuite recyclées par phosphorylation et réentrent dans le noyau. A l'inverse, les protéines SR qui ne peuvent pas faire la navette (à droite) après leur phosphorylation par les mêmes ou d'autres kinases restent dans le noyau. Ces protéines sont résistantes à la déphosphorylation, à la suite soit de changements de la conformation du domaine RS ou d'une autre partie de la protéine, soit du recrutement d'autres co-facteurs (en vert) qui bloquent l'accès aux phosphatases.

D'après Tenenbaum and Aguirre-Ghiso, 2005.

III.2.4.4 Kinase et phosphatases impliquées dans le contrôle de la phosphorylation réversible des protéines SR

Différentes kinases phosphorylant les protéines SR ont été décrites. Elles sont localisées dans des compartiments distincts de la cellule et agissent par des mécanismes spécifiques. La recherche de protéines ayant un rôle dans la dissolution des speckles au cours de la mitose (Spector, et al., 1991) a conduit à l'identification de SRPK1 (Gui, et al., 1994). SRPK2 a été identifié sur la base de son homologie à SRPK1 (78%) (Wang, et al., 1998). Ces kinases sont majoritairement cytoplasmiques mais leur localisation nucléaire a été décrite (Wang, et al., 1998), et notamment la relocalisation nucléaire de SRPK1 au cours de la transition G2/M (Ding, et al., 2006). La phosphorylation des protéines SR, et notamment SF2/ASF, par les SRPKs augmente leur interaction avec d'autres protéines à domaine RS, telles que U170KDa, et la surexpression de l'une ou l'autre des kinases SRPKs induit la redistribution des protéines SR des speckles vers le nucléoplasme (Wang, et al., 1998). De plus, un rôle des kinases SRPK1 et SRPK2 dans l'assemblage du complexe spliceosomal a été récemment décrit, via leur interaction respective avec la protéine snRNP U1 et le complexe tri-snRNP U4/U6-U5 (Mathew, et al., 2008). Parallèlement à leur rôle au cours de la formation du spliceosome, les kinases SRPKs jouent un rôle essentiel dans l'import nucléaire des protéines SR faisant la navette noyau-cytoplasme. Ainsi, la phosphorylation séquentielle et processive de SF2/ARF par SRPK1 dans le cytoplasme est nécessaire à son transport dans le noyau (Hagopian, et al., 2008; Hamelberg, et al., 2007; Koizumi, et al., 1999; Ngo, et al., 2008). Le mécanisme impliqué dans la phosphorylation de SF2/ASF par SRPK1 a récemment été décrit et nécessite la reconnaissance et la phosphorylation préalable d'un résidu sérine à l'extrémité C-terminale permettant la phosphorylation séquentielle et directionnelle des autres résidus (Ngo, et al., 2008). Dans ce contexte, les domaines RRM1 et RRM2 de SF2/ASF sont nécessaires.

La famille des kinases CK contient au moins 4 membres, Sty/Clk et Clk-2, -3, -4, qui interagissent et phosphorylent les protéines SR, et sont impliqués dans le contrôle de l'épissage (Stamm, 2008). La phosphorylation des protéines SR par les Clk induit leur relocalisation dans le nucléoplasme et un changement dans le choix du site d'épissage (Colwill, et al., 1996; Hartmann, et al., 2001; Nayler, et al., 1998). A l'inverse, l'hyperphosphorylation des protéines SR par Clk/Sty diminue leur activité dans la réaction d'épissage (Prasad, et al., 1999), suggérant qu'un niveau optimal de phosphorylation est requis pour l'activité des protéines SR. Une hyperphosphorylation de SF2/ASF par Clk/Sty affecte aussi sa localisation subcellulaire en induisant sa rétention dans le cytosol (Caceres, et al., 1998). Ces données suggèrent donc que le niveau d'activation des kinases Clk/Sty pourrait conditionner l'activité des protéines SR et les profils d'épissage (Allemand, et al.,

2007; Hartmann, et al., 2001). Des inhibiteurs pharmacologiques de Clk/Sty sont d'ailleurs à l'étude (Muraki, et al., 2004). Parmi les autres kinases impliquées dans la phosphorylation des protéines SR se trouvent la topoisomérase I (Labourier, et al., 1998; Soret, et al., 2003) la protéine GSK3 (Hernandez, et al., 2004), ou la voie PI3Kinase/AKT qui est activée en réponse à la stimulation par les facteurs de croissance et qui phosphoryle SF2/ASF ou 9G8 en particulier affectant ainsi l'épissage alternatif des pré-ARNm de la protéine kinase C ou de la fibronectine (Blaustein, et al., 2005).

Contrairement aux kinases, les données sur les phosphatases qui déphosphorylent les protéines SR sont rares. Les phosphatases PP1, 2Cgamma et PP2A sont capables de déphosphoryler les protéines SR, et cette déphosphorylation est nécessaire pour la réaction de trans-estérification (Cao, et al., 1997; Shi, et al., 2006). Il a été montré que la phosphatase PP1 fait la navette entre des compartiments cellulaires différents (Trinkle-Mulcahy, et al., 2003) et que les protéines SF2/ASF et SRp30 possèdent un motif très conservé (RVXF) dans leur domaine RRM pour la liaison avec la protéine PP1 (Misteli and Spector, 1996; Novoyatleva, et al., 2008). La diminution de l'activité de PP1 modifie les choix des sites d'épissage alternatif (Novoyatleva, et al., 2008), impliquant l'activité des phosphatases dans le contrôle des processus d'épissage. Au cours du choc thermique, l'activation de PP1 par dissociation avec son inhibiteur NIPP1 induit la déphosphorylation spécifique de SRp38 (Shi and Manley, 2007). Enfin, une autre phosphatase Glc7p a été récemment impliquée dans la déphosphorylation de certaines protéines "SR-like" et pourrait affecter les protéines SR (Gilbert and Guthrie, 2004).

S'il apparaît donc que les cycles de phosphorylation/déphosphorylation des protéines SR conditionnent leur activité et leur localisation subcellulaire, très peu de données existent néanmoins concernant les signaux extra- ou intra-cellulaires activant ces kinases et/ou phosphatases ou sur les gènes dont l'épissage est modulé en réponse à l'activation de telles ou telles kinases/phosphatases.

III.2.4.5 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des protéines SR

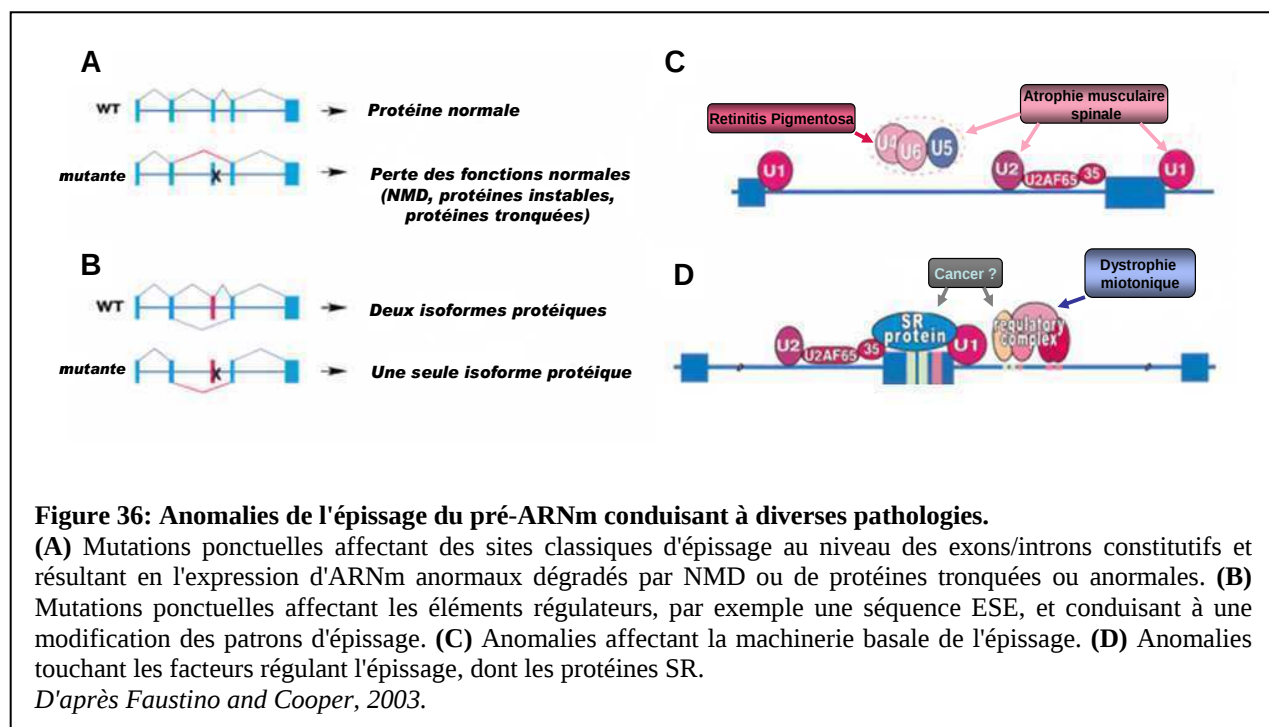
A côté des modifications post-traductionnelles, peu de données existent concernant les facteurs contrôlant le niveau d'expression des protéines SR. Pourtant, l'identification des mécanismes contrôlant leur expression apparaît importante dans la mesure où, comme discuté précédemment, le ratio entre les différents facteurs SR agissant parfois de façon antagoniste va conditionner en aval les profils d'épissage. Il a été récemment montré que la protéine E2 du virus HPV16 transactive le promoteur du gène SF2/ASF (Mole, et al., 2009). De façon intéressante, les gènes codant pour les protéines SR sont aussi régulés au niveau post-transcriptionnel. Les gènes codant pour SRp20, SF2/ASF, SC35, 9G8, SRp30c, SRp40 et SRp55 expriment différents variants d'épissage, résultant d'un épissage alternatif ou de sites poly A distincts (Jumaa and Nielsen, 1997; Sureau, et al., 2001). Dans ce contexte, SRp20 et SC35 autocontrôlent leur propre expression afin d'éviter leur accumulation trop importante. Ainsi, SRp20 se fixe sur son pré-ARNm, modifie son épissage et conduit à la synthèse d'une protéine présumée inactive, dépourvue de son domaine RS (Jumaa and Nielsen, 1997). SC35 régule aussi négativement son expression. Ainsi, un haut niveau de SC35, et pas de SF2/ASF ou 9G8, active spécifiquement deux événements d'épissage alternatif au niveau de la région 3' UTR du gène (Sureau, et al., 2001). Les variants résultant de cet épissage sont dégradés par la machinerie du NMD résultant en une diminution globale du niveau d'ARN codant pour SC35. De plus, une diminution de l'expression des ARNms codant pour SF2/ASF ou SRp30 a été observée en réponse à leur surexpression (Lopato, et al., 1999; Wang, et al., 1996).

Ainsi, la capacité des protéines SR à auto-contrôler leur niveau de transcrits apparaît comme un mécanisme commun susceptible d'affecter leur niveau d'expression.

III.3 Epissage et cancer

Les altérations touchant les processus d'épissage constitutif ou alternatif du pré-ARNm jouent un rôle important dans le développement de maladies variées. Ainsi, au moins 15 % des mutations ponctuelles menant à des maladies génétiques affectent l'épissage (Cartegni, et al., 2003). Plusieurs études ont démontré l'existence de différences dans les profils d'épissage alternatif entre tissus normaux et cancéreux, et des études bioinformatiques ont documenté l'expression de plusieurs centaines de variants d'épissage spécifiquement dans les cellules cancéreuses (Hu, et al., 2003; Hui, et al., 2004; Nissim-Rafinia and Kerem, 2005; Philips and Cooper, 2000; Wang, et al., 2005). Par exemple, Xu et collaborateurs ont identifié des variants d'épissage associés spécifiquement au cancer dans 316 gènes (Xu and Lee, 2003), et récemment une analyse génomique à grande échelle réalisée dans les cancers du poumon a identifié 13 % des 17800 gènes analysés comme possédant des transcrits alternatifs différemment exprimés entre adénocarcinome pulmonaires et tissus normaux (Xi, et al., 2008). Ces études montrent donc l'existence d'une connexion étroite entre épissage et cancer, mais il reste à déterminer si et comment les anomalies affectant l'épissage participent au processus de carcinogénèse ou sont l'une des conséquences de ce processus, de même qu'il reste à identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans cette dérégulation de l'épissage. Bien que l'impact fonctionnel des variants d'épissage est très peu documenté, de façon consistante avec la théorie de Weinberg, les anomalies touchant l'épissage, décrites dans les cancers affectent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (oncogènes), l'apoptose (gènes suppresseurs de tumeur), l'invasion cellulaire, l'angiogénèse et/ou la différenciation (Venables, 2004; Venables, 2006).

Sur le plan mécanistique, deux grandes catégories d'anomalies affectant l'épissage des pré-ARNm, et à l'origine de pathologie diverses dont les cancers ont été décrites (**Figure 36**) (Faustino and Cooper, 2003). La première catégorie comprend les mutations dites en "*cis*" qui affectent les sites d'épissage ou les éléments auxiliaires (ESE). La seconde catégorie comprend les modifications de l'activité des protéines agissant en "*trans*", c'est-à-dire les anomalies de la machinerie d'épissage.



III.3.1 Mutations « en cis »

Les mutations dites "en cis" modifient l'utilisation des sites d'épissage constitutif ou alternatif au sein du pré-ARNm. La majorité des mutations modifiant l'épissage constitutif résulte d'une substitution d'un seul nucléotide à l'intérieur des séquences canoniques d'épissage au niveau des introns ou des exons. Ces mutations conduisent à l'élimination d'exon, à l'utilisation de pseudo-site d'épissage 5' ou 3', ou en la rétention d'intron. D'autres mutations introduisent des sites d'épissage nouveaux dans des exons ou des introns. Dans la majorité des cas, l'utilisation de sites d'épissage inhabituels ou la rétention d'intron introduit un codon stop prématuré sur l'ARNm, résultant en sa dégradation par le complexe NMD et à la perte de fonction de l'allèle muté (Faustino and Cooper, 2003; Hentze and Kulozik, 1999; Maquat and Carmichael, 2001) (**Figure 36, A**). Des mutations qui affaiblissent des sites d'épissage ou qui en créent de nouveaux ont été identifiées dans différents gènes associés au cancer (**Tableau 6**) (Srebrow and Kornblihtt, 2006). Les mutations "en cis" peuvent aussi toucher les éléments régulateurs, tels que les séquences ESE, conduisant à une modification de l'abondance relative des variants d'épissage, ou mener à l'utilisation de nouveaux sites d'épissage. Par exemple, pour le gène *BRCA1*, une mutation dans un élément exonique empêche la protéine régulatrice SF2/ASF de s'y lier, ce qui provoque l'exclusion de l'exon 18 et la modification d'un domaine protéique (**Tableau 6**). Pourtant, très peu de mutations affectant les sites d'épissage ont été décrites parmi les gènes dont les patrons d'épissage

sont anormaux dans les cancers, suggérant que ces changements pourraient être liés à des anomalies des facteurs protéiques agissant "*en trans*" (Brinkman, 2004; Kim, et al., 2008).

Gène (fonction)	Pathologie	Séquence mutée	Conséquences moléculaires	Référence
LKB1 (suppresseur de tumeur)	Syndrome de Peutz-Jeghers (haut risque de cancer)	IVS2+1A>G (mutation dans le site d'épissage en 5' de l'intron 2)	Destruction du spliceosome; le site d'épissage 5' muté et le site d'épissage 3' cryptique canonique sont encore utilisés; niveau bas de la protéine	Hasting et al., 2005
KIT (oncogène)	Tumeur stromale gastrointestinale	Délétion de 30 ou 34 nucléotides comprenant le site d'épissage IVS10 3	Epissage aberrant, activation constitutive de la protéine	Chen et al., 2005
CDH17 (LI-cadhérine)	Carcinome hépatocellulaire	IVS6+35A>G	Génération d'une séquence ISS (?), Exclusion exon 7	Wang et al., 2005
CDH17 (LI-cadhérine)	Carcinome hépatocellulaire	Mutation codon 651 exon 6	Génération d'une séquence ESS (?), Exclusion exon 7	Wang et al., 2005
KLF6 (suppresseur de tumeur)	Cancer de la prostate	IVS1-27G>A	Génération d'un site de liaison (ISE) pour SRp40; Apparition de nouveaux variants d'épissage agissant comme des dominants négatifs	Narla et al., 2005
HAS1 (hyaluronan synthase)	Mélanome multiple	E3 C7760T	Exclusion de l'exon 4	Adamia et al., 2005
BRCA1 (suppresseur de tumeur)	Cancer du sein et de l'ovaire	E18 G5199T (E1694X) (mutation ponctuelle dans l'exon 18)	Destruction d'une ESE, Exclusion exon 18	Mazoyer et al., 1998

Tableau 6: Exemple de mutations qui ont lieu dans des séquences agissant en "*cis*" et qui sont associées avec le développement de maladies malignes.

Plusieurs altérations de l'épissage créées par des mutations conduisant à la destruction ou la création de sites d'épissage, ainsi qu'à la modification de séquences régulatrices de type "enhancers" (ESE, ISE) ou "silencers" (ESS, ISS) sont associées aujourd'hui avec le cancer. Dans ce tableau, quelques exemples de gènes dont les mutations affectent leur patron d'épissage.

D'après Srebrow and Kornblihtt, 2006.

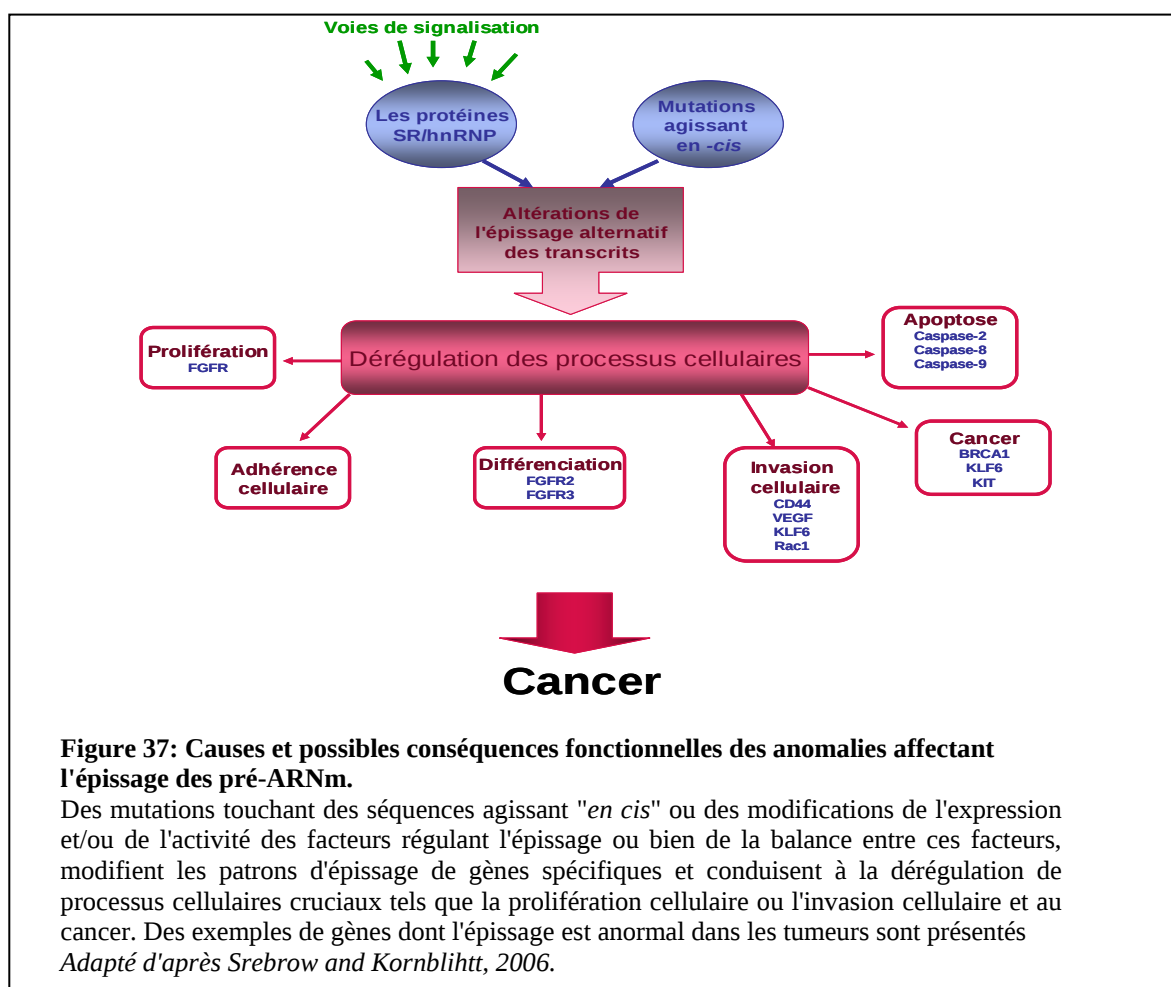
III.3.2 Anomalies affectant les protéines régulant l'épissage

Ces anomalies vont soit affecter des constituants de la machinerie basale d'épissage, soit des facteurs d'épissage ou des protéines interagissant avec eux (Figure 36, C et D). Bien que très peu documenté, des modifications post-traductionnelles, telles qu'une phosphorylation anormale des protéines SR, ou des modifications de la localisation subcellulaire de ces protéines pourrait aussi contribuer au processus de carcinogénèse. D'ailleurs, la kinase SRPK1 est surexprimée dans les cancers du sein, du colon, du pancréas et des testicules et est un facteur de résistance à l'apoptose induit par la gemcitabine et le cisplatine (Hayes, et al., 2006; Hayes, et al., 2007; Sanz, et al., 2002; Schenk, et al., 2004). De plus, une augmentation de l'expression des protéines SR de faible poids moléculaire et de leurs formes hyperphosphorylées a été observée dans les cancers ovariens (Fischer, et al., 2004). Lors de certains cancers comme les sarcomes d'Ewing, des translocations chromosomiques affectent les gènes EWS et TLS qui produisent des protéines liant l'ARN. Celles-ci sont impliquées dans le contrôle de l'épissage puisqu'elles interagissent avec certaines protéines SR. Les translocations entre ces gènes et des facteurs de transcription de la famille ETS (comme FLI-1) produisent des protéines chimériques possédant des propriétés oncogéniques (Janknecht, 2005). De façon importante, il a été montré que la protéine EWS-FLI-1 influence l'épissage alternatif de la cycline D1 en faveur de son isoforme oncogénique en modifiant la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II (Sanchez, et al., 2008). Dans la leucémie, la protéine BCR-ABL conduit à des défauts d'épissage par un mécanisme qui pourrait mettre en jeu sa capacité à induire la surexpression de la kinase SRPK1 (Salesse, et al., 2004). Les anomalies détectées dans les cancers peuvent aussi toucher certains composants de la machinerie basale d'épissage. Par exemple, la protéine U2AF³⁵ qui reconnaît le site d'épissage 3' est sous-exprimée dans les cancers pancréatiques. Cette sous-expression conditionne la synthèse d'une isoforme constitutivement active du récepteur CCK-B (Cholecystokinin-B/gastrin) et stimule la prolifération cellulaire (Ding, et al., 2002).

Enfin, des anomalies touchant les protéines SR ont été décrites, et certains de leurs gènes cibles identifiés dans les cancers. Ainsi, une dérégulation de l'expression des protéines hnRNP et SR a été montrée pour la première fois dans les cancers du colon (Ghigna, et al., 1998). De plus, une augmentation de l'expression de certaines protéines SR dont SR2/ASF a été associée à la progression tumorale (Fischer, et al., 2004; Stickeler, et al., 1999; Zerbe, et al., 2004). Cette observation corrèle avec des modifications de l'épissage alternatif de CD44, une glycoprotéine membranaire impliquée dans les processus de migration et d'adhésion cellulaires, dans les cancers du sein chez la femme (Ghigna, et al., 2008). Une modification de la balance hnRNP A1/SF2/ASF dans les adénocarcinomes pulmonaires a aussi été décrite (Zerbe, et al., 2004). Ces données

suggèrent que des altérations dans l'expression protéique des protéines SR pourraient participer au processus du tumorigénèse. En accord avec cette hypothèse, il a été récemment montré que SF2/ASF est un proto-oncogène dont l'expression est augmentée dans les cancers du poumon, du colon et du foie et est suffisante pour transformer des fibroblastes immortels murins via le contrôle de l'épissage du gène suppresseur de tumeur BIN1 et des oncogènes MNK2 et S6K1 (Karni, et al., 2007). SF2/ASF est aussi capable de réguler l'épissage alternatif du proto-oncogène Ron conduisant à l'accumulation d'une isoforme constitutivement active Δ Ron, qui augmente la mobilité cellulaire impliquée dans le processus de métastases (Ghigna, et al., 2005). De plus, SC35 régule l'épissage du suppresseur de tumeur KLF6 en réponse à la caféine (Shi, et al., 2008).

En conclusion, des mutations affectant le choix des sites d'épissage, l'assemblage du spliceosome ou les facteurs régulant l'épissage pourraient participer au développement des cancers, via la modification de processus cellulaires cruciaux comme la prolifération cellulaire, l'apoptose ou l'invasion (Figure 37). Il reste maintenant à déterminer: (1) quelles sont les voies de signalisation impliquées dans ces effets; (2) quels facteurs protéiques contrôlent l'expression des facteurs d'épissage dans les cancers; (3) quels sont les facteurs d'épissage dérégulés dans les cancers et leurs gènes cibles dans ce contexte.



OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Le cancer du poumon résulte de l'accumulation séquentielle d'anomalies génétiques et épigénétiques au niveau de gènes clés contrôlant la division cellulaire, l'apoptose et/ou la sénescence. L'identification des événements moléculaires impliqués dans le développement tumoral offre des perspectives pour mieux connaître l'évolution de la maladie, pour identifier d'éventuels facteurs pronostiques mais aussi pour développer de nouvelles approches préventives et outils de détection précoce et thérapeutique.

Depuis plusieurs années, l'équipe qui m'a accueillie concentre ses efforts sur les voies de signalisation des deux gènes suppresseurs de tumeur, *p53* et *Rb*, et travaille sur les mécanismes moléculaires conduisant à l'invalidation de ces voies dans les tumeurs bronchiques, résultant en une perte du contrôle de la prolifération cellulaire et/ou de l'apoptose. Comme je l'ai décrit dans l'introduction (**Figure 3**), les protéines p53 et RB se trouvent au centre d'un réseau de signalisation qui agit comme un "verrou moléculaire" protégeant la cellule de l'ensemble des activations oncogéniques situées en amont et qui peut inactiver ou déréguler ces voies. Le facteur de transcription E2F1, de part ses interactions directes avec les protéines p53 et RB, est un facteur situé à l'interface de ces deux voies et apparaît comme une protéine potentiellement impliquée dans la carcinogenèse broncho-pulmonaire. Des résultats préliminaires à mon travail obtenus au laboratoire avaient démontré l'existence d'une expression différentielle de E2F1 dans les cancers pulmonaires de différents types histologiques (Eymin, et al., 2001). Ainsi, E2F1 est faiblement exprimé dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules (CBnPC), et notamment les adénocarcinomes. A l'inverse, il est surexprimé dans les carcinomes neuroendocrines pulmonaires. Sur la base de ces résultats, une hypothèse avait été émise selon laquelle E2F1 posséderait des fonctions ambivalentes au cours de la carcinogenèse pulmonaire. Ainsi, dans les CBnPCs, la perte d'expression de E2F1 pourrait contribuer au processus de carcinogenèse par perte d'une activité bénéfique de la protéine. Inversement, dans les tumeurs neuroendocrines pulmonaires de haut grade, la surexpression de E2F1 contribuerait au statut hautement agressif de ces tumeurs. Dans ce contexte, un des objectifs de mon travail visait à identifier de nouvelles cibles et voies de signalisation de la protéine E2F1 afin de mieux comprendre les conséquences biologiques pouvant découler de la dérégulation de son expression dans les cancers bronchiques.

En accord avec l'hypothèse faite que la faible expression de E2F1 détectée dans les CBnPCs pourrait contribuer à leur développement par perte d'une activité bénéfique, des travaux préliminaires à ma thèse ont démontré que la réintroduction de E2F1 dans différentes lignées cellulaires d'adénocarcinomes bronchiques induit leur apoptose (Salon, et al., 2006).

Au niveau moléculaire, ces travaux ont montré que E2F1 permet l'activation de la caspase-8 en diminuant spécifiquement l'expression de l'isoforme courte de la protéine anti-apoptotique c-FLIP et restaure ainsi la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par les ligands des récepteurs de mort Fas et TRAIL (Salon, et al., 2006). L'observation qu'E2F1 régule différemment l'expression des transcrits alternatifs codant pour les isoformes longue et courte de la protéine FLIP nous a conduit à rechercher le rôle potentiel de E2F1 dans le contrôle des processus d'épissage alternatif des ARN pré-messagers dans le contexte de l'apoptose. Nous avons défini nos premiers objectifs qui étaient de rechercher si E2F-1 pourrait moduler l'expression de certains facteurs d'épissage. Nous nous sommes concentrés plus particulièrement sur la famille des protéines SR décrite dans mon introduction. Pour mettre en œuvre cette étude, nous avons utilisé comme modèle cellulaire d'étude un système Tet-On d'expression stable et contrôlée de E2F1 dans une lignée cellulaire issue d'adénocarcinome pulmonaire humain, déjà établie au laboratoire. Les résultats de cette étude ont permis d'identifier la protéine SR, SC35, comme une nouvelle cible transcriptionnelle de E2F1 et ont fait l'objet d'une publication dans *Cell Death and Differentiation* (Merdzhanova, et al., 2008 2008, Pages 1815-1823).

Dans un second temps, nous avons recherché si E2F1 en coopération avec SC35 pourrait moduler l'épissage alternatif d'autres gènes jouant un rôle important au cours du processus tumoral. Dans ce contexte, la seconde partie de mon travail de thèse a porté sur l'analyse du rôle potentiel des protéines E2F1 et/ou SC35 dans le contrôle de l'épissage du VEGF, un facteur de croissance primordial au cours du processus de néo-angiogénèse tumorale. Comme discuté dans l'introduction, deux groupes de variants d'épissage du VEGF possédant des fonctions opposées: pro-angiogéniques (VEGF_{xxx}) et anti-angiogéniques (VEGF_{xxx}b) ont été découverts (Bates, et al., 2002). Nous avons émis l'hypothèse que E2F1 en coopération ou non avec SC35 pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'épissage alternatif des isoformes pro- et anti-angiogéniques du VEGF. Nous avons montré qu'E2F1 et SC35 modulent la balance des variants VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b dans différents modèles des lignées de carcinomes pulmonaires, et étendu ces résultats chez la souris nude, en démontrant que E2F1 inhibe la croissance tumorale « in vivo » via une modification du ratio VEGF₁₆₅/VEGF₁₆₅b. Ces résultats font l'objet d'une seconde publication actuellement en préparation (Merdzhanova, en préparation).

Finalement, sur la base de nos travaux démontrant la coopération entre E2F1 et SC35 au cours de l'apoptose, nous avons émis l'hypothèse d'un rôle de SC35 dans le contrôle des fonctions prolifératives de E2F1. Nous discuterons le résultat de ces recherches, faisant l'objet

d'un manuscrit actuellement en préparation (*Edmond, Merdzhanova et al*), ainsi que présenterons certains des résultats préliminaires que nous avons obtenus, indiquant que E2F1 modifie le niveau de phosphorylation de SC35.

RESULTATS

I E2F1 CONTROLE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE GENES IMPLIQUES DANS L'APOPTOSE EN STIMULANT L'EXPRESSION DU FACTEUR D'ÉPISSAGE SC35

I.1 Présentation de l'étude

Des études antérieures menées au sein de l'équipe ont mis en évidence l'existence d'une expression différentielle de la protéine E2F1 dans les cancers bronchiques de différents types histologiques (Eymin, et al., 2001). Ainsi, dans plus de 90 % des adénocarcinomes pulmonaires, l'expression de E2F1 est très faible ou indétectable. De plus, l'inactivation de E2F1 chez la souris favorise, notamment, le développement d'adénocarcinomes pulmonaires (Yamasaki, et al., 1996). Sur la base de ces données, une hypothèse a été émise au laboratoire selon laquelle le très bas niveau d'expression de E2F1 pourrait contribuer au processus de carcinogénèse de ces tumeurs par perte d'une activité bénéfique pro-apoptotique. De façon intéressante, des résultats préliminaires obtenus dans notre équipe ont démontré que E2F1 est capable d'induire l'apoptose de cellules tumorales d'adénocarcinome pulmonaire par un mécanisme mettant en jeu l'activation de la caspase-8 et son recrutement au niveau du DISC (Death Inducing Signaling Complex) via la diminution spécifique de l'expression des ARNm et du niveau protéique de l'isoforme courte de la protéine anti-apoptotique c-FLIP (c-FLIP_{Court}) (Salon, et al., 2006). L'observation qu'E2F1 régule différemment l'expression des transcrits alternatifs codant pour les isoformes longue et courte de la protéine FLIP nous a donc conduit dans ce travail à rechercher un rôle potentiel de E2F1 dans le contrôle de l'expression de certains facteurs régulant l'épissage alternatif des transcrits. Parmi les facteurs d'épissage, nous nous sommes centrés sur les protéines SR.

Pour nos études, nous avons utilisé un modèle d'expression stable et inductible de E2F1 ou d'un mutant incapable de lier l'ADN, E2F1 (E132), dans une lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire, H358, n'exprimant pas p53 et comportant une protéine RB inactive hyperphosphorylée. Dans ce système, l'expression de E2F1 ou de E2F1 (E132) est induite dans les cellules suite à l'introduction de doxycycline dans le milieu de culture (système Tet-On, Clontech). Nous avons aussi utilisé d'autres lignées cellulaires issues d'adénocarcinomes pulmonaires humains (H1299 et A549) exprimant un faible niveau de

E2F1 et les lignées cellulaires de tumeurs neuroendocrines pulmonaires H69 et H810 surexprimant spontanément E2F1.

Dans notre modèle cellulaire inductible pour l'expression de E2F1, nous avons étudié le niveau d'expression de certaines protéines SR. Nous avons observé une augmentation spécifique de la protéine SC35 dans les cellules surexprimant E2F1, comparativement aux cellules non-induites et aux cellules exprimant la protéine mutante de E2F1 (E132). De façon intéressante, nous avons démontré que E2F1 augmente l'expression de la protéine SC35 par un mécanisme transcriptionnel. Par des expériences de gène rapporteur et immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), nous avons montré que E2F1 est capable d'activer le promoteur de SC35 et de se fixer sur ce promoteur identifiant SC35 comme une cible directe de E2F1. Ensuite, nous avons recherché la contribution de la protéine SC35 à l'apoptose médiée par E2F1. Nous avons démontré que la neutralisation de SC35 par ARN interférence prévient l'induction de l'apoptose par E2F1 et la diminution de l'expression de c-FLIP_C. De plus, nous avons montré que SC35 contribue à la sensibilisation des cellules surexprimant E2F1 à la mort induite via les récepteurs de mort comme Fas.

A la recherche d'autres cibles potentielles de E2F1 et/ou SC35, nous avons montré que les deux protéines coopèrent pour induire l'apoptose en modifiant le profil d'épissage alternatif d'autres gènes impliqués dans le processus apoptotique dont les *caspase-8*, *caspase-9* et *Bcl-x*, et favorisent l'expression des transcrits codant pour les isoformes protéiques pro-apoptotiques. Ces résultats mettent en évidence le premier lien entre le facteur de transcription E2F1 et les facteurs protéiques contrôlant l'épissage alternatif des transcrits.

Nous avons ensuite cherché à identifier dans quel contexte physiologique les deux protéines E2F1 et SC35 coopèrent pour induire l'apoptose des cellules tumorales. Sachant que les dommages de l'ADN provoqués par des agents cytotoxiques stabilisent E2F1 et induisent l'apoptose (Stevens, et al., 2003; Wang, et al., 2006), nous avons traité les cellules H358 avec le méthylméthanesulfonate (MMS) ou le cyclophosphamide, deux agents génotoxiques, et nous avons recherché l'effet de ces agents sur l'expression des protéine E2F1 et SC35. Nos résultats montrent que l'accumulation de E2F1 dans les cellules traitées s'accompagne d'une augmentation de l'expression de SC35 (au niveau protéique et ARN) et de l'induction de l'apoptose. De plus, le cyclophosphamide modifie l'épissage de la caspase-9 et de bcl-x en faveur des transcrits codant pour les isoformes pro-apoptotiques par un mécanisme mettant en jeu E2F1 et SC35.

En conclusion, nos travaux démontrent que les protéines E2F1 et SC35 coopèrent pour induire l'apoptose en réponse au stress génotoxique, en modifiant les profils d'épissage d'un certain nombre de gènes au profit des variants codant pour les isoformes pro-apoptotiques.

I.2 Article 1

E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. **Cell Death and Differentiation**, Volume 15, 2008, Pages 1815-1823. G. Merdzhanova, V. Edmond, S. De Seranno, A. Van den Broeck, L. Corcos, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Gazzeri and B. Eymin.

Ces travaux ont fait l'objet d'un éditorial paru dans le même volume du journal : Many pathways to apoptosis: E2F1 regulates splicing of apoptotic genes. **Cell Death and Differentiation**, Volume 15, 2008, Pages 1813-1814. K. Korotayev and D. Ginsberg.

E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35

G Merdzhanova^{1,2}, V Edmond^{1,2}, S De Seranno^{1,2}, A Van den Broeck^{1,2}, L Corcos³, C Brambilla^{1,2}, E Brambilla^{1,2}, S Gazzeri^{1,2} and B Eymin^{*,1,2}

The transcription factor E2F1 has a key function during S phase progression and apoptosis. It has been well-demonstrated that the apoptotic function of E2F1 involves its ability to transactivate pro-apoptotic target genes. Alternative splicing of pre-mRNAs also has an important function in the regulation of apoptosis. In this study, we identify the splicing factor SC35, a member of the Ser-Rich Arg (SR) proteins family, as a new transcriptional target of E2F1. We demonstrate that E2F1 requires SC35 to switch the alternative splicing profile of various apoptotic genes such as *c-flip*, *caspases-8* and *-9* and *Bcl-x*, towards the expression of pro-apoptotic splice variants. Finally, we provide evidence that E2F1 upregulates SC35 in response to DNA-damaging agents and show that SC35 is required for apoptosis in response to these drugs. Taken together, these results demonstrate that E2F1 controls pre-mRNA processing events to induce apoptosis and identify the SC35 SR protein as a key direct E2F1-target in this setting.

Cell Death and Differentiation (2008) 15, 1815–1823; doi:10.1038/cdd.2008.135; published online 19 September 2008

Pre-mRNA splicing is an essential step for the expression of most genes in higher eukaryotic cells. This process has emerged as an important mechanism of genetic diversity as about 74% of human genes undergo alternative splicing, leading to the production of various protein isoforms.¹ SC35 belongs to the serine/arginine-rich (SR) protein family, one of the most important class of splicing regulators. Members of the SR family have a modular structure consisting of one or two copies of an N-terminal RRM (RNA-recognition motif) followed by a C terminus rich in serine and arginine residues known as the RS domain. They act at multiple steps of spliceosome assembly and participate in both constitutive and alternative splicing.² Together with most of the other splicing factors, SR proteins localize to nuclear subregions termed nuclear speckles.³ Extensive serine phosphorylation of the RS domain has an important function in the regulation of both the localization and the activities of SR proteins.⁴ Although the splicing functions of SR proteins have been well documented *in vitro*, their roles and physiological targets *in vivo* are less well known. However, based on gene targeting experiments demonstrating that they are required for cell viability and/or animal development, SR proteins undoubtedly control essential biological functions.

Apoptosis is one of the cellular processes in which alternative splicing has an important regulatory function. Indeed, a remarkable number of transcripts that encode proteins involved in the apoptotic pathway are subjected to alternative splicing. This usually drives the expression of proteins with opposite functions, either pro- or anti-apoptotic.⁵ Interestingly, changes in

SR protein phosphorylation have been observed upon apoptotic stimulation following activation of the Fas receptor.⁶ In addition, *in vitro* overexpression experiments have suggested a potential role for SR proteins in the control of the splicing of pre-mRNAs encoding apoptotic regulators.^{7–8} Moreover, depletion of the ASF/SF2 SR protein has been reported to induce apoptosis.^{8–9} Nevertheless, whether individual SR proteins are necessary to modulate alternative splicing of mRNAs encoding apoptotic factors remains largely unknown, as well as the factors that control expression and/or activity of SR proteins in this context.

The E2F1 transcription factor belongs to the E2F family encompassing eight members involved in a diverse array of essential cellular functions.¹⁰ E2F1 is best-known for its role in driving cell cycle progression in S phase. In addition, E2F1 can induce apoptosis by mechanisms involving with or without transcriptional function. We previously demonstrated the ability of E2F1 to trigger apoptosis through caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex and showed that E2F1 acts through specific downregulation of the cellular FLICE-inhibitory protein short isoform, c-FLIP_{short}.¹¹ As *c-flip* predominantly encodes two isoforms arising from alternative splicing, namely c-FLIP_{short} and c-FLIP_{long}, we postulated that E2F1 could control the expression and/or activity of some splicing factors. In this study, we identify the SC35 splicing factor as a direct transcriptional target of E2F1 and show that SC35 is involved in the ability of E2F1 to trigger apoptosis through downregulation of c-FLIP_{short}. Importantly, we demonstrate that E2F1 and SC35

¹INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, 38042, France; ²Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, 38041, France and ³INSERM, U613, Brest, 29238, France

*Corresponding author: B Eymin, INSERM U823, Equipe 2: Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Institut Albert Bonniot, BP170, Domain de la merci, 38042 Grenoble, Cedex 09, France. Tel: +33 4 76 54 94 76; Fax: +33 4 76 54 94 13; E-mail: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr

Keywords: alternative splicing; apoptosis; E2F1; SC35; SR proteins

Abbreviations: CAT, chloramphenicol acetyl transferase; ChIP, chromatin immunoprecipitation; Fas L, Fas ligand; FLIP, FLICE inhibitory protein; MEF, murine embryonic fibroblast; p54nrb, p54 nuclear RNA-binding protein; PSF, polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor; RRM, RNA recognition motif; siRNA, small interfering RNA; SR, ser-rich; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

Received 22.1.08; revised 13.8.08; accepted 14.8.08; Edited by B Dynlacht; published online 19.9.08

also cooperate to switch the alternative splicing pattern of *caspases-8* and *-9* as well as of *Bcl-x*, towards the expression of pro-apoptotic isoforms. Finally, we provide evidence that E2F1 promotes the accumulation of SC35 in cells treated with DNA-damaging agents, and show that SC35 is required for induction of apoptosis in this setting. Taken together, these results demonstrate that E2F1 and SC35 proteins control pre-mRNA processing events to promote apoptosis.

Results

E2F1 upregulates SC35 protein expression. We previously established a model of stable E2F1-inducible clones in the H358 cell line derived from a human lung adenocarcinoma.¹¹ Here, we exploit this model to test whether E2F1 can control the expression pattern of three members of the SR protein family, one of the most important class of splicing regulators, namely SC35, SRp20 and SF2/ASF. Immunoblotting experiments demonstrated a 3 to 4-fold increased expression of SC35 in cells overexpressing E2F1, whereas the total level of SRp20 and SF2/ASF was not affected (Figure 1a, left panel). This effect required the DNA-binding activity of E2F1 as overexpression of an E2F1(E132) DNA-binding defective mutant did not affect SC35 protein level (Figure 1a, right panel).

To confirm these data, we knocked down E2F1 expression by using small interfering RNAs (siRNAs) in the H69 and H810

neuroendocrine lung carcinoma cell lines that physiologically express high levels of E2F1, and analyzed SC35, SRp20 and SF2/ASF expression by western blotting. As shown in Figure 1b, the silencing of E2F1 was accompanied by marked downregulation of the endogenous SC35 protein in both cell lines as compared with cells transfected with *mismatch* siRNA. In contrast, the expression of SRp20 and SF2/ASF proteins was not affected. In addition, we observed that SC35 protein levels were strongly reduced in E2F1 knockout murine embryonic fibroblast (MEF) as compared with wild-type MEF, whereas those of SRp20 and SF2/ASF did not change (Figure 1c). Taken together, these data demonstrate that SC35 expression is positively regulated by E2F1.

SC35 is a direct transcriptional target of E2F1. To test whether E2F1 controls SC35 expression at the transcriptional level, we performed reverse transcription (RT)-PCR experiments using primers localized at the 5'-end of the *sc35* ORF. The data showed that expression of *sc35* mRNA was induced by E2F1 but not by the mutant E2F1(E132) (Figure 2a). To go further, we performed Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) experiments using a pR264-CAT plasmid that contains the 1 kb human *sc35* promoter upstream of CAT cDNA.¹² Co-transfection of H1299 (Figure 2b) or SAOS2 (data not shown) cells with pR264-CAT vector and increasing amounts of an E2F1 expression vector resulted in a dose-dependent increase of CAT activity. These results indicated that E2F1 can transactivate the promoter of *sc35*.

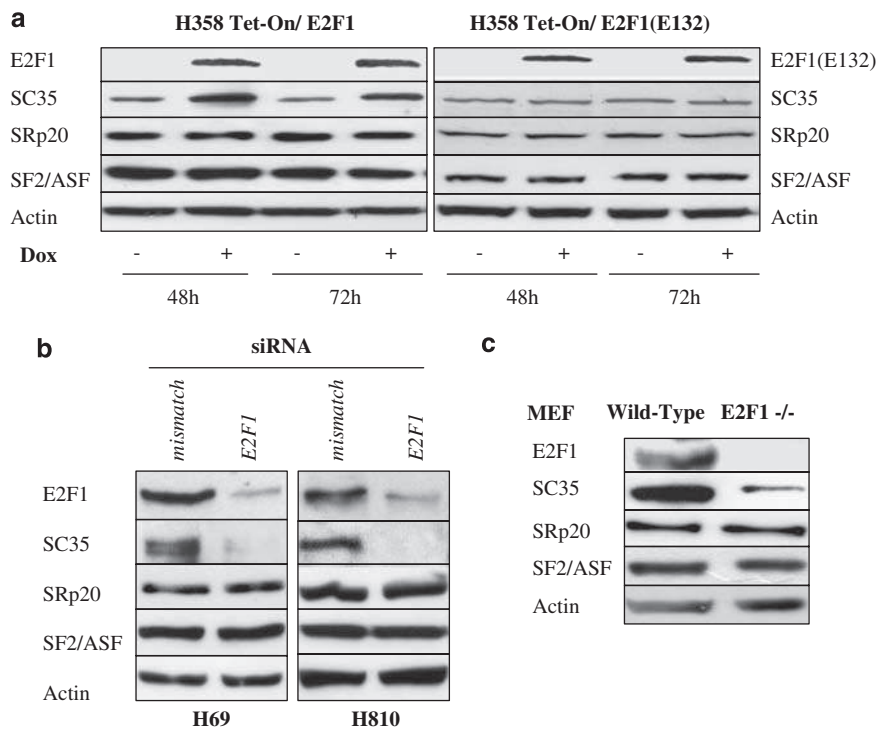


Figure 1 SC35 is upregulated following E2F1 induction. **(a)** H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1(E132) cells were incubated for indicated times in the presence (+) or absence (–) of 1 μ g/ml doxycycline (Dox). Mutant E2F1(E132) is unable to bind DNA. Expression of E2F1, SC35, SRp20 and SF2/ASF proteins was studied by western blotting. Actin was used as a loading control. **(b)** H69 and H810 neuroendocrine lung carcinoma cell lines were transfected for 72 h with *mismatch* or *e2f1* siRNAs as indicated and subjected to western blot analyses for the detection of E2F1, SC35, SRp20 and SF2/ASF proteins. Actin was used as a loading control. **(c)** Western blot analyses of E2F1, SC35, SRp20 and SF2 protein expression in E2F1-deficient (E2F1 $-/-$) and wild-type control Murine Embryonic Fibroblasts (MEFs). Actin was used as a loading control.

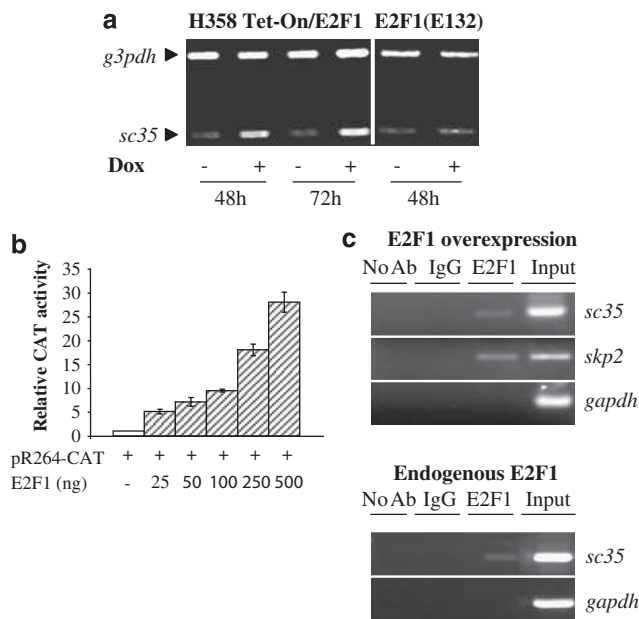


Figure 2 SC35 is a direct transcriptional target of E2F1. (a) RT-PCR analysis of *sc35* mRNA. H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1 (E132) cells were incubated for 48 or 72 h in the presence (+) or absence (–) of 1 μ g/ml doxycyclin (Dox) as indicated. Total RNAs were extracted as described in the Material and Methods section. Amplified *g3pdh* was used as an internal control. (b) Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) experiments were performed in the H1299 cell line co-transfected for 48 h with 1 μ g pR264CAT plasmid, encoding CAT under the control of the *sc35* promoter, and increasing amounts of pCMV-E2F1 as indicated. The CAT activity obtained in cells transfected with pR264CAT alone was normalized to 1 and a relative CAT activity was then calculated for each condition. Representative data of at least three independent experiments performed in duplicate are shown. (c) Upper panel: H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence of doxycyclin for 48 h were processed for ChIP analysis using C-20 antibody for E2F1. The coprecipitated chromatin DNA was analyzed by semiquantitative PCR using pair of primers that amplify the human *sc35*, *skp2* or *Gapdh* promoter respectively, as described in the Material and Methods section. IgG was used as an irrelevant antibody. No Ab means that no antibody was used in this case. Input lane corresponds to PCRs containing 1% of total amount of chromatin used in immunoprecipitation reactions. As compared to input amount, 0.13 and 0.3% of chromatin was immunoprecipitated by E2F1 antibody at the *sc35* and *skp2* promoters respectively. Lower panel: Similar ChIP analyses were performed in H1299 cells to detect the binding of endogenous E2F1 to the *sc35* promoter. The input control corresponds to 0.7% of the amount of chromatin used per immunoprecipitation. As compared to input amount, 0.035% of chromatin was immunoprecipitated by E2F1 antibody

To confirm these data *in vivo*, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments in the H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence of doxycyclin (Figure 2c, upper panel). As a positive control of ChIP assays, we used the proximal human *Skp2* promoter that was recently reported as a target of E2F1.¹³ In our conditions, binding of E2F1 to the proximal *Skp2* gene promoter was clearly detected whereas no binding was observed with the *Gapdh* promoter (Figure 2c, upper panel). Importantly, the *sc35* promoter fragment (–296/–79) that encompasses two putative E2F1-binding sites was precipitated by an anti-E2F1 antibody (Figure 2c, upper panel). To confirm that SC35 was a direct target of E2F1, endogenous E2F1 was immunoprecipitated from H1299 cells and ChIP experiments were performed. As shown (Figure 2c, lower panel),

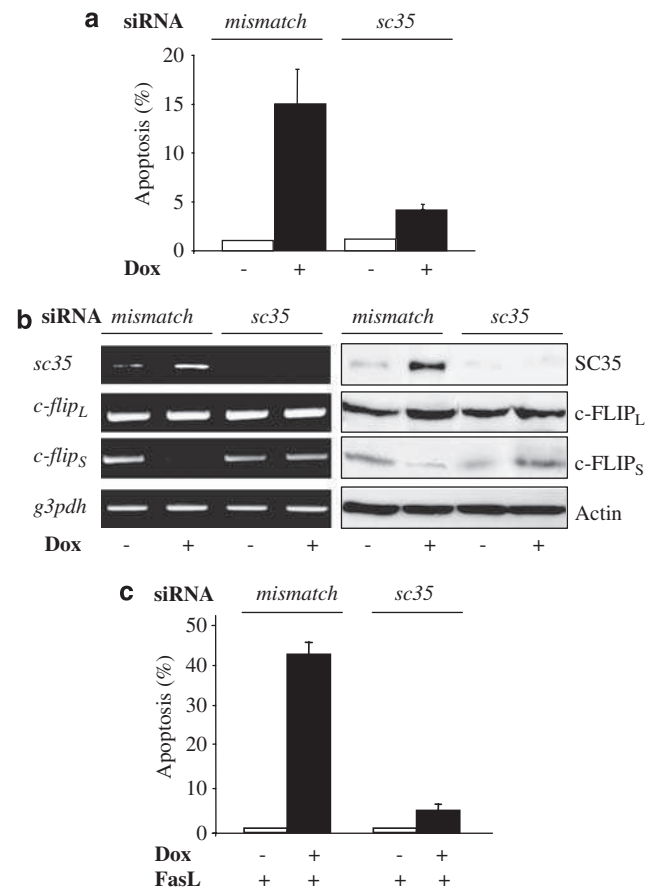


Figure 3 SC35 is required for E2F1-induced apoptosis. H358 Tet-On/E2F1 cells were cultured in the presence (+) or absence (–) of doxycyclin for 72 h. (a) H358 Tet-On/E2F1 cells were transfected for 72 h either with *mismatch* or *sc35* siRNA. Apoptosis was evaluated using Hoechst staining. Results shown are the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. (b) H358 Tet-On/E2F1 cells were transfected for 72 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA and subjected to RT-PCR (left panel) and western blot (right panel) analyses. (c) H358/Tet-On/E2F1 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA, cultured with (+) or without (–) doxycyclin as indicated, and treated or not with 25 ng/ml FasL for 20 additional hours. Apoptosis was evaluated as in (a)

endogenous E2F1 clearly bound to the *sc35* promoter in these cells. Taken together, these results identify *sc35* as a direct transcriptional target of E2F1.

E2F1 promotes SC35-dependent apoptosis through modulation of FLIP_{long}/FLIP_{short} ratio. As we previously demonstrated the ability of E2F1 to induce apoptosis through downregulation of the c-FLIP_{short} protein isoform,¹¹ we next analyzed whether SC35 has a function in this setting. By the use of *sc35* siRNAs and Hoechst staining, we first observed that neutralization of SC35 strongly reduced the number of apoptotic cells in response to E2F1 (Figure 3a). Therefore, these results indicated that SC35 is required for E2F1-induced apoptosis. Importantly, RT-PCR (Figure 3b, left panel) and immunoblot analyses (Figure 3b, right panel) revealed that downregulation of both *flip_{short}* mRNA and protein levels were also prevented in these conditions. A high level of both c-FLIP protein isoforms has been found in many

tumor cells and was correlated with resistance to FAS- and TRAIL-induced apoptosis, two death receptor ligands.¹⁴ Consistently, we previously reported that the down-regulation of c-FLIP_{Short} by E2F1 was sufficient to restore the sensitivity of tumor cells to these ligands.¹¹ In this study, we showed that neutralization of *sc35* expression overrode the ability of E2F1 to sensitize H358 cells to FasL (Figure 3c) as well as to TRAIL (data not shown) treatments. Collectively, our data demonstrate that E2F1 induces apoptosis through SC35-dependent modulation of the FLIP_{Long}/FLIP_{Short} ratio, at the expense of the FLIP_{Short} protein isoform.

E2F1 and SC35 co-regulate the splicing pattern of *caspase-8*, *caspase-9* and *Bcl-x* pre-mRNAs in favor of pro-apoptotic splice variants. As the expression of numerous apoptotic genes is regulated by pre-mRNA alternative splicing,⁵ we undertook a series of experiments to test whether E2F1 and SC35 can also affect the ratio of other apoptotic splice variants. Various *caspases* are subjected to alternative splicing. Alternative splicing of *casp-2* proceeds through selective insertion or removal of exon 9 giving rise to anti-apoptotic caspase-2S and pro-apoptotic caspase-2L isoforms respectively.⁷ The use of a distant splice donor site at the 3'-end of exon 8 of human *caspase-8* pre-mRNA leads to the synthesis of an alternative splice variant, *caspase-8L*, a competitive inhibitor of caspase-8.^{15–16} The inclusion or exclusion of an exon cassette in *caspase-9* causes the expression of two splice variants, namely the pro-apoptotic *caspase-9a* and anti-apoptotic *caspase-9b*.^{17–18} To assess whether E2F1 induces changes in the alternative splicing profile of these *caspases* pre-mRNAs, RNAs recovered from non-induced or induced H358/Tet-On/E2F1 cells were analyzed by RT-PCR using primers specific for each caspase splice variant (Figure 4a). The results showed that E2F1 increased the expression of pro-apoptotic *caspases-2L*, *-8a* and *-9a* mRNA levels and decreased those of anti-apoptotic *caspases-8L* and *-9b* (Figure 4b). In contrast, these effects were not observed with mutant E2F1(E132). Interestingly, we were unable to detect the *caspase-2S* transcript in our cells. Altogether, these data indicate that E2F1 can switch the splicing pattern of *caspases-8* and *-9* in favor of pro-apoptotic isoforms. Therefore, besides its ability to transactivate *caspases-8* and *-9* genes,¹⁹ E2F1 also controls their alternative splicing.

Bcl-x is a member of the *bcl-2* gene family that also has a key function in apoptosis. Several splice isoforms of *Bcl-x* have been reported. The use of a 5' proximal site generates the Bcl-x_L long isoform, which protects cells against apoptosis. In contrast, the use of a 5' distal site results in the synthesis of a short pro-apoptotic Bcl-x_S isoform.²⁰ To analyze whether E2F1 regulates the splicing pattern of Bcl-x, we performed RT-PCR analysis with specific primers in H358/Tet-On/E2F1 cells (Figure 4a). The results showed that expression of E2F1 induced a concomitant decrease of Bcl-x_L and increase of Bcl-x_S mRNA levels (Figure 4c, upper panel). As was observed for *caspase* regulation, the mutant E2F1(E132) had no effect on *bcl-x* splicing. Western blotting with Bcl-x antibodies specific for each isoform confirmed the RT-PCR results (Figure 4c, lower panel). Therefore, these

data demonstrate that E2F1 also controls the alternative splicing of Bcl-x.

Finally, we investigated whether SC35 was involved in these effects. siRNAs targeting *sc35* were transfected in H358/Tet-On/E2F1 cells, and expression of *caspases* and *Bcl-x* splice variants was analyzed by RT-PCR. In the absence of E2F1 induction, the knockdown of *sc35* using two independent siRNAs (Figure 4d and Supplementary Figure 1) did not significantly alter the level of *caspases-8L*, *-8a*, *-9a* or *-9b* mRNAs, nor that of Bcl-x_L or Bcl-x_S. Importantly, the induction of E2F1 expression in these cells deprived of SC35 did not affect the splicing pattern of these genes (Figure 4d and Supplementary Figure 1). Furthermore, when we performed RT-PCR analyses in A549 cells transiently transfected with a vector encoding SC35, we found that overexpression of SC35 affected the splicing profile of *caspase-8*, *-9* and *Bcl-x* pre-mRNAs in a similar way than did E2F1 (compare Figure 4e to b and c) and induced apoptosis (data not shown). Altogether, these results demonstrate that E2F1 requires SC35 to regulate the pre-mRNA alternative splicing of apoptotic genes.

E2F1 and SC35 proteins are upregulated and required for apoptosis in response to genotoxic stresses. So far, our results demonstrate the ability of overexpressed E2F1 and SC35 to modify the splicing pattern of various apoptotic genes. Thus, we next attempted to identify in which physiological context both proteins could cooperate to induce apoptosis. It is now well-known that DNA-damaging agents stabilize E2F1 and induce its transcriptional activity towards apoptotic genes thereby causing apoptosis.^{21–22} In agreement with previous reports, treatment of H358 cells with either methylmethanesulfonate or cyclophosphamide, two alkylating agents that create inter-strand DNA cross-links, significantly increased E2F1 expression as detected by immunoblotting (Figure 5a, upper panel). In these conditions, upregulation of E2F1 was accompanied by an increase of SC35 protein and mRNA expression (Figure 5a, upper panels), as well as by the induction of apoptosis (Figure 5a, lower panel). In cyclophosphamide-treated cells, the neutralization of E2F1 using siRNAs prevented the accumulation of SC35 (Figure 5b), indicating that E2F1 was involved in SC35 induction. In addition, as detected by ChIP experiments, the binding of endogenous E2F1 to the *sc35* promoter was increased following drug treatment, indicating that SC35 is a direct target of E2F1 in response to DNA-damaging agents (Figure 5c). Furthermore, inhibiting SC35 expression strongly repressed apoptosis following cyclophosphamide treatment, as detected by immunoblotting of pro- or cleaved caspase-3 and Hoechst 33342 staining (Figure 5d). Taken together, these results demonstrate that E2F1 requires SC35 to induce apoptosis in response to genotoxic stresses.

Finally, we analyzed whether E2F1 and SC35 acted through regulation of the alternative splicing of apoptotic genes and studied the expression pattern of *caspases-2*, *-8* and *-9* as well as *Bcl-x* splice variants by RT-PCR following cyclophosphamide treatment. As shown in Figure 6a (left panel), an increase of pro-apoptotic *caspase-9a* and Bcl-x_S mRNA levels was observed in cyclophosphamide-treated

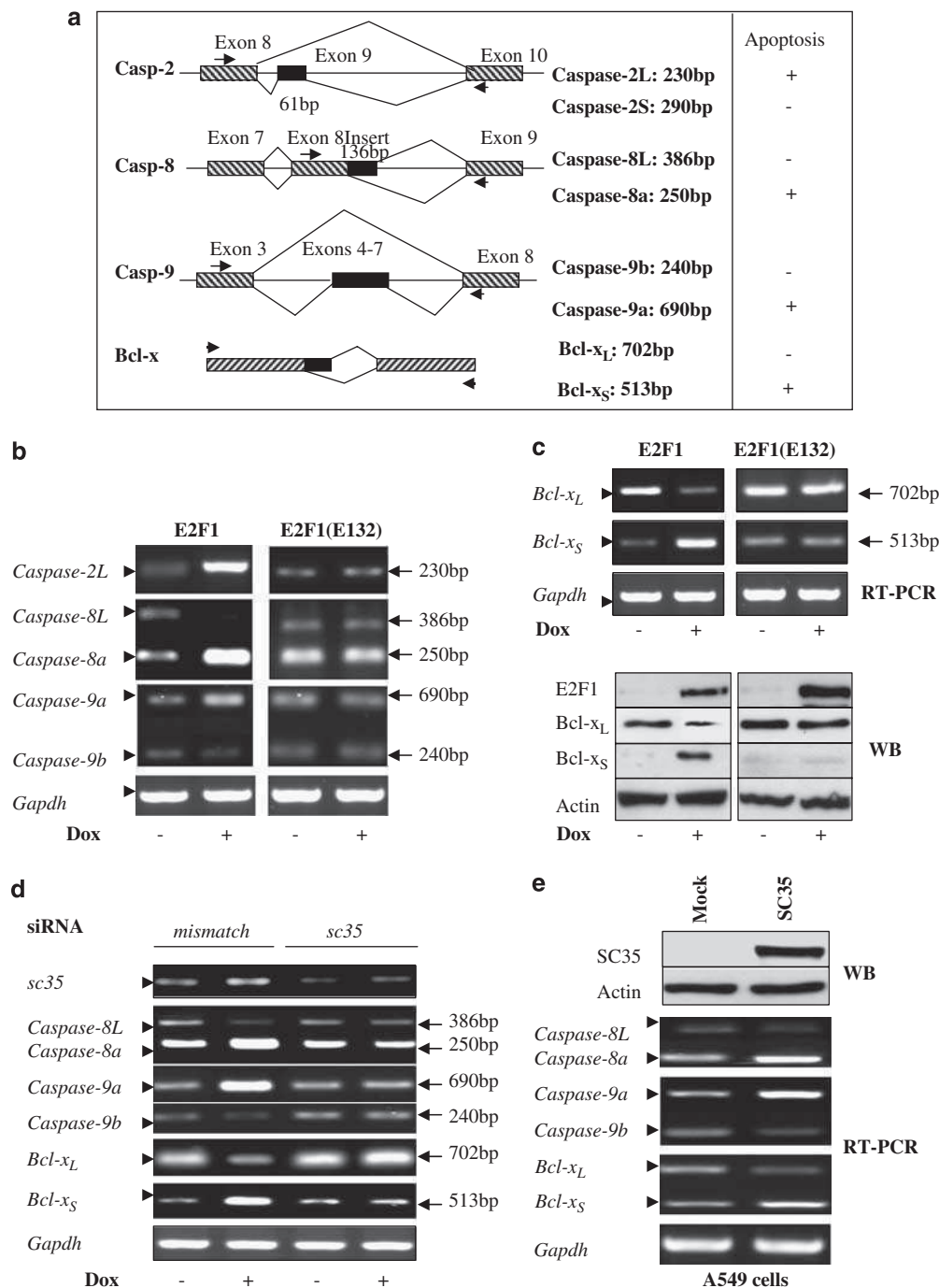


Figure 4 E2F1 and SC35 cooperate to affect the alternative splicing pattern of *caspase-8*, *caspase-9* and *Bcl-x* pre-mRNAs. (a) Alternative splicing patterns of *caspases-2*, *-8*, *-9* and *Bcl-x* primary transcripts. Coding and alternative exons are indicated by ■ and □, respectively. The position of primers, the expected sizes (in nucleotides) and the names of the RT-PCR products corresponding to the different mRNA isoforms are indicated. The ability of each transcript to encode pro-apoptotic (+) or anti-apoptotic (–) protein isoform is depicted on the right. (b, c) H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1(E132) cells were cultured for 48 h in the presence (+) or absence (–) of doxycycline, as indicated. Total RNAs were extracted and subjected to RT-PCR analyses using the specific primers depicted in (a). Representative agarose gels of RT-PCR products corresponding to *casp-2*, *casp-8*, *casp-9* and *Bcl-x* splice variants are presented. The position of splice variants (in bp) is shown on the right, and the various splicing isoforms are named on the left of each panel. *g3pdh* was used as an internal control. (c) Lower panel: western blot analysis was performed using specific anti-E2F1, anti-Bcl-x_L and anti-Bcl-x_S antibodies. Actin was used as a loading control. Results are representative of three independent experiments. (d) H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence (+) or absence (–) of 1 μ g/ml doxycycline were transfected for 72 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA and processed as in (b). (e) A549 human lung adenocarcinoma cells were transiently transfected for 48 h with 10 μ g pcDNA3.1/SC35 or control (Mock) vector and processed as in (b). Upper panel: immunoblot demonstrating the accumulation of SC35 in cells transfected with pcDNA3.1/SC35 as compared with mock transfected cells. Actin was used as a loading control

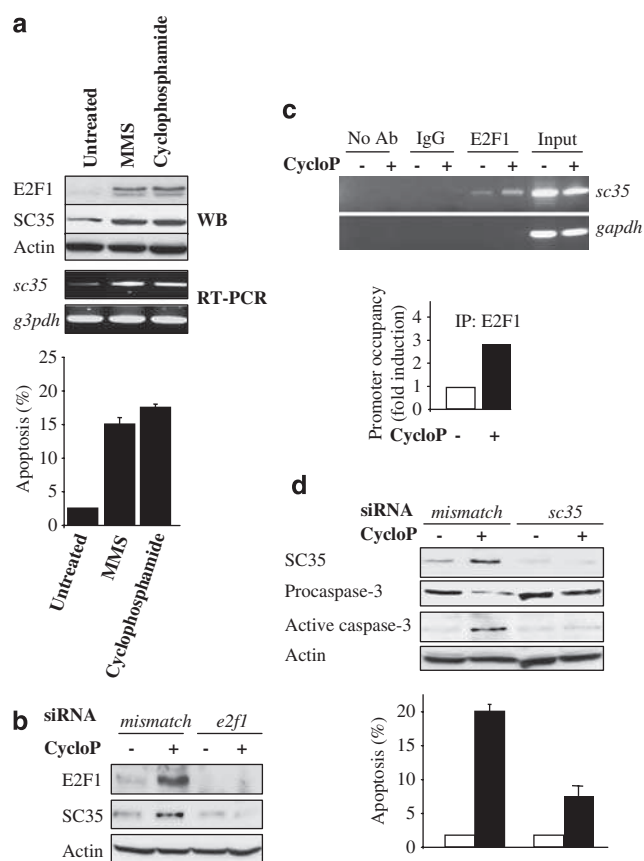


Figure 5 E2F1 and SC35 proteins are upregulated in cells undergoing apoptosis in response to DNA damaging agents. **(a)** H358 cells were treated or not for 24 h with the indicated cytotoxic agents (50 μ M, each) and analyzed for E2F1 and SC35 protein levels by western blotting (upper panel). *sc35* mRNA level was studied by RT-PCR in the same conditions (lower panel). Actin and *g3pdh* were used as internal controls for immunoblotting and RT-PCR experiments, respectively. Apoptosis was evaluated after Hoechst 33342 staining. Results shown are the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. **(b)** H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *e2f1* siRNA and treated (+) or not (–) for additional 24 h with cyclophosphamide (50 μ M). Western blot analyses were performed for E2F1 and SC35 detection. **(c)** Upper panel: H358 cells were treated or not for 24 h with cyclophosphamide (50 μ M) and ChIP analyses were performed using C-20 antibody for E2F1 and primers specific for the human *sc35* or *Gapdh* promoter respectively. IgG was used as an irrelevant antibody. No Ab means that no antibody was used in this case. The input reaction represents 0.5% of the total chromatin immunoprecipitated for each sample. As compared with input amount, 0.04 and 0.12% of chromatin was immunoprecipitated by E2F1 antibody at the *sc35* promoter level in untreated and treated cells respectively. Lower panel: Bands obtained with E2F1 ChIP DNA samples were quantified and normalized relative to the corresponding input DNA sample. *Sc35* promoter occupancy in non-treated cells was arbitrarily set at 1. **(d)** H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA and treated (+) or not (–) for 24 additional hours with cyclophosphamide (50 μ M). Apoptosis was evaluated after Hoechst 33342 staining and immunoblotting with anti-caspase-3 or cleaved caspase-3 antibody. Results are the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments

cells together with a decrease of anti-apoptotic *caspase-9b* and *Bcl-x_L* splice variants. Again, immunoblotting experiments confirmed the downregulation and upregulation of *Bcl-x_L* and *Bcl-x_S* proteins, respectively (Figure 6a, right panel). In contrast, accumulation of *caspase-2L* and of both anti- and pro-apoptotic *caspase-8L* and *-8a* transcripts was detected in cyclophosphamide-treated cells (Figure 6a, left

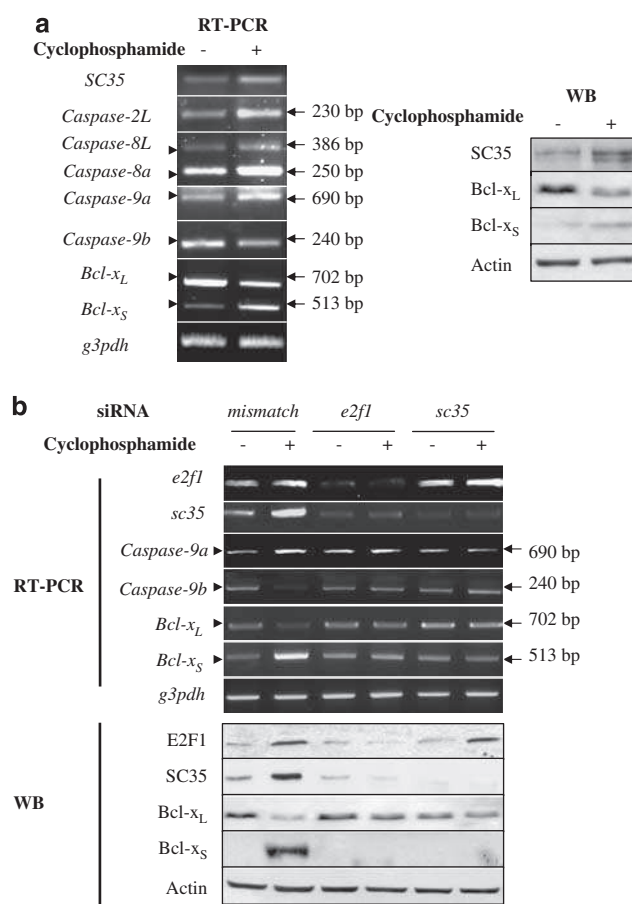


Figure 6 E2F1 and SC35 regulate the alternative splicing pattern of *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs in response to cyclophosphamide treatment. **(a)** H358 cells were treated (+) or not (–) for 24 h with cyclophosphamide (50 μ M). Left panel: RT-PCR analysis for detection of *caspases -2, -8, -9* and *Bcl-x* splice variants were performed as described earlier in Figure 4b and c. Right panel: western blot analysis was performed using specific anti-SC35, anti-*Bcl-x_L* and anti-*Bcl-x_S* antibodies. Actin was used as a loading control. **(b)** H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *e2f1* or *sc35* siRNA and treated (+) or not (–) for 24 additional hours with cyclophosphamide (50 μ M). RT-PCR (upper panel) and western blot (lower panel) analyses of *Bcl-x* or *caspase-9* splice variants were performed as previously described. *g3pdh* and actin were used as internal controls for RT-PCR and immunoblotting experiments, respectively

panel). Therefore, these results demonstrate that cyclophosphamide modifies the alternative splicing pattern of *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs in favor of pro-apoptotic splice variants. Importantly, the neutralization of either *e2f1* or *sc35* before cyclophosphamide cell treatment prevented these modifications, as detected by RT-PCR (Figure 6b, upper panel) and western blotting (Figure 6b, lower panel). Overall, these data strongly suggest that E2F1 and SC35 proteins act together during apoptosis of DNA-damaged cells by controlling *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs alternative splicing.

Discussion

E2F1 is a transcription factor that has a critical function in cell cycle progression by favoring entry into S phase. Besides its

function in cell cycle control, E2F1 is also widely accepted as an inducer of apoptosis. It has been well-demonstrated that E2F1 promotes apoptosis through both transcription-dependent and -independent mechanisms. So far, numerous apoptotic genes whose transcription is enhanced by E2F1 have been identified.¹⁰ In this study, we show that E2F1 switches the alternative splicing pattern of key apoptotic genes in favor of their pro-apoptotic splice variants, and identify the SC35 protein, a member of the SR family of splicing regulators, as a key direct target of E2F1. Interestingly, two high throughput studies using ChIP on Chip analysis²³ or DNA microarrays²⁴ previously suggested that SC35 is an E2F1-regulated gene. In this study, we provide the first evidence of a direct functional link between E2F1 and SC35 proteins to regulate cellular apoptosis. Therefore, besides its ability to transactivate pro-apoptotic target genes, E2F1 is also able to control pre-mRNA processing events to induce apoptosis.

It has now emerged from the literature that splicing not only depends on the interaction of splicing factors with their target pre-mRNAs, but is also coupled to transcription.²⁵ Indeed, variations of pol II promoter structure can lead to differences in alternative splicing of the transcript^{26–27} and components of the spliceosome such as the p54nrb (p54 nuclear RNA-binding protein) and PSF (polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor) RNA-binding proteins are involved in both transcription and splicing processes.²⁸ (for review). In addition, transcriptional coregulators of the nuclear receptor family recruited at the promoter level not only enhances the transcriptional activity of this promoter, but also affects the nature of the splice variants produced.^{28–30} Moreover, some transcription factors have been reported to bind to proteins of the spliceosome and/or display dual functions in splicing and transcription.^{31–32} Taken together, these results indicate a function for proteins controlling transcription in splicing regulation. In this study, we demonstrate that the transcription factor E2F1 transactivates the expression of *sc35*, a component of the spliceosome and that both proteins regulate pre-mRNA processing events. Altogether, these results strengthen the connection between the transcriptional and splicing machineries. We show that E2F1 alters the splicing pattern of some of its transcriptional targets such as *c-flip* (Figure 3b), *caspases-8* and *-9* (Figures 4b and d). As an increased level of *caspases-8* and *-9* transcripts was also detected in this context, it is possible that the transactivating functions of E2F1 cooperate with SC35 accumulation to regulate pre-mRNA processing events. Interestingly, the expression of *c-flip* mRNA was apparently not affected by E2F1 in the same conditions (Figure 3a). It was recently shown that the Spi-1/PU.1 transcription factor could modify alternative splicing of a transcriptional target gene, without modulation of its mRNA transcription.³² Therefore, another but not exclusive possibility is that E2F1 acts as a scaffold protein to drive SC35 to the nascent transcribed RNA of some of its target genes, according to the cell-specific promoter occupation model.²⁵

Apoptosis is one of the cellular processes in which alternative splicing has important regulatory functions.⁵ Several components of the splicing machinery have already been implicated in apoptotic processes. For example, depletion

of SF2/ASF⁸ induces apoptosis. In addition, overexpression of SC35 alters the splicing of *caspase-2* mRNA, in favor of the pro-apoptotic isoform accumulation.⁷ Furthermore, phosphorylation of SR proteins, which is known to control their sub-cellular localization as well as their activities, has been reported during apoptosis.^{6–33} However, the upstream signaling molecules that regulate the expression and/or activity of SR proteins during apoptosis, as well as the endogenous targets of SR proteins in this context remain largely unknown. In this study, we provide evidence that E2F1 triggers apoptosis through SC35 accumulation and we demonstrate that both proteins cooperate to affect the splicing pattern of *caspase-8*, *caspase-9*, *flip* and *bcl-x* genes, in favor of pro-apoptotic splice variants. Taken together, our data identify SC35 as a new mediator of E2F1-induced apoptosis and identify some of its endogenous targets in this setting.

Alteration of alternative splicing is believed to contribute to the resistance of tumor cells to chemotherapy, notably through overexpression of anti-apoptotic splice variants.^{34,35} However, the molecular mechanisms involved in such processes remain largely unknown. Importantly, and consistent with a function of SR proteins during the response to DNA damage, it has been previously shown that SC35 accumulates following γ -irradiation.³⁶ In addition, it was recently reported that the expression of SRp55, another member of the SR protein family, is upregulated and required for apoptosis of p53-deficient cells after mitomycin C treatment.³⁷ In this study, we demonstrate that SC35 is upregulated by an E2F1-dependent pathway in response to methylmethanesulfonate or cyclophosphamide treatment. Furthermore, we show that the E2F1 and SC35 proteins are required for apoptosis of DNA-damaged cells and control *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs alternative splicing at the expense of anti-apoptotic splice variants. Therefore, our data strongly suggest that E2F1 and SC35 are key determinants of the cellular response to chemotherapeutic agents.

To conclude, we highlight the first functional connection between the transcription factor E2F1 and a component of the splicing machinery, SC35, in the control of cellular apoptosis. It is well-known that abnormalities in E2F-signalling pathways contribute to tumorigenesis.³⁸ Accordingly, we previously described a differential pattern of E2F1 protein expression in human lung tumors.³⁹ Interestingly, some SR proteins are overexpressed in ovarian cancer⁴⁰ and SF2/ASF was recently assessed as a proto-oncogene in human tumors.⁴¹ Therefore, it remains to be determined whether alterations of both E2F1 and SC35 proteins could cooperate to promote carcinogenesis.

Materials and Methods

Cell lines, treatment, apoptotic assay, plasmids and transfection. A549, H358, H1299 and H69 human lung carcinoma cell lines were cultured as described earlier.⁴² The H810 large cell neuroendocrine lung carcinoma cell line was cultured in 5% CO₂ at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 5% (v/v) FCS, 0.005 mg/ml insulin, 0.01 mg/ml transferrin, 30 nM sodium selenite, 10 nM hydrocortisone, 10 nM β -estradiol and 10 mM HEPES. MEFs wild-type and E2F1^{−/−} were cultured in DMEM (GIBCO) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS. The human lung adenocarcinoma H358/Tet-On/E2F1 and Tet-On/E2F1 (E132) inducible clones were obtained as previously described.¹¹ Apoptosis was evaluated by scoring the percentage of apoptotic cells on 500 cells after Hoechst 33342 staining. Transient transfections were carried out using Eugene 6

Table 1 Sequences of forward and reverse primers as well as PCR conditions used in this study

Primer sequences	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')
sc35	CCACTCAGAGCTATGAGCTACG 94 °C for 30 s; 57 °C for 45 s; 72 °C for 1 min; 30 cycles	ACTCCTTGGTGTAGCGATCC
FLIP _{short}	CGAGGCAAGATAAGCAAGGA 94 °C for 30 s; 58 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 30 cycles	CACATGGAACAATTTCCAAGAA
FLIP _{long}	CTTGGCCAATTTGCCTGTAT 94 °C for 30 s; 58 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 30 cycles	GGCAGAACTCTGCTGTTCC
Caspase-2	TTACCTGCACACCGAGTCAC 94 °C for 30 s; 64 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 28 cycles	TGGTTCTTTCCATCTTGTGGTC
Caspase-8	GGGATACTGTCTGATCATCAAC 94 °C for 30 s; 55 °C for 30 s; 72 °C for 1 min; 32 cycles	GGAGAGGATACAGCAGATGAA
Caspase-9	AGACCAGTGGACATTGGTTC 94 °C for 30 s; 59 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 30 cycles	GGTCCCTCCAGGAAACAAA
Bcl-x	ATGTCTCAGAGCAACCGGGA 94 °C for 1 min; 54 °C for 1 min; 72 °C for 1 min; 25 cycles	TCACTTCCGACTGAAGAGTG
e2f1	TCTCCCCAGAACCGCTGTTT 94 °C for 30 s; 60 °C for 1 min; 72 °C for 1 min; 25 cycles	CGAAGTGGTAGTCGAGGGC

(Roche Diagnostic). Plasmids used in transient transfections were pcDNA3, pCMV-E2F1, pcDNA3-HA-SC35 and pR264-CAT. Recombinant soluble human FLAG-tagged FasL was purchased from Alexis (San Diego, CA, USA). Methanesulfonic acid methyl ester and cyclophosphamide monohydrate were all purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

Antibodies. The anti-E2F1 (C-20), anti-SC35 (H-55) and anti-Bcl-x_L (H5) antibodies were purchased from Santa Cruz, the anti-Bcl-x_S (Ab-1) from Oncogene Research, the anti-E2F1 (KH95) and anti-procaspase-3 from Pharmingen, the anti-FLIP (NF6) from Alexis, the anti-actin (20–33) from Sigma, the anti-SC35 (4F-11) from Euromedex and the anti-SRp20 (7B4) and anti-SF2/ASF from Zymed. Cleaved caspase-3 (Asp175) was from Cell Signaling.

CAT assays. For CAT assay measurements, 2×10^5 cells per well were seeded in duplicate in 6-well plates, and transfected with the pR264CAT plasmid in the presence or absence of increasing amounts of pCMV-E2F1 vector. pR364CAT vector contains the 1 kb human sc35 promoter¹² and encompasses two putative E2F1-binding sites at –170 (TTTGCCCG) and –236 (TTTCGCGG) bp upstream of the transcription start site. Transfection was performed using Eugene 6 according to the manufacturer's instructions, and CAT activity was measured 24–48 h after transfection using CAT ELISA (Roche Diagnostic). CAT activity was then normalized in each sample according to the protein amount.

Chromatin immunoprecipitation experiments. Chromatin immunoprecipitation experiments were performed in H358 cells, H1299 cells or H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence of 1 µg/ml doxycyclin for 24 h. An equal amount of chromatin (25 µg) was precleared and immunoprecipitated with a polyclonal antibody specific for E2F1 (C-20, Santa Cruz) or unrelated rabbit IgG or no antibody, overnight at +4 °C. Co-immunoprecipitated chromatin was analyzed for the presence of sc35 promoter DNA between –296 and –79 bp, upstream of the sc35 transcription start site, by semiquantitative PCR. This fragment encompasses two putative E2F1-binding sites at –170 and –236 bp upstream of the transcription start site. The primers used were as follow: forward 5'-GAGCACCTCCTCTT CCTCTG-3' and reverse 5'-CCGGAATGAAACCTTCTGA-3'. PCR conditions were 94 °C for 3 min, (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s) for 36 cycles, and 72 °C for 10 min. For Skp2 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) promoter analysis, the specific primers used were SKP2-95 5'-CTCCCCGC CTACCCCGTGG-3', SKP2- +135 5'-CAGACCCGCTAAGCCTAGCAACG-3', GAPDH forward 5'-AGCTCAGGCTCAAGACCTT-3' and GAPDH reverse 5'-AA GAAGATGCGGCTGACTGT-3' as previously described.¹³ PCR conditions were 94 °C for 3 min, (94 °C 30 s, 57 °C for GAPDH or 63 °C for Skp2 30 s, 72 °C 30 s) for 36 cycles, and 72 °C for 10 min. Signals obtained on ethidium bromide-stained gels were quantified using ImageJ software and each ChIP DNA sample was normalized according to the corresponding input DNA sample.

Transfection of siRNA oligonucleotides. The sequences designed to specifically target human sc35 and e2f1 RNAs were as follows: sc35(1): 5'-GCG

UCUUCGAGAAGUACGGTT-3'; sc35(2): 5'-UCGUUCGCUUUCACGACAATT-3'; e2f1(1): 5'-GUCACGCUAUGAGACCUCATT-3'; e2f1(2): 5'-ACAAGGCCCGAUC GAUGUUTT-3'. The second siRNA targeting sc35 was from Invitrogen (Stealth Select RNAi, SFRS2, Invitrogen). The scrambled siRNA oligonucleotides used as control for all RNA interference experiments were as follows: 5'-UCGGCUCUUA CGCAUUCATT-3' and 5'-CAAGAAAGGCCAGUCCAAGTT-3'. Cells were transfected with siRNA oligonucleotides duplex using Oligofectamine reagent according to the manufacturer's instruction (Invitrogen). Doxycyclin (1 µg/ml) was added or not in the culture medium 4 h after transfection. The cells were analyzed 48 or 72 h post-transfection. For experiments with cyclophosphamide, cells were transfected for 48 h with *mismatch*, *sc35* or *e2f1* siRNAs, then cyclophosphamide (50 µM) was added in the culture medium for 24 additional hours.

RT-PCR analyses of alternative splice transcripts. Total cellular RNAs were isolated using Trizol reagent (Invitrogen). In all conditions, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using oligo(dT) primer and MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The different primer sequences used in this study as well as the PCR conditions are recapitulated in Table 1. Amplification of a cDNA fragment of G3PDH (Invitrogen) was performed in the same PCR as an internal control. PCR products were run on a 1–2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Immunoblotting and immunoprecipitation experiments. Immunoblotting experiments were performed as described earlier.¹¹

Acknowledgements. We thank Patricia Betton, Pascal Perron and Celine Lampreia for technical assistance. We thank Johann Soret (IGM, Montpellier) for the pECE-SC35HA and Alain Sureau (CGM, Gif sur Yvette) for pR264-CAT plasmids. We thank Didier Auboeuf, Martin Dutertre, Saadi Khochbin, Johann Soret and Jamal Tazi for encouraging discussions and critical reading of this paper. We thank Mary Callanan (INSERM U823) for help with editing. This work was supported by grants from the region Rhône Alpes (Thématique Prioritaire Cancer and Canceropole 2003: Oncocell, Epimed and INACancer), by the Ligue contre le Cancer (Comité de Savoie), by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée), by INCa (PNES, Programme National d'Excellence Spécialisé 2005) and by the Conseil Scientifique National d'AGIR *à dom*. Arnaud van den Broeck was supported by a fellowship from the French Research Ministry. Galina Merdzhanova was supported by fellowships from the French Research Ministry and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Valerie Edmond was supported by a grant from the Conseil Scientifique National d'AGIR *à dom*. Sandrine De Seranno was supported by a grant from INCa.

- Smith CW, Valcarcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 381–388.
- Sanford JR, Ellis J, Caceres JF. Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing. *Biochem Soc Trans* 2005; **33**: 443–446.

3. Spector DL, Fu XD, Maniatis T. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J* 1991; **10**: 3467–3481.
4. Sanford JR, Longman D, Caceres JF. Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Prog Mol Subcell Biol* 2003; **31**: 33–58.
5. Schwert C, Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2005; **19**: 1–13.
6. Utz PJ, Hottelet M, van Venrooij WJ, Anderson P. Association of phosphorylated serine/arginine (SR) splicing factors with the U1-small ribonucleoprotein (snRNP) autoantigen complex accompanies apoptotic cell death. *J Exp Med* 1998; **187**: 547–560.
7. Jiang ZH, Zhang WJ, Rao Y, Wu JY. Regulation of lch-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 9155–9160.
8. Li X, Wang J, Manley JL. Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes Dev* 2005; **19**: 2705–2714.
9. Wang J, Takagaki Y, Manley JL. Targeted disruption of an essential vertebrate gene: ASF/SF2 is required for cell viability. *Genes Dev* 1996; **10**: 2588–2599.
10. DeGregori J, Johnson DG. Distinct and overlapping roles for E2F family members in transcription, proliferation and apoptosis. *Curr Mol Med* 2006; **6**: 739–748.
11. Salon C, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C et al. E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* 2006; **13**: 260–272.
12. Sureau A, Soret J, Vellard M, Crochet J, Perbal B. The PR264/c-myc connection: expression of a splicing factor modulated by a nuclear protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11683–11687.
13. Reichert M, Saur D, Hamacher R, Schmid RM, Schneider G. Phosphoinositide-3-kinase signaling controls S-phase kinase-associated protein 2 transcription via E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2007; **67**: 4149–4156.
14. Tschopp J, Irmiler M, Thome M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**: 552–558.
15. Eckhart L, Henry M, Santos-Beneit AM, Schmitz I, Krueger A, Fischer H et al. Alternative splicing of caspase-8 mRNA during differentiation of human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **289**: 777–781.
16. Himeji D, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hayashi K, Watanabe T, Harada M. Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood* 2002; **99**: 4070–4078.
17. Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL, Wood RE, Obeid LM, Ogretmen B et al. *De novo* ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 2002; **277**: 12587–12595.
18. Massiello A, Chalfant CE. SRp30a (ASF/SF2) regulates the alternative splicing of caspase-9 pre-mRNA and is required for ceramide-responsiveness. *J Lipid Res* 2006; **47**: 892–897.
19. Nahle Z, Polakoff J, Davuluri RV, McCurrach ME, Jacobson MD, Narita M et al. Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 859–864.
20. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turk LA et al. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; **74**: 597–608.
21. Stevens C, Smith L, La Thangue NB. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 401–409.
22. Wang C, Chen L, Hou X, Li Z, Kabra N, Ma Y et al. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 1025–1031.
23. Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA et al. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 2002; **16**: 245–256.
24. Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 2001; **15**: 267–285.
25. Kornblitt AR. Promoter usage and alternative splicing. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 262–268.
26. Cramer P, Pesce CG, Baralle FE, Kornblitt AR. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 11456–11460.
27. Cramer P, Caceres JF, Cazalla D, Kadener S, Muro AF, Baralle FE et al. Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell* 1999; **4**: 251–258.
28. Auboeuf D, Dowhan DH, Dutertre M, Martin N, Berget SM, O'Malley BW. A subset of nuclear receptor coregulators act as coupling proteins during synthesis and maturation of RNA transcripts. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 5307–5316.
29. Auboeuf D, Dowhan DH, Kang YK, Larkin K, Lee JW, Berget SM et al. Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2270–2274.
30. Auboeuf D, Dowhan DH, Li X, Larkin K, Ko L, Berget SM et al. CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 442–453.
31. Chansky HA, Hu M, Hickstein DD, Yang L. Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. *Cancer Res* 2001; **61**: 3586–3590.
32. Guillof C, Gallais I, Moreau-Gachelin F. Spi-1/PU.1 oncoprotein affects splicing decisions in a promoter binding-dependent manner. *J Biol Chem* 2006; **281**: 19145–19155.
33. Kamachi M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, Anderson P, Utz PJ. Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *J Exp Med* 2002; **196**: 1213–1225.
34. Mercatante D, Kole R. Modification of alternative splicing pathways as a potential approach to chemotherapy. *Pharmacol Ther* 2000; **85**: 237–243.
35. Hayes GM, Carrigan PE, Beck AM, Miller LJ. Targeting the RNA splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2006; **66**: 3819–3827.
36. Cardoso RS, Espanhol AR, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. Differential gene expression in gamma-irradiated BALB/3T3 fibroblasts under the influence of 3-aminobenzamide, an inhibitor of pap enzyme. *Mutat Res* 2002; **508**: 33–40.
37. Filippov V, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. The early response to DNA damage can lead to activation of alternative splicing activity resulting in CD44 splice pattern changes. *Cancer Res* 2007; **67**: 7621–7630.
38. Johnson DG, Degregori J. Putting the oncogenic and tumor suppressive activities of E2F into context. *Curr Mol Med* 2006; **6**: 731–738.
39. Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene* 2001; **20**: 1678–1687.
40. Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB, Watermann DO, Kieback DG, Stamm S et al. Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 2004; **11**: 1085–1090.
41. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 2007; **14**: 185–193.
42. Salon C, Merdzhanova G, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B. E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors. *Oncogene* 2007; **26**: 6927–6936.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

Editorial

Many pathways to apoptosis: E2F1 regulates splicing of apoptotic genes

K Korotayev¹ and D Ginsberg^{*,1}

Cell Death and Differentiation (2008) 15, 1813–1814; doi:10.1038/cdd.2008.155

E2F transcription factors are best known for their ability to determine the timely expression of many genes required for entry into and progression through the S phase of the cell cycle. However, it is now clear that E2Fs function in a wide range of biological processes, including DNA replication, mitosis, the mitotic checkpoint, DNA damage checkpoints, DNA repair, differentiation and development.¹

In addition, at least one member of the E2F family, E2F1, can induce apoptosis through a number of p53-dependent and -independent mechanisms.² E2F1-induced apoptosis is attributed mainly to E2F-mediated upregulation of various pro-apoptotic genes. The growing list of death-inducing E2F1-regulated genes includes genes encoding Apaf1, caspases, BH3-only proteins, the p53 family member p73 and p53 pro-apoptotic cofactors such as ASPP1 and ASPP2.² Certain studies show that transactivation-defective E2F1 mutants are capable of inducing apoptosis efficiently, indicating that, at least in some settings, E2F1 employs transactivation-independent mechanisms to promote apoptosis. Indeed, as well as transactivating gene expression, E2F1 is capable of derepressing and repressing gene expression. For example, E2F1 can sensitize cells to apoptosis by inhibiting survival signals, in particular those mediated by the transcription factor NF- κ B or by Bcl-2 and its family member Mcl-1, the latter encoded by a gene transcriptionally repressed by E2F1. Thus, through a combination of activation, derepression and repression of transcription, E2F1 regulates gene expression and directs apoptosis. Furthermore, E2F1 has been proposed to possess transcription-independent activities that promote apoptosis.³

A new paper in *Cell Death and Differentiation* extends our understanding of how E2F1 shapes gene expression to affect apoptosis.⁴ Eymin and colleagues⁴ show that E2F1 controls alternative splicing of apoptotic genes through direct transcriptional upregulation of the splicing factor SC35 (also named SFRS2), a member of the serine/arginine-rich (SR) family of splicing factors. Members of the SR family play vital roles in both constitutive splicing and regulated alternative splicing. Apoptosis is one of the cellular processes in which alternative splicing plays a pivotal regulatory role: a large number of apoptotic factors are regulated by alternative splicing that results in the production of discrete protein

isoforms with often antagonistic functions, namely pro- and antiapoptotic.⁵ Indeed, a number of splicing factors have been shown earlier to influence apoptosis. For example, depletion of SF2/ASF induces apoptosis and, conversely, its ectopic expression protects from apoptosis.^{6,7} Also, ectopic expression of SC35 was shown to affect alternative splicing of caspase 2 and to induce apoptosis.⁸ Moreover, recent studies have suggested that splicing can sometimes be coupled to transcription. In particular, some transcription factors bind components of the spliceosome or exhibit dual functions in splicing and transcription.⁹ However, the work of Eymin and colleagues identifies a different effect of a transcription factor on splicing, namely that E2F1 regulates expression of the splicing factor SC35, which in turn determines the ratio of pro-apoptotic to antiapoptotic splice variants.

The capacity of E2F1 to regulate SC35 expression is demonstrated by the positive and negative effects of ectopically elevated and reduced E2F1 levels, respectively, on SC35 expression. The direct nature of this SC35 regulation is supported by data showing E2F1 binds and activates the SC35 promoter. Importantly, knockdown of SC35 inhibits E2F1-induced apoptosis, indicating that SC35 is a pivotal mediator of E2F1-induced apoptosis.⁴ E2F1 was reported earlier to downregulate one isoform of the cellular FLICE-inhibitory protein, c-flip_{short}, and thereby to activate caspase 8 at the death inducing signaling complex (DISC) and sensitize cells to death ligands such as FasL and TRAIL.¹⁰ The relationship between E2F1 and SC35 uncovered by Eymin and colleagues now provides the mechanism underlying this earlier observation. Indeed, knocking down SC35 inhibits the ability of E2F1 to alter the FLIP_{long}/FLIP_{short} ratio in favor of the longer isoform and concomitantly reduces the ability of E2F1 to sensitize cells to death ligands. Notably, the SC35-mediated ability of E2F1 to bias alternative splicing of apoptotic genes in favor of the pro-apoptotic splice variant is not limited to c-FLIP and occurs also for Bcl-x and caspases 8 and 9. Furthermore, DNA damage induces an E2F1-mediated increase in the protein levels of SC35 and, correspondingly, an increase in the pro-apoptotic splice variants of the aforementioned genes. Knockdown of either E2F1 or SC35 abolishes these changes in splicing and inhibits DNA damage-induced apoptosis. Thus, the study of Merdzhanova

¹The Mina and Everard Goodman Faculty of Life Science, Bar Ilan University, Ramat Gan, Israel

*Corresponding author: D Ginsberg, The Mina and Everard Goodman Faculty of Life Science, Bar Ilan University, Ramat Gan 52900, Israel. Tel: +972 3 5318804; Fax: +972 3 7384058; E-mail: ginsbed@mail.biu.ac.il

et al. reveals that E2F1-controlled pre-mRNA splicing events affect DNA damage-induced apoptosis.

Future studies may tell whether the E2F1-SC35 link represents a unique case or just the tip of the iceberg with respect to cross-talk between E2F and splicing. Such cross-talk may include (1) E2F-mediated transcriptional regulation of additional splicing factors; (2) a broader effect of E2F on splicing of apoptosis-related as well as proliferation-related genes; (3) physical interactions between E2F and spliceosome components and (4) effects of splicing factors on the splicing and activities of E2Fs themselves. This latter possibility is supported by studies showing that one of the dimerization partners of E2Fs, DP2, undergoes alternative splicing that affects its subcellular localization,¹¹ and by the observation that E2F6 exhibits alternatively spliced forms.¹² Moreover, studies in *Drosophila* suggest that splicing critically affects the activity of dE2F2, which functions mainly in transcriptional repression. dE2F2 protein levels are severely reduced in cells deficient for the splicing factor SR protein B52 (ortholog of SFRS6), most probably due to defective splicing of the *de2f2* pre-mRNA.¹³

In accordance with the data of Merdzhanova *et al.*, several high-throughput assays have suggested that SC35 is an E2F-regulated gene. Furthermore, in support of broader E2F-splicing cross-talk, high-throughput assays suggest that additional splicing factors are regulated by E2F, including SFRS10, SFRS9 (SRp30c), SFRS17a (XE7), SRP20 (SFRS3), SFRS7 (SR protein 9G8) and SFPQ (PSF)^{14–16} However, these observations have not been investigated further and possible roles for these splicing factors in E2F-mediated biological processes, such as proliferation or apoptosis, remain to be determined. Expression of the splicing factor SRP20 (SFRS3) was suggested earlier to be E2F-regulated;¹⁷ however, Merdzhanova *et al.* demonstrate that expression of SRP20 is not E2F-regulated.⁴ These seemingly contradicting data may represent tissue- and/or species-specific differences in the SRP20 regulation.

Of note, caspases 8 and 9 are transcriptional targets of E2F1, and Eymin and colleagues now show that their splicing is regulated by E2F1. Thus, E2F1 regulates two distinct steps in the generation of these pro-apoptotic proteins. Several additional E2F-regulated apoptotic genes, such as Bim, Apaf1 and Smac/Diablo, undergo alternative splicing and it is tempting to speculate that their splicing may also be E2F1-regulated.

The indirect effect of E2F on splicing, reported by Eymin and colleagues, exemplifies the capacity of E2F to affect post-transcriptional processes. Recent reports have described the ability of E2F to regulate microRNA expression, thereby affecting RNA stability and translation^{18–20} Taken together, these studies suggest that an important, and hitherto unrecognized, feature of E2F function is the regulation of post-transcriptional processes. E2F1 is deregulated and hyperactive in most, if not all, human tumors and levels of some splicing factors, including SC35, are elevated in some tumors. Future studies should evaluate the role of E2F-dependent post-transcriptional events in tumorigenesis.

1. DeGregori J, Johnson DG. *Curr Mol Med* 2006; **6**: 739–748.
2. Iaquinta PJ, Lees JA. *Curr Opin Cell Biol* 2007; **19**: 649–657.
3. Bell LA, O'Prey J, Ryan KM. *Oncogene* 2006; **25**: 5656–5663.
4. Merdzhanova G *et al.* *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1815–1823.
5. Schwert C, Schulze-Osthoff K. *Mol Cell* 2005; **19**: 1–13.
6. Li X, Wang J, Manley JL. *Genes Dev* 2005; **19**: 2705–2714.
7. Karni R *et al.* *Nat Struct Mol Biol* 2007; **14**: 185–193.
8. Jiang ZH *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 9155–9160.
9. Kornblihtt AR. *Adv Exp Med Biol* 2007; **623**: 175–189.
10. Salon C *et al.* *Cell Death Differ* 2006; **13**: 260–272.
11. de la Luna S *et al.* *J Cell Sci* 1996; **109**: 2443–2452.
12. Dahme T *et al.* *Eur J Biochem* 2002; **269**: 5030–5036.
13. Rasheva VI *et al.* *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 3468–3477.
14. Muller H *et al.* *Genes Dev* 2001; **15**: 267–285.
15. Ren B *et al.* *Genes Dev* 2002; **16**: 245–256.
16. Young AP, Nagarajan R, Longmore GD. *Oncogene* 2003; **22**: 7209–7217.
17. Jumaa H, Guenet JL, Nielsen PJ. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 3116–3124.
18. Petrocca F *et al.* *Cancer Cell* 2008; **13**: 272–286.
19. Sylvestre Y *et al.* *J Biol Chem* 2007; **282**: 2135–2143.
20. Woods K, Thomson JM, Hammond SM. *J Biol Chem* 2007; **282**: 2130–2134.

II E2F1 MODIFIE L'EXPRESSION DES VARIANTS D'EPISSAGE PRO- VERSUS ANTI-ANGIOGENIQUES DU VEGF-A DANS LES LIGNEES CELLULAIRES DE CARCINOME PULMONAIRE HUMAINES

II.1 Présentation de l'étude.

Le VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) est l'un des plus puissants facteurs angiogéniques et il se trouve surexprimé dans un grand nombre des tumeurs. Dans l'introduction dans la plupart des tissus, VEGF-A existe sous la forme de multiples isoformes protéiques angiogéniques, résultant de l'épissage alternatif de son ARNm pré-messager et dénommées VEGF_{xxx}. De façon intéressante, une nouvelle famille d'isoformes du VEGF-A a été identifiée récemment. Ces isoformes, nommées VEGF_{xxx}b, possèdent des fonctions anti-angiogéniques et sont sous-exprimées dans certaines tumeurs. Actuellement, les voies de signalisation et les facteurs protéiques contrôlant l'épissage alternatif des isoformes VEGF_{xxx}, ainsi que le "switch" entre les isoformes anti-angiogéniques et pro-angiogéniques du VEGF-A sont inconnues.

Ayant montré un rôle de E2F1 dans le contrôle de l'épissage alternatif de transcrits régulant l'apoptose en coopération avec le facteur d'épissage SC35, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle E2F1 pourrait aussi affecter l'épissage alternatif des isoformes du VEGF-A dans nos modèles d'études. Afin de rechercher un tel effet de E2F1, nous avons utilisé notre modèle cellulaire de clones stables H358 inductibles par la doxycycline pour l'expression de E2F1 n'exprimant pas p53, les lignées cellulaires H1299 (adénocarcinome pulmonaire) et SAOS2 (ostéosarcome humain), ainsi que les lignées cellulaires H69 et H810 qui surexpriment E2F1, dans lesquelles nous avons neutralisé son expression par ARN interférence.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que E2F1 contrôle négativement l'expression des isoformes angiogéniques du VEGF-A sans effet distinct sur l'une ou l'autre des isoformes testées. De plus, nous avons montré que E2F1 réprime l'activité du promoteur du VEGF-A dans ces lignées dépourvues de p53 fonctionnelle. A l'inverse, et de façon inattendue, nous avons montré par RT-PCR, RT-qPCR et Western-blot que E2F1 ne régule pas négativement l'expression des variants anti-angiogéniques VEGF_{xxx}b. Ces résultats

indiquent que E2F1 module le ratio VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b en faveur des isoformes anti-angiogéniques. De façon importante, nous avons confirmé ces résultats "*in vivo*" dans un modèle de xénogreffe chez la souris nude. Concernant le rôle de SC35, nous avons obtenu des résultats indiquant une modification de la balance des isoformes VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b distincte selon le modèle cellulaire envisagé.

II.2 Article 2

The transcription factor E2F1 controls the ratio between pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF-A.

G.Merdzhanova, S. Gout, M. Keramidas, V. Edmond, C. Rome, C. Brambilla, E.Brambilla, S. Gazzeri, B. Eymin. *En preparation*.

The transcription factor E2F1 controls the ratio between pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF-A

Galina Merdzhanova^{1,2}, Stephanie Gout^{1,2}, Michelle Keramidas^{2, 3}, Valerie Edmond^{1,2}, Claire Rome^{2,3}, Christian Brambilla^{1,2}, Elisabeth Brambilla^{1,2}, Sylvie Gazzeri^{1,2} and Beatrice Eymin^{1,2*}.

¹ INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, 38042, France.

² Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, 38041, France.

³ INSERM, U823, Equipe 5 Cibles Thérapeutiques et Diagnostiques et Vectorisation de Drogues dans le Cancer du Poumon, Grenoble, 38042, France.

Running title : E2F1 controls VEGF-A alternative splicing pattern

* Corresponding author:

Dr. Beatrice Eymin

INSERM U823

Equipe 2: Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon

Institut Albert Bonniot, BP170

38042 Grenoble Cedex 09, FRANCE

Tel: +33 4 76 54 94 76 / Fax: +33 4 76 54 94 13

email: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr

To whom requests for reprints should be addressed

Abstract

The transcription factor E2F1 belongs to the E2F family and plays a crucial role in the control of cell growth, by inducing either proliferation or apoptosis depending on the cellular context. Recently, an additional role of E2F1 in the regulation of angiogenesis has been provided, through its ability to inhibit VEGF-A promoter activity in a p53-dependent manner upon hypoxic conditions. Besides its transcriptional control, VEGF-A is also highly regulated by alternative splicing of its pre-mRNA that allows the expression of several VEGF isoforms with both pro-angiogenic (VEGF_{xxx}) and anti-angiogenic (VEGF_{xxx}b) properties. In this study, using several human lung carcinoma cell lines deprived of p53 function, we demonstrate that E2F1, but not a mutant E2F1 unable to bind DNA, downregulates VEGF-A promoter activity in normoxic conditions independently of p53, leading to a strong decrease in VEGF_{xxx} mRNA levels. More importantly, we further show that E2F1 does not down-regulate the expression level of anti-angiogenic VEGF_{xxx}b isoforms, and thus alters the ratio between VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms in favor of anti-angiogenic splice variants. We have recently identified the splicing factor SC35, a member of SR proteins family, as a new transcriptional target of E2F1. We demonstrate that SC35 is required for E2F1-mediated VEGF₁₆₅b upregulation. Finally, we provide evidence that E2F1 overexpression inhibits the growth of human lung carcinoma in xenografted mouse tumor models, decreases tumor vascularization and increases the ratio VEGF₁₆₅b/VEGF₁₆₅. Overall, these findings highlight E2F1 as a regulator of the VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b angiogenic switch in cancer cells.

Introduction

Angiogenesis, the complex process by which new blood vessels arise from the pre-existing vasculature, occurs physiologically during reproduction, embryonic development and wound repair, but also contributes to several pathological processes including arthritis, atherosclerosis, diabetes and cancer (1, 2). Angiogenesis is stimulated by the expression of vascular growth factors, the most angiogenic of which is VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor) that acts on its receptors (VEGF-R1 and VEGF-R2) located on endothelial cells. In tumors, VEGF-A is upregulated by hypoxia (3) or by overexpression of oncogenes (4) and stimulates the migration of endothelial cells, sprouting of blood vessels and generation of new vessels from existing vasculature resulting in sustained blood flow, oxygen supply and waste removal of the growing tumors (5). In addition, VEGF-A regulates the function and physiology of some cancer cells themselves, by acting as an autocrine survival factor for these cells (6, 7). The importance of VEGF-A in cancer is attested by the use of anti-VEGF antibodies that demonstrate clinical benefits in colorectal cancer, renal carcinoma, non small cell lung cancer or breast cancer and are in phase III clinical trials in other cancers (8, 9).

VEGF-A exists as multiple isoforms generically referred as VEGF_{xxx} that result from the pre-mRNA alternative splicing of eight exons (10). Alternative splicing of VEGF-A was initially shown to generate four different isoforms having respectively 121, 165, 189 and 206 amino acids (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆). These isoforms are pro-angiogenic and have been shown to be up-regulated in human tumors. In 2002, a sister family of VEGF-A isoforms termed VEGF_{xxx_b} has been identified (11, 12). VEGF_{xxx_b} isoforms are generated by the use of an alternative 3' splice acceptor site in the final exon 8 of VEGF-A, leading to the synthesis of proteins of the same length as the VEGF_{xxx} isoforms, but with distinct C-terminal six amino acids (11). At the biological level, VEGF_{xxx_b} isoforms are anti-angiogenic and

downregulated in some tumors (11, 13, 14). It has been shown that VEGF_{165b} binds VEGFR-2 and inhibits its downstream signalling pathway (13, 15). Moreover, VEGF_{165b} overexpression inhibits the growth of prostate carcinoma, Ewing's sarcoma and renal cell carcinoma in xenografted mouse tumor models through inhibition of tumor-cell-mediated migration and proliferation of endothelial cells (16). In addition, VEGF_{165b} binds and inhibits bevacuzimab treatment in experimental colorectal carcinoma (17). Therefore, the balance between VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx^b} splice variants appears to play a critical role in both tumor progression and tumor cells response to anti-angiogenic therapies. However, to date, almost nothing is known about the proteins and signalling networks that control the splicing of VEGF pre-mRNA in cancer cells.

The transcription factor E2F1 is a member of the E2F family that comprises eight members. Initially, studies revealed that E2F1 determines the timely expression of many genes required for entry into and progression through the S phase of the cell cycle. However, it has become clear that transcriptional activation of S-phase-related genes is only a facet of E2F1 activity. Indeed, E2F1 functions in a wide range of biological processes, including DNA replication, mitosis, DNA-damage checkpoints, DNA repair, differentiation and apoptosis (18). In addition, E2F1 down-regulates the expression of VEGF promoter activity under hypoxic conditions via a p53-dependent transcriptional mechanism, unraveling an unexpected function of E2F1 in the control of angiogenesis (19). Recently, we provided the first link between E2F1 and pre-mRNA processing events, by identifying SC35, a member of the SR proteins family involved in constitutive and alternative pre-mRNA splicing, as a direct transcriptional target of E2F1. Furthermore, we demonstrated that SC35 and E2F1 proteins cooperate to induce apoptosis through modulation of caspases and bcl-x pre-mRNA splicing (20). Based on these results, we then hypothesized that E2F1 and/or SC35 proteins could control VEGF-A pre-mRNA splicing in a p53-independent manner. Interestingly, during the course of our

experiments, it was demonstrated that ASF/SF2, SRp40 and SRp55 proteins, three members of SR proteins family, control VEGF pre-mRNA splicing in primary epithelial cells (21). In this study, we demonstrate that E2F1 affects the angiogenic switch between pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF-A in favor of anti-angiogenic splice variants both "*in vitro*" but also "*in vivo*" in nude mice. These data support a role of E2F1 in the control of angiogenesis, as well as in the tumor cells response to anti-angiogenic therapies.

Material and Methods

Cell lines, plasmids, transfection and luciferase assays

H358, H1299 and H69 human lung carcinoma cell lines were cultured as previously described (22). SAOS2 human osteosarcoma cell line was cultured in 5% CO₂ at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) FCS, 2mM L-glutamine and 100U/ml penicillin/streptomycin. The human lung adenocarcinoma H358/Tet-On/E2F1 and Tet-On/E2F1(E132) inducible clones were obtained as previously described (23). E2F1 or E2F1(E132) expression was induced upon 1 µg/ml doxycyclin treatment. Transient transfections were carried out using Eugene 6 according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostic). Plasmids used in transient transfections were pcDNA3, pCMV-E2F1, pGL3-Luc and pVp-ecor encoding luciferase under the control of the whole human VEGF promoter [-2362 to +956 relative to the transcription start site (24)]. For luciferase assays, 2x10⁵ cells were seeded in 6-wells plate and transfected for 48 hours with 1µg pVp-ecor in the presence of various amounts of pCMV-E2F1 or *mismatch* or *sc35* siRNA. Cells were lysed in passive lysis buffer and luciferase activity was measured in a luminometer using the luciferase assay system from Promega. Luciferase activity was then normalized in each sample according to the protein amount.

ELISA assays

For the quantitative determination of human VEGF₁₆₅ concentrations in cell culture supernatants, 3×10^5 cells were seeded in 6-wells plate and incubated for 24 or 48 hours before supernatants recovery. The determination of VEGF₁₆₅ concentrations was performed by ELISA assay according to the manufacturer's instructions, using Quantikine VEGF immunoassay (DVE00) from R&D Systems.

Antibodies and immunoblotting experiments

Antibodies used in this study were anti-VEGF_{165b} (ab14994) from Abcam, anti-VEGF₁₆₅ (MAB293) and anti-VEGF_{165b} (MAB3045) from R&D Systems, anti-E2F1 (KH95) from BD Biosciences, anti-E2F1 (C-20) and anti-actin from Santa Cruz, anti-SC35 (4F-11) from Euromedex. For immunoblotting, cells washed three times in PBS or frozen tissue samples were lysed in RIPA buffer (150mM NaCl, 50mM Tris HCl pH 8, 0.1% SDS, 1% Nonidet P40, 0.5% Na deoxycholate, 0.1mM PMSF, 2.5µg/ml pepstatin, 10µg/ml aprotinin, 5µg/ml leupeptin, 0.2mM Na₃VO₄) for 30 min on ice and pelleted. Protein concentration was determined using the Biorad Dc protein assay. Proteins (40-80µg) were then separated in 10-12% SDS-PAGE gels and electroblotted onto PVDF membranes. Membranes were incubated overnight at +4°C with primary antibodies and proteins were detected using horse-radish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). After washing, the blots were revealed using the ECL chemiluminescence method (Amersham, Les Ulis, France).

Transfection of siRNA oligonucleotides

The sequences designed to specifically target human *sc35* and *e2f1* RNAs were as follow:

sc35(1): 5'-GCGUCUUCGAGAAGUACGGTT-3'; *sc35*(2): 5'-UCGUUCGCUUUCACGACAATT-3'; *e2f1*(1): 5'-GUCACGCUAUGAGACCUCATT-3'; *e2f1*(2): 5'-ACAAGGCCCGAUCGAUGUUTT-3'. The scrambled siRNA oligonucleotides used as control for all RNA interference experiments were as follow: 5'-UCGGCUCUUACGCAUUCAATT-3' and 5'-CAAGAAAGGCCAGUCCAAGTT-3'. Cells were transfected with siRNA oligonucleotides duplex using Oligofectamine reagent according to the manufacturer's instruction (Invitrogen). Doxycyclin (1 µg/ml) was added or not in the culture medium 4 hours after transfection. The cells were analyzed 48 or 72 hours post-transfection.

RT/PCR and RT-qPCR analyses

All the primers used in this study for detection of VEGF_{xxx}, neuropilin-1, neuropilin-2 and VEGF_{xxx}b mRNAs in RT-PCR or RT-QPCR are detailed in Tables 1 and 2, respectively. For RT-PCR analysis, total cellular RNAs were isolated using Trizol reagent (Invitrogen). In all conditions, 1 µg of total RNA was reversed transcribed using oligo(dT) primer and MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. For neuropilin-1 detection, the PCR conditions were 94°C for 2 min, 34 cycles (94°C for 45 s, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min) and 72°C for 10 min. For neuropilin-2 detection, the PCR conditions were 95°C for 2 min followed by 39 cycles (94°C for 15 sec, 50°C for 30 sec, 72°C for 30 sec) and 72°C for 7 min. For VEGF_{xxx} amplification (25), the PCR conditions were as follow: 94°C for 2 min, 29 cycles (94°C for 45 sec, 60°C for 1 min, 72°C for 1 min) and 72°C for 10 min. To detect the anti-angiogenic VEGF_{xxx}b splice variants, PCR conditions were 94°C for 2 min, 35 cycles [(96°C for 30 sec, 65°C for 30 sec, 72°C for 1 min) or (96°C for 30 sec, 55°C

for 30 sec, 72°C for 1 min)] for exon4/exon8b or exon7a/exon8b primer set, respectively, and 72°C for 10 min. Amplification of a cDNA fragment of G3PDH (Invitrogen) was performed in the same PCR reaction as an internal control. PCR products were run on a 2-3% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Quantitative real-time RT-PCR was performed on Stratagene MX3005P apparatus. 1 µg of total RNA were subjected to cDNA synthesis with Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix for qPCR (Invitrogen) and subsequently amplified during 40 PCR cycles (10 min at 95°C, cycles: 15 s at 95°C, 1 min at 60°C) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). In parallel, RT-PCR detecting the reference gene Glyceraldehyde-3-Phosphate Deshydrogenase (GAPDH) was performed for each sample. Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of target gene copy number to GAPDH mRNA copy number multiplied by 100, thus normalizing VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b splice variants mRNA expression for sample to sample differences in RNA input. PCR efficiency was assessed for each set of primers and ranged from 106% to 110%.

”In vivo” studies

”In vivo” experiments were conducted onto six-weeks-old female Swiss nude mice (Charles River, France). In all experiments, 20x10⁶ H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On cells were injected subcutaneously into nude mice. One week after injection, the mice were randomized into two groups (7 mice per group), one receiving doxycycline (2 mg/ml) in their drinking water and the second one receiving water only. 7-10 days later, mice were anesthetized and sacrificed by cervical dislocation, the tumors were extracted, weighted and divided into two parts before freezing in order to perform RT-QPCR or immunoblotting experiments. Total RNA was extracted from tumors samples using RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer’s instructions. RNA concentration was determined using Eppendorf

Biophotometer AG22331 (Hamburg, Germany). RT-QPCR analysis of all VEGF isoforms VEGF_{all}, VEGF₁₆₅ and VEGF_{165b} splice variants was performed as described previously. For western blot analysis, tumors were homogenized in RIPA buffer containing proteases and phosphatases inhibitors and immunoblotting was performed on the supernatants as previously described. The extent of vascularization in tumors samples was assessed in RIPA extracts by measuring the amount of hemoglobin using the Drabkin's reagent (Sigma). Results were normalized relative to protein amount in each sample.

Results

E2F1 down-regulates the expression level of VEGF_{xxx} isoforms in p53-deficient human lung adenocarcinoma cell line

In murine model, it was previously demonstrated that under hypoxic conditions E2F1 down-regulates VEGF promoter activity in a p53-dependent manner and decreases VEGF protein level (19). Therefore, we asked whether E2F1 could also control VEGF expression in human tumor cells deprived of functional p53. We took advantage of previously established stable E2F1-inducible clones in the H358 cell line derived from a human lung adenocarcinoma (Salon et al., 2006). In this system, E2F1 or an E2F1(E132) DNA-binding defective mutant is overexpressed upon doxycyclin treatment. As detected using RT-PCR analysis, a significant decrease of VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅ and VEGF₁₂₁ mRNA levels was observed in cells overexpressing E2F1 (Figure 1A). This effect required the DNA binding activity of E2F1 as the mutant E2F1(E132) had no effect. In addition, we found that neuropilin-1 mRNA level slightly increased upon E2F1 induction, while the expression of neuropilin-2 was not affected (Figure 1A). These data are consistent with a recent study identifying neuropilin-1 as an E2F1 transcriptional target gene in a model of cerebral ischemia (26). To confirm these results, we

then performed RT-qPCR experiments using primers specific for each VEGF isoforms or detecting all VEGF isoforms VEGF_{all} (Table 1) (27). Upon E2F1 induction, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉ mRNA levels were strongly down-regulated with about the same magnitude (Figure 1B). In the same conditions, the mutant E2F1(E132) did not affect these transcripts. Then, in order to extend these results at the protein level, VEGF₁₆₅ was detected in the supernatants or total cellular extracts of E2F1 or E2F1(E132)-overexpressing cells using ELISA assay or western blotting, respectively. We found that E2F1 significantly decreased VEGF₁₆₅ protein level both in culture medium (Figure 1C) and cell extracts (Figure 1D), as compared to E2F1(E132). Taken together, these data demonstrate that E2F1 negatively controls VEGF_{xxx} mRNA and protein levels in human lung carcinoma cell line, independently of p53 and in normoxic conditions. Of note, we previously showed that apoptosis occurs in these cells after 72 hours of doxycyclin treatment (23), indicating that E2F1-mediated VEGF-A downregulation precedes apoptosis in this cellular model.

E2F1 down-regulates VEGF_{xxx} expression in the H69 small cell lung carcinoma cell line

In order to extend these data to another cellular model, we knocked-down E2F1 expression by using small interfering RNAs (siRNAs) in H69 cells derived from a small cell lung carcinoma (SCLC) that physiologically express high levels of E2F1 and are mutated for p53. Of note, we previously observed that VEGF is weakly expressed in neuroendocrine lung tumors, particularly in SCLC (28). In these cells, the silencing of E2F1 was accompanied by a significant increase in VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉ mRNA levels as detected by using both RT-PCR (Figure 2A, right panel) and RT-qPCR (Figure 2B) experiments. These data were confirmed by ELISA assay and western blotting. We found that neutralization of E2F1 increased VEGF₁₆₅ protein level in culture supernatants (Figure 2C), as well as in cellular

extracts (Figure 2D). Overall, these results extend to another cellular model the negative effects exerted by E2F1 on VEGF-A expression.

E2F1 inhibits VEGF promoter activity in a p53-independent manner

It has been recently demonstrated that E2F1 down-regulates the expression of VEGF-A promoter activity by associating with p53 in murine fibroblasts (19). Therefore, in order to further understand the mechanisms by which E2F1 inhibited VEGF expression in human lung carcinoma cell lines deprived of functional p53, we analyzed the effect of E2F1 on VEGF promoter activity. To this purpose, we used the 2.4-kb VEGF promoter-luciferase construct (pVp-ecor; Figure 3A). This construct contains the upstream regulatory sequences including HIF-1, E2F1 and Sp1-binding elements and the promoter region of the human VEGF gene (-2362 to +956 relative to the transcription start site) fused to the luciferase reporter gene (24). H1299 human lung adenocarcinoma cell line was transiently co-transfected with pVp-ecor and increasing amounts of plasmid encoding E2F1, and luciferase activity was measured 48h later. As shown in Figure 3B, E2F1 markedly inhibited VEGF promoter activity in a dose dependent manner. In contrast, E2F1 did not affect the activity of a control pGLuc vector. Same results were obtained in another cellular model, the human osteosarcoma cell line SAOS2. In these cells, E2F1 strongly repressed VEGF promoter activity without affecting pGLuc control vector (Figure 3B). In order to confirm these data, the same cells were transiently co-transfected with pVp-ecor or pGLuc, and E2F1 was knocking-down or not by using small interfering RNAs. In both cellular models, neutralization of E2F1 significantly increased VEGF promoter activity as compared to cells transfected with *mismatch* siRNA, but did not affect pGLuc promoter activity (Figure 3C). Taken together, these results demonstrate that E2F1 represses VEGF promoter activity independently of p53 in various human tumor cell lines and in normoxic conditions.

E2F1 does not down-regulate the expression level of VEGF_{xxx}b splice variants

Having demonstrated that E2F1 downregulates the expression level of VEGF_{xxx} splice isoforms, we then examined that of VEGF_{xxx}b isoforms in our stable inducible clone, by first performing RT-PCR experiments. To this purpose, cDNA was amplified using intron-spanning primers that detect VEGF_{165b} only, even in the presence of 1000x greater concentration of VEGF₁₆₅ mRNA (11). The primers used in RT-PCR are described in Table 2 and have been previously validated in several studies (11, 13, 14, 16, 29). Using primers complementary to exons 4 and 8b, we first analyzed the expression level of VEGF_{121b}, VEGF_{145b} and VEGF_{165b} mRNAs in our stable inducible clones. We were able to amplify by RT-PCR using this primer set, only fragments with size consistent with VEGF_{145b} and VEGF_{165b} transcripts, while VEGF_{121b} transcript was not detected (Figure 4B). Strikingly, we observed that both VEGF_{145b} and VEGF_{165b} transcripts increased in response to E2F1 induction, while E2F1(E132) slightly decreased them. Similar results were obtained using another set of primers complementary to exon 7 and exon 7/8b that allows the detection of VEGF_{165b} mRNA (Figure 4B) (14). Therefore, while E2F1 decreases VEGF_{xxx} mRNA and protein levels, it does not affect VEGF_{xxx}b isoforms expression level in the same way. As RT-PCR is not quantitative, we then designed primers in order to perform isoform-specific quantitative PCR (Q-PCR) of VEGF_{121b}, VEGF_{145b}, VEGF_{165b} and both VEGF_{165b/189b} splice variants (Table 2 and Figure 4A). PCR efficiency for all set of primers was comprised between 100-110%. Using these specific sets of primer, we observed that E2F1 did not down-regulate the expression level of VEGF_{xxx}b mRNAs (Figure 3C, left panel). Strikingly, in the same conditions, E2F1(E132) induction significantly decreased VEGF_{xxx}b mRNAs (Figure 3C). Since a dominant negative effect of E2F1(E132) has been previously reported, these results suggest that the binding of E2F1 to DNA is required for expression of VEGF_{xxx}b splice variants mRNAs. In order to confirm these results at the protein level, we then analyzed

VEGF_{165b} protein level by western blotting using the previously characterized anti-VEGF_{165b} antibody (R&D Systems, cat no MAB3045) that demonstrates highly specific binding to recombinant human VEGF_{165b} but not to recombinant human VEGF₁₆₅ (14). This antibody is specific for VEGF_{xxx}b isoforms and can be used to demonstrate expression of VEGF_{165b}, VEGF_{189b}, VEGF_{121b} and VEGF_{145b} proteins but does not recognize VEGF₁₆₅ (13). As compared to uninduced cells, we found that VEGF_{165b} protein level increased in cells overexpressing E2F1, while E2F1(E132) had no effect (Figure 4D). Of note, we tried to confirm these results by performing ELISA assay in order to detect VEGF_{165b} in cells supernatants, but we never succeeded to detect sufficient amount of VEGF_{165b} in our samples. Taken together, these results demonstrate that E2F1 controls the ratio between VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b splice variants and favors the expression of anti-angiogenic VEGF_{xxx}b isoforms.

E2F1 neutralization affects the expression level of VEGF_{xxx}b splice variants in H69 cells

In order to extend these data, E2F1 expression was neutralized by using siRNAs in H69 cells. As detected by RT-PCR, the knock-down of E2F1 was correlated with a significant decrease in the level of VEGF_{165b} and VEGF_{145b} transcripts as compared to *mismatch* transfected cells (Figure 5A). Since E2F1 neutralization increases the expression level of VEGF_{xxx} isoforms in these cells (Figures 2A&B), these results confirm in another cellular model that E2F1 modifies the ratio between VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b splice variants, at the expense of angiogenic VEGF_{xxx} isoforms. Consistently, by using western blotting experiments, we showed that VEGF_{165b} protein level severely decreased in H69 cellular extracts deprived of E2F1 (Figure 5B).

SC35 differentially affects the pattern of VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b splice variants in human lung carcinoma cell lines

We recently identified the splicing factor SC35, a member of the SR proteins family, as a direct transcriptional target of E2F1 (20). In order to test whether SC35 could also control the expression level of VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b splice isoforms, we first knocked-down its expression by using small interfering RNAs in H1299 and H69 human lung carcinoma cell lines, and analyzed VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ and VEGF_{all} mRNA levels by RT-qPCR, as well as VEGF₁₆₅ protein expression by western blotting. In both cell lines, the silencing of SC35 was accompanied by a significant downregulation of VEGF₁₆₅ protein and mRNA levels as compared with cells transfected with *mismatch* siRNA (Figure 6A). In contrast, the expression of VEGF₁₂₁ and VEGF₁₈₉ transcripts was not significantly affected upon SC35 neutralization in these cells. Then, we analyzed the expression level of VEGF_{121b}, VEGF_{145b}, VEGF_{165b} and both VEGF_{165b/189b} transcripts by using RT-qPCR. As shown in Figure 6B, the neutralization of SC35 using siRNAs strongly increased VEGF_{165b} and VEGF_{189b} mRNA levels in H1299 cells. In H69 cells, inhibiting SC35 expression increased VEGF_{121b} without affecting significantly VEGF_{145b}, VEGF_{165b} and VEGF_{189b} mRNA levels (Figure 6B). Using western blotting experiments, we observed that SC35 knock-down correlated with the accumulation of VEGF_{165b} protein in both cell lines (Figure 6C). Finally, we asked whether SC35 was involved in the effects of E2F1 on VEGF splicing pattern. siRNAs targeting *sc35* were transfected in H358/Tet-On/E2F1 cells, and expression of VEGF_{xxx} and VEGF_{165b} splice variants was analyzed by RT-PCR. In the absence of E2F1 induction, we observed that the knockdown of SC35 significantly decreased VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉ mRNA levels without affecting that of VEGF_{165b}, neuropilin-1 or neuropilin-2 (Figure 6D). Importantly, the neutralization of SC35 in cells overexpressing E2F1 prevented E2F1-induced VEGF_{165b} upregulation, as detected using both RT-PCR analysis (Figure 6D, left panel) and western

blotting (Figure 6D, right panel). Taken together, these results demonstrate that SC35 regulates the ratio between pro- versus anti-angiogenic isoforms of VEGF in favor of pro-angiogenic isoforms, but is also required for E2F1-mediated VEGF_{165b} upregulation in H358 human lung carcinoma cells. These data suggest that SC35 could act differentially depending on the cellular models and the co-activated upstream signals.

E2F1 inhibits tumor vascularization and decreases the ratio between VEGF₁₆₅ and VEGF_{165b} isoforms in nude mice

In order to determine whether the activity associated with E2F1 expression in cells grown in culture could be reproduced in tumors, H358/Tet-On and H358/Tet-On/E2F1 cells were injected sub-cutaneously into immunodeficient nude mice receiving or not doxycyclin in their drinking water. 7-10 days after doxycyclin induction, mice were sacrificed, tumors were weighted and total RNAs and proteins were extracted from whole tumoral samples. A marked inhibition of tumor growth was observed in induced mice (receiving doxycyclin in their water) xenografted with H358/Tet-On/E2F1 cells as compared with uninduced mice (receiving only water) (Figure 7A). This effect was specific of E2F1 induction, since growth inhibition was not detected in induced mice injected with H358/Tet-On cells (Figure 7A). In order to test whether E2F1 affected tumor vascularization, the amount of hemoglobin was quantified in whole tumor protein extracts. As shown in Figure 7B, the hemoglobin level decreased in induced mice xenografted with H358/Tet-On/E2F1 cells as compared with uninduced mice. In contrast, doxycyclin did not affect hemoglobin level in tumors derived from H358/Tet-On cells. Furthermore, by using RT-qPCR experiments, we found that the mRNA levels of all VEGF_{xxx} isoforms including VEGF₁₆₅ strongly decreased in tumors overexpressing E2F1 as compared with control H358/Tet-On tumors derived from mice receiving or not doxycyclin in their drinking water (Figure 7C, left and middle panels). In

contrast, VEGF_{165b} mRNA level did not decrease, but rather increased, in tumors overexpressing E2F1, as compared with tumors from induced mice injected with H358 Tet-On cells (Figure 7C, left panel). These effects were confirmed at the protein level by using western blot analysis. Indeed, we observed that VEGF_{165b} protein expression increased in tumors overexpressing E2F1 (Figure 7D). This switch was specific of E2F1 induction since we did not detect VEGF_{165b} accumulation in whole tumor extracts obtained from uninduced or induced H358/Tet-On tumors, as well as from uninduced H358/Tet-On/E2F1 tumors. In all tumor samples, VEGF₁₆₅ protein was hardly detectable using western blotting experiments. Taken together, these results demonstrate that E2F1 increases the expression level of VEGF_{165b} isoform "*in vivo*", thereby modulating the ratio VEGF_{xxx}:VEGF_{xxx}b in favor of anti-angiogenic isoforms.

Discussion

The transcription factor E2F1 was first identified as a crucial regulator of cell cycle progression. However, based on a growing number of studies published this last decade, it is now clear that E2F1 plays numerous other biological roles. Recently, a new function for E2F1 in the control of angiogenesis has been proposed, through the demonstration that mice deficient in E2F1 exhibit enhanced angiogenesis as a result of VEGF overproduction (19). In this model, increased angiogenesis in the absence of E2F1 occurs during both recovery from ischemic injury and tumor growth and is dependent of functional p53. Here, we demonstrate that E2F1 also negatively controls VEGF expression in p53-deficient human lung carcinoma cell lines and is involved in tumor growth inhibition "*in vivo*". More importantly, we highlight E2F1 as a regulator of the switch between pro- versus anti-angiogenic VEGF splice

variants, that favors the expression of anti-angiogenic VEGF_{xxx} isoforms. These results add further evidence for a role of E2F1 in the control of the angiogenic process.

Although VEGF_{xxx} splice variants of VEGF-A were identified in 1989, and there have been other 24,000 manuscripts published on VEGF to date, almost nothing is known about the regulation of splicing of VEGF_{xxx} isoforms. Only three studies have investigated molecules involved in VEGF-A splicing, and of these only SAM68 was a previously identified splice factor (30). The identification of factors that differentially affect the expression of each isoforms has important clinical relevance, since the contribution of each particular VEGF_{xxx} isoform to a specific pattern of tumor vascularization probably depends on tumor types (31). For instance, a specific increase in VEGF₁₈₉ has been found in lung cancers (32). In these tumors, VEGF₁₈₉ was associated with high intratumoral vascularization, early relapse and short survival of the patients, whereas VEGF₁₂₁ was only associated with a decrease in survival (33). In this study, we demonstrate that E2F1 down-regulates all VEGF_{xxx} isoforms through inhibition of VEGF promoter activity in human lung carcinoma cell lines. A p53-dependent repressive effect of E2F1 on VEGF promoter was previously reported in primary murine cell lines exposed to hypoxia but not to normoxia (19). Since all our experiments were performed in normoxic conditions and in p53-deficient cell lines, these data suggest that neither hypoxia, nor p53 are required for E2F1-mediated VEGF repression in cancer cells. p53-mediated suppression of VEGF promoter activity in human soft tissue sarcoma cells requires a 87bp region within this promoter containing Sp1-binding sites, and VEGF promoter features an E2F1-binding site with four Sp-1 sites in close proximity (24). Therefore, it remains to be determined whether E2F1 and Sp1 proteins cooperate to control VEGF promoter activity in the absence of p53. We recently identified the splicing factor SC35 as a direct transcriptional target of E2F1, involved in E2F1-mediated apoptosis (20). In this study, we show that SC35

knock-down in human lung carcinoma cell lines preferentially down-regulates VEGF₁₆₅ mRNA level, the most angiogenic isoform, at the transcriptional level at least. Since exon 7 is skipped in VEGF₁₆₅ mRNA, our data suggest that SC35 is required for this splicing event to occur. In addition, these results indicate that E2F1 and SC35 proteins do not act in the same way to control the expression pattern of VEGF_{xxx} isoforms. Although this effect could be dependent on the cellular model, these data identify SC35 as a regulator of VEGF_{xxx} pre-mRNA splicing in human lung carcinoma cells. They also suggest a potential role of SC35 in the control of angiogenesis in cancer cells.

An increasing number of evidences now support the fact that the balance between the VEGF_{xxx} (pro-angiogenic) and VEGF_{xxx^b} (anti-angiogenic) splice variants plays a crucial role in the control of tumor progression, as well as in the tumor cells response to anti-VEGF therapies. Indeed, VEGF_{165^b} inhibits: (1) VEGF₁₆₅- and hypoxia-induced angiogenesis "*in vitro*" and "*in vivo*"; (2) VEGF-induced endothelial cell migration and proliferation "*in vitro*"; and (3) the growth of tumors in xenografted mouse models (11, 13, 16, 17). However, nothing is known about the factors and signalling networks that control the switch between VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx^b} splice variants in cancer cells. In this study, we demonstrate that E2F1, while decreasing VEGF_{xxx} mRNA levels through repression of VEGF-A promoter activity, does not negatively modulate VEGF_{xxx^b} mRNA and protein levels. Moreover, we demonstrate using xenografts in nude mice that E2F1-induced tumor growth inhibition correlates with a decrease in tumor vascularization, as well as with an alteration of the balance between VEGF₁₆₅ and VEGF_{165^b} isoforms, in favor of VEGF_{165^b}. Therefore, we provide the first evidence that E2F1 controls the angiogenic switch between pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF and favors the expression of the anti-angiogenic VEGF_{xxx^b} isoforms. This regulation could be sufficient to prevent tumor growth since it was recently demonstrated that

VEGF_{165b} overexpression reduces tumor growth of renal carcinoma cells grown in mice even in the presence of VEGF₁₆₅ (16). How could E2F1 affect this ratio? During the course of our experiments, it was demonstrated in primary epithelial cells that ASF/SF2, SRp40 and SRp55, three members of SR proteins family, alter VEGF splicing when overexpressed or down-regulated (21). Strikingly, opposite effects on distal (DSS) or proximal (PSS) splice site selection within exon 8 were observed, with ASF/SF2 and SRp40 favoring expression of VEGF_{xxx} splice variants, while SRp55 upregulating VEGF_{xxx_b} isoforms relative to VEGF_{xxx}. In our cellular models, we show that SC35 knock-down modifies the ratio VEGF₁₆₅/VEGF_{165b} in favor of anti-angiogenic isoforms, suggesting that SC35 acts as ASF/SF2 and SRp40 to favor the expression of VEGF_{xxx} splice variants in these cancer cell lines. However, we also observed that SC35 neutralization does not affect VEGF_{xxx_b} mRNA levels to the same extent, with VEGF_{165b} and VEGF_{189b} mRNA levels being preferentially up-regulated in H1299 cells while VEGF_{121b} being increased in H69 cells. Therefore, these data suggest that SC35 could differentially affect the splicing pattern of VEGF_{xxx_b} isoforms, depending on the cellular model. Moreover, we show that SC35 neutralization alone does not significantly affect VEGF_{165b} mRNA level in the H358 cell line, while it prevents E2F1-induced VEGF_{165b} upregulation in the same cells. Altogether, these data indicate that the role played by SC35 on the regulation of VEGF_{xxx_b} splicing pattern might depend on the cell type, as well as on the upstream signals and signalling pathways activated in the cell, in response to E2F1 expression for example. It remains now to elucidate the molecular mechanisms by which both E2F1 and SC35 proteins act to control the expression level of VEGF_{xxx_b} isoforms. This might be through modulation of splice site selection within exon 8, but also through regulation of VEGF_{xxx_b} mRNAs stability and/or translation.

To conclude, E2F1-deficient mice have impaired apoptotic function, which was previously presumed to explain the increased incidence of cancer in these mice. However, our study suggests that the increase in tumor growth in E2F1-deficient mice might also result from an increase in the vascular supply of tumors secondary to dysregulated VEGF pre-mRNA splicing. Therefore, consistent with its seemingly contradictory roles as oncogene and tumor suppressor in tumorigenesis, E2F1 may suppress tumor growth by inhibiting tumor angiogenesis. Its low level of expression in NSCLC (34) could therefore contribute to tumor development by increasing tumor secreted endothelial growth factors (presumably VEGF₁₆₅ and other VEGF_{xxx} isoforms) allowing the tumors to develop their own blood supply.

Acknowledgements

We thank Patricia Betton, Pascal Perron and Celine Lampreia for technical assistance. This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée Ligue 2007) and by the Conseil Scientifique National d'AGIR *à dom*. Galina Merdzhanova was supported by fellowships from the Research French Ministry and the Fondation pour la Recherche Medicale (FRM). Stephanie Gout was supported by fellowship from Association pour la Recherche Contre le Cancer. Valerie Edmond was supported by a grant from the Conseil Scientifique National d'AGIR *à dom*.

References

1. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? Nat Rev Drug Discov 2007;6:273-86.
2. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 2000;407:249-57.

3. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5.
4. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995;55:4575-80.
5. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
6. Bachelder RE, Crago A, Chung J, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2001;61:5736-40.
7. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* 2002;62:7203-6.
8. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
9. Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3502-8.
10. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114:853-65.
11. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:4123-31.

12. Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett* 2007;249:133-42.
13. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004;64:7822-35.
14. Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, et al. Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer* 2007;97:223-30.
15. Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates DO, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res* 2008;68:4683-92.
16. Rennel E, Waine E, Guan H, et al. The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer* 2008;98:1250-7.
17. Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, et al. VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* 2008;98:1366-79.
18. Polager S, Ginsberg D. E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* 2008.
19. Qin G, Kishore R, Dolan CM, et al. Cell cycle regulator E2F1 modulates angiogenesis via p53-dependent transcriptional control of VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:11015-20.
20. Merdzhanova G, Edmond V, De Seranno S, et al. E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ* 2008.

21. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, et al. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* 2008;121:3487-95.
22. Salon C, Merdzhanova G, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B. E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors. *Oncogene* 2007.
23. Salon C, Eymin B, Micheau O, et al. E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* 2006;13:260-72.
24. Zhang L, Yu D, Hu M, et al. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 2000;60:3655-61.
25. Cheung N, Wong MP, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum Pathol* 1998;29:910-4.
26. Jiang SX, Sheldrick M, Desbois A, Slinn J, Hou ST. Neuropilin-1 is a direct target of the transcription factor E2F1 during cerebral ischemia-induced neuronal death in vivo. *Mol Cell Biol* 2007;27:1696-705.
27. Catena R, Muniz-Medina V, Moralejo B, et al. Increased expression of VEGF121/VEGF165-189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2007;120:2096-109.
28. Lantuejoul S, Constantin B, Drabkin H, Brambilla C, Roche J, Brambilla E. Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol* 2003;200:336-47.

29. Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, et al. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGF_{xxx}b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci (Lond)* 2006;110:575-85.
30. Cohen CD, Doran PP, Blattner SM, et al. Sam68-like mammalian protein 2, identified by digital differential display as expressed by podocytes, is induced in proteinuria and involved in splice site selection of vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1958-65.
31. Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano F, Johnson RS. Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature. *Mol Cell Biol* 2000;20:7282-91.
32. Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T, et al. Expression of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 1998;12:541-4.
33. Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, et al. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:432-41.
34. Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene* 2001;20:1678-87.

Legends of figures

Figure 1: E2F1 down-regulates the expression level of VEGF_{xxx} isoforms in p53-deficient human lung adenocarcinoma cell line

H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1(E132) cells were incubated for 48 hours (**A, B, D**) or 24 and 48 hours (**C**) in the presence (+) or absence (-) of 1 µg/ml doxycyclin (Dox). Mutant E2F1(E132) is unable to bind DNA. (**A**) *Upper panel*: western blot analysis of E2F1 protein expression. Actin was used as a loading control. *Lower panel*: RT-PCR analysis of *Vegf₁₈₉*, *Vegf₁₆₅*, *Vegf₁₂₁*, *neuropilin 1* and *neuropilin 2* mRNAs. Total RNAs were extracted as described in the material and methods section. Amplified *g3pdh* was used as an internal control. (**B**) RT-qPCR analysis of *Vegf₁₂₁*, *Vegf₁₆₅*, *Vegf₁₈₉* and *Vegf_{all}* mRNA levels. Total RNAs were extracted as described in the material and methods section. Glyceraldehyde-3-Phosphate Deshydrogenase (*gapdh*) was used as a reference. Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of *Vegf₁₂₁*, *Vegf₁₆₅*, *Vegf₁₈₉* or *Vegf_{all}* copy number (target gene) to *gapdh* mRNA copy number multiplied by 100, thus normalizing *Vegf_{xxx}* mRNAs expression for sample to sample differences in RNA input. For each splice variant, the ratio obtained in cells cultured without doxycyclin was arbitrarily assigned to 1. (**C**) Quantification of VEGF₁₆₅ protein level in culture supernatants using ELISA assay. (**D**) Western blot analysis of E2F1 and VEGF₁₆₅ protein expression. Actin was used as a loading control.

Figure 2: E2F1 downregulates VEGF_{xxx} splice variants in another model of human lung carcinoma cell line

The small cell lung carcinoma cell line H69 was transfected for 72 hours with either *mismatch* or *e2f1* siRNA as indicated. (**A**) *Left panel*: E2F1 protein level was detected by

immunoblotting. Actin was used as a loading control. *Right panel:* RT-PCR analyses of *VEGF_{xxx}* splice variants, *neuropilin-1* and *neuropilin-2* were performed as described in the material and methods section. **(B)** RT-qPCR analysis of *Vegf₁₂₁*, *Vegf₁₆₅*, *Vegf₁₈₉* and *Vegf_{all}* mRNA levels. Total RNAs were extracted as described in the material and methods section. Glyceraldehyde-3-Phosphate Deshydrogenase (*gapdh*) was used as a reference. Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of *Vegf₁₂₁*, *Vegf₁₆₅*, *Vegf₁₈₉* or *Vegf_{all}* copy number (target gene) to *gapdh* mRNA copy number multiplied by 100, thus normalizing *Vegf_{xxx}* mRNAs expression for sample to sample differences in RNA input. For each splice variant, the ratio obtained in cells transfected with *mismatch* siRNA was arbitrarily assigned to 1. **(C)** VEGF₁₆₅ protein level was quantified in the culture supernatants using ELISA assay. **(D)** E2F1 and VEGF₁₆₅ protein levels were determined in cellular protein extracts by immunoblotting. Actin was used as a loading control.

Figure 3: E2F1 represses VEGF promoter activity in p53-deficient human lung carcinoma cell lines

(A) Schematic representation of VEGF promoter-luciferase reporter pVp-ecor containing the upstream regulatory sequences and promoter region of the human *Vegf* gene (-2362 to +956 relative to the transcription start site) fused to the *luciferase* reporter gene in pGL3-basic vector. The HIF-1-, E2F1- and SP1- cis-binding elements are labeled. **(B)** H1299 large cell lung adenocarcinoma (left panel) and SAOS2 human osteosarcoma (right panel) cell lines were co-transfected for 48 hours with 1µg of pVp-ecor or pGL3-luciferase plasmid and increasing amounts of a pCMV-E2F1 vector. The luciferase activity obtained in cells transfected with pVp-ecor or pGL3-luciferase plasmid alone was normalized to 1 and a relative luciferase activity was then calculated for each condition. **(C)** H1299 large cell lung adenocarcinoma (left panel) and SAOS2 human osteosarcoma (right panel) cell lines were co-

transfected for 72 hours either with mismatch (*mis*) or e2f1 (*E2F1*) siRNA and 1 µg pVp-ecor or pGL3-luciferase plasmid as indicated. The luciferase activity obtained in cells transfected with pVp-ecor or pGL3-luciferase vector alone was normalized to 1 and a relative luciferase activity was then calculated for each condition.

Figure 4: E2F1 does not negatively control the expression level of VEGF_{xxx}b variants

(A) Exon structure of the *VEGF* gene. The *VEGF* gene consists of eight exons. All currently described isoforms contain exons 1-5 and exon 8. Differential terminal exon 8 splice site selection results in two mRNA isoform families. The pro-angiogenic isoforms (VEGF_{xxx}, left) are generated by proximal splice site (PSS) selection in exon 8 and the anti-angiogenic family (VEGF_{xxx}b, right) from exon 8 distal splice site (DSS) choice. The set of primers used to analyze by RT-qPCR the expression level of Vegf_{121b}, Vegf_{145b}, Vegf_{165b} and Vegf_{165b/189b} mRNAs are schematized by arrows. **(B, C, D)** H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1(E132) cells were incubated for 48 hours in the presence (+) or absence (-) of 1 µg/ml doxycyclin (Dox). **(B) Left panel:** western blot analysis of E2F1 or E2F1(E132) protein expression. Actin was used as a loading control. **Right panel:** RT-PCR analysis of Vegf_{145b}, Vegf_{165b}, *neuropilin-1* or *neuropilin-2* mRNAs. Total RNAs were extracted as described in the material and methods section. Amplified *g3pdh* was used as an internal control. **(C)** RT-qPCR analysis of Vegf_{121b}, Vegf_{145b}, Vegf_{165b} and Vegf_{165b/189b} mRNA levels in H358/Tet-On/E2F1 (left panel) or H358/Tet-On/E2F1(E132) (right panel) cells. Total RNAs were extracted as described in the material and methods section. Glyceraldehyde-3-Phosphate Deshydrogenase (*gapdh*) was used as a reference. Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of Vegf_{121b}, Vegf_{145b}, Vegf_{165b} or Vegf_{165b/189b} copy number (target gene) to *gapdh* mRNA copy number multiplied by 100, thus normalizing Vegf_{xxx}b mRNAs expression for sample to sample differences in RNA input. For each splice variant, the ratio obtained in cells

cultured without doxycyclin was arbitrarily assigned to 1. **(D)** Western blot analysis of E2F1 and VEGF_{165b} protein expression. Actin was used as a loading control.

Figure 5: E2F1 knock-down leads to the down-regulation of VEGF_{xxx} splice variants in H69 cells

The small cell lung carcinoma cell line H69 was transfected for 72 hours with either *mismatch* or *E2F1* siRNA as indicated. **(A)** RT-PCR analyses of *Vegf*_{145b} and *Vegf*_{165b} mRNAs were performed as described in the material and methods section. *gapdh* amplification was used as an internal control. **(B)** E2F1 and VEGF_{165b} protein levels were determined in cellular protein extracts by immunoblotting. Actin was used as a loading control.

Figure 6: The splicing factor SC35 differentially affects VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b splice variants in human lung carcinoma cell lines

(A, B, C) H1299 and H69 human lung carcinoma cell lines were transfected for 72 hours either with *mismatch* (*mis*) or *sc35* siRNAs, as indicated. **(A, B)** Total RNAs were extracted as described in the material and methods section. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*gapdh*) was used as a reference. Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of *target gene* copy number to *gapdh* mRNA copy number multiplied by 100, thus normalizing *Vegf*_{xxx} or *Vegf*_{xxx}b mRNAs expression for sample to sample differences in RNA input. For each splice variant, the ratio obtained in cells transfected with *mismatch* siRNA was arbitrarily assigned to 1. **(A) Upper panel:** western blot analysis of SC35 or VEGF₁₆₅ protein expression. Actin was used as a loading control. **Lower panel:** RT-qPCR analysis of *Vegf*₁₂₁, *Vegf*₁₆₅, *Vegf*₁₈₉ and *Vegf*_{all} mRNAs. **(B)** RT-qPCR analysis of *Vegf*_{121b}, *Vegf*_{145b}, *Vegf*_{165b} and *Vegf*_{165b/189b} mRNA levels. **(C)** Western blot analysis of SC35 or VEGF_{165b} protein expression. Actin was used as a loading control. **(D)**

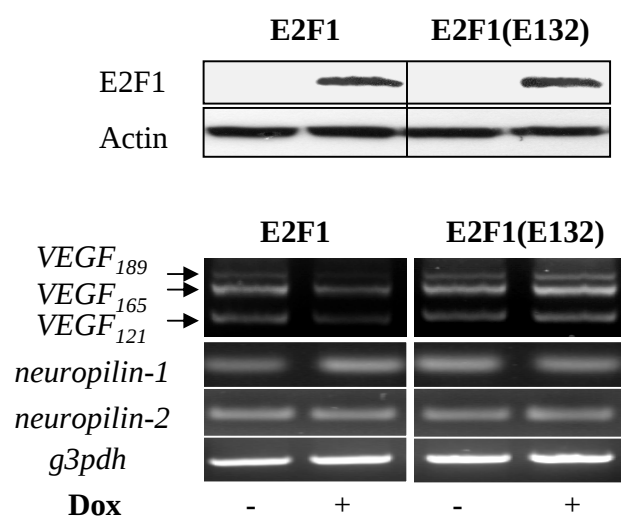
H358 Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence (+) or absence (-) of doxycyclin were transfected for 72h with either *mismatch (mis)* or *sc35 (sc35)* siRNA and subjected to RT-PCR (left panel) or western blot analysis using specific antibodies (right panel). Actin was used as a loading control.

Figure 7: E2F1 inhibits tumor growth and decreases tumor vascularization in nude mice through modulation of VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b ratio

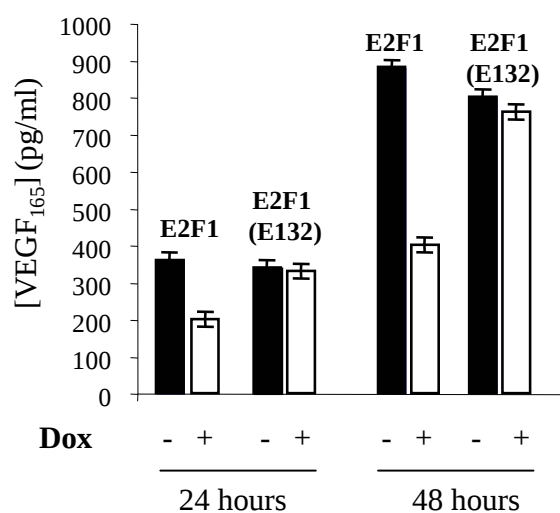
(A, B, C, D) H358/Tet-On 4 or H358/Tet-On/E2F1 (E2F1-6) cells were sub-cutaneously injected into nude mice and animals were treated with (Dox +) or without (Dox -) 2mg/ml doxycyclin for 7 days before sacrifice. **(A)** H358/Tet-On and H358/Tet-On/E2F1 tumors weight. Bars represent the mean tumor weight in each condition. For each condition, the mean value for tumor weight $\pm$ SD is indicated in brackets. **(B)** Hemoglobin level (mg/ml) was quantified in tumors derived from H358/Tet-On or H358/Tet-On/E2F1 cells in mice receiving (Dox +) or not (Dox -) doxycyclin in their drinking water. Bars represent the mean level in each case. Mean values are indicated in brackets. **(C)** RT-qPCR analysis of *Vegf₁₆₅*, *Vegf_{all}* and *Vegf_{165b}* mRNA levels in tumors derived from H358/Tet-On or H358/Tet-On/E2F1 cells. For each sample, $\Delta\text{Ct} = [\text{Ct}(\text{gapdh}) - \text{Ct}(\text{target gene})]$ was quantified and $2^{\Delta\text{Ct}}$ was calculated. Bars represent the mean for the calculated $2^{\Delta\text{Ct}}$. Mean ΔCt values are indicated in brackets. **(D)** Western blot analysis of E2F1, VEGF₁₆₅ and VEGF_{165b} protein levels in total protein extracts obtained from tumors derived from H358/Tet-On (left panel) or H358/Tet-On/E2F1 (right panel) cells and treated with (Dox +) or without (Dox -) 2mg/ml doxycyclin. Actin was used as a loading control.

Fig 1

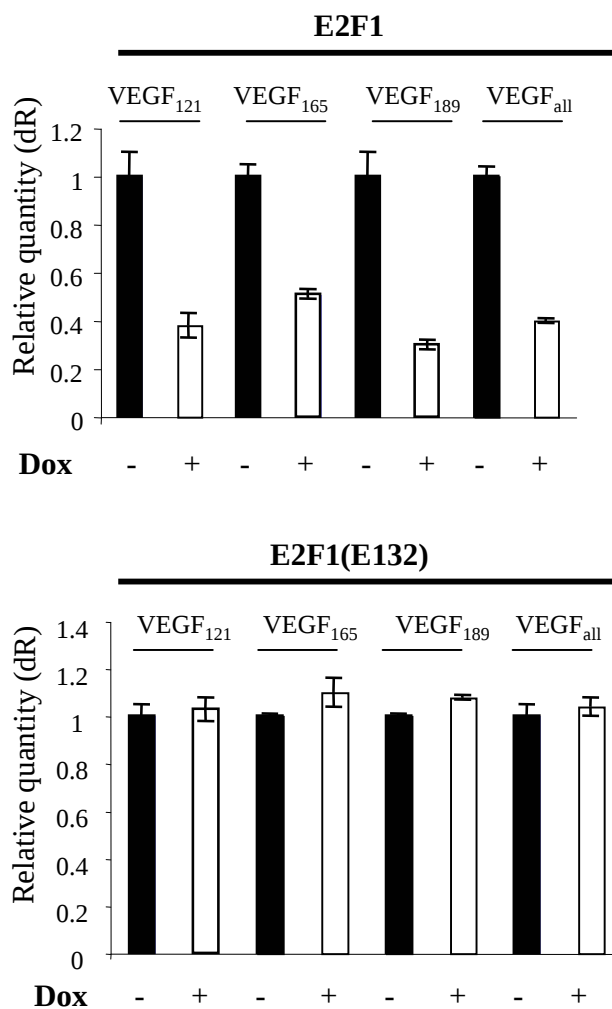
A



C



B



D

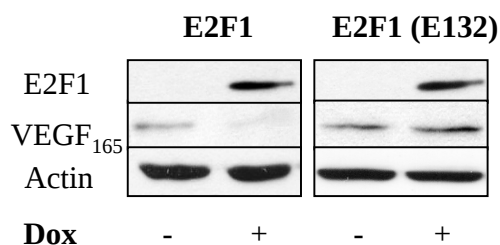
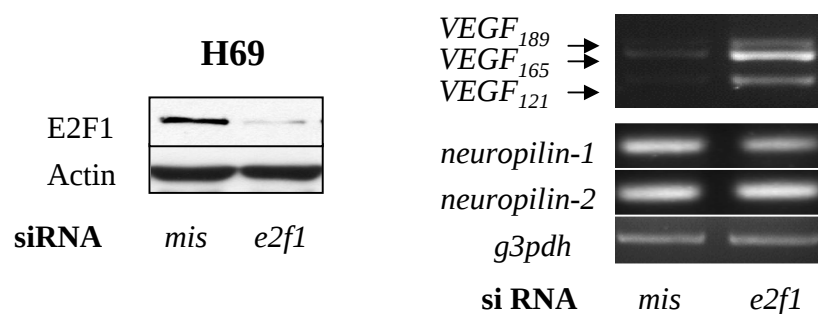
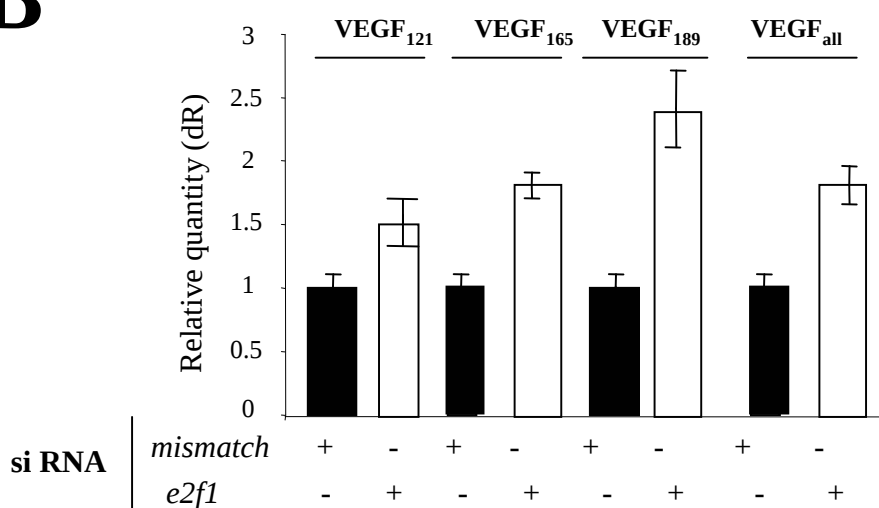


Fig 2

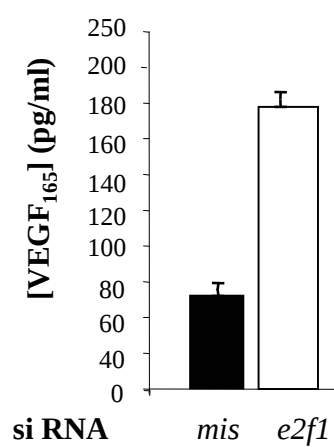
A



B



C



D

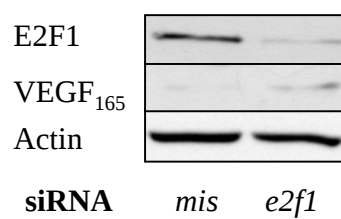
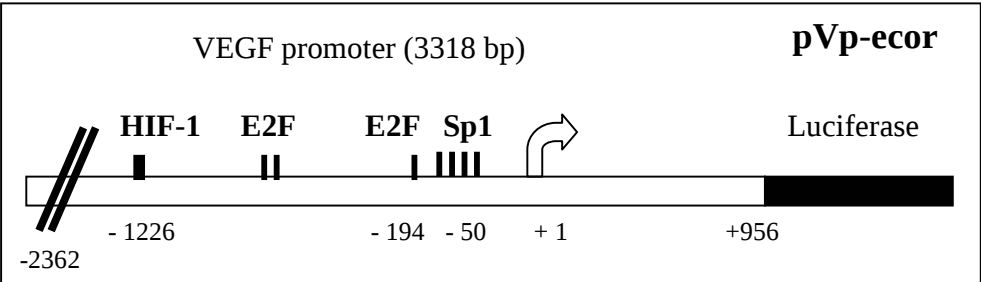
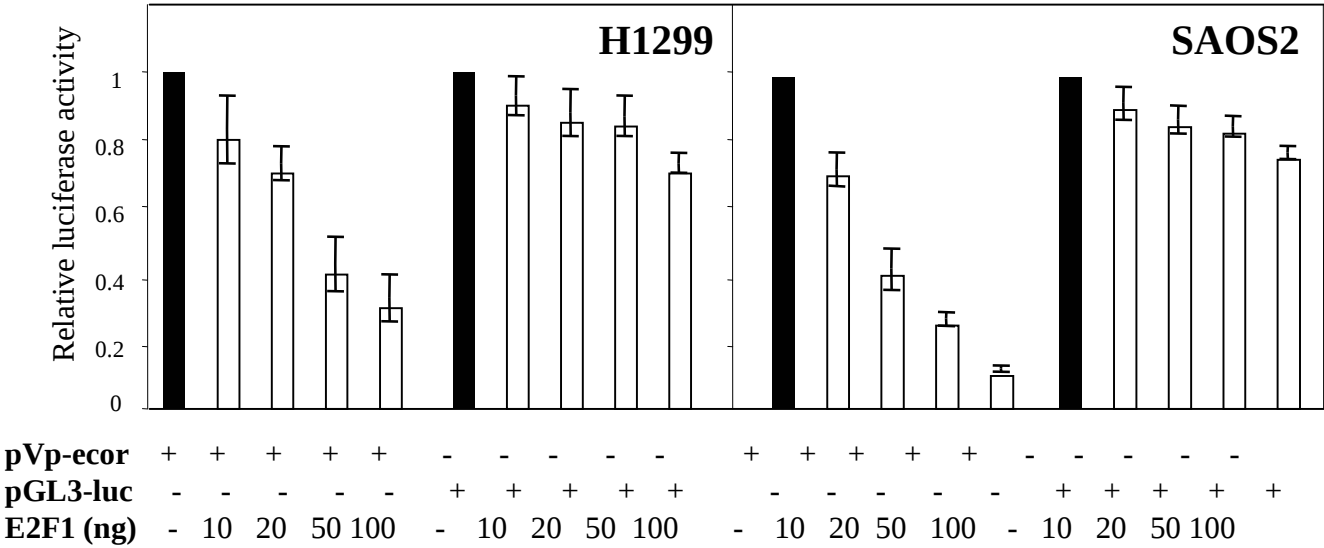


Fig 3

A



B



C

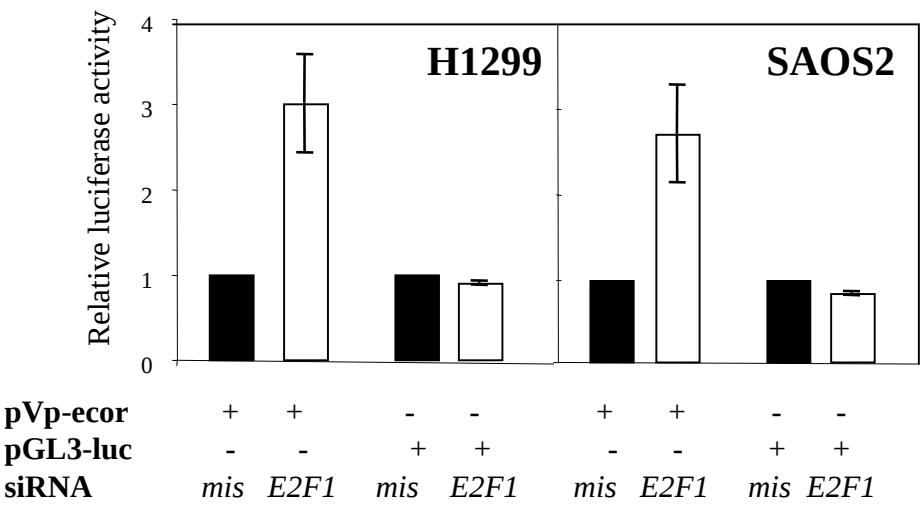
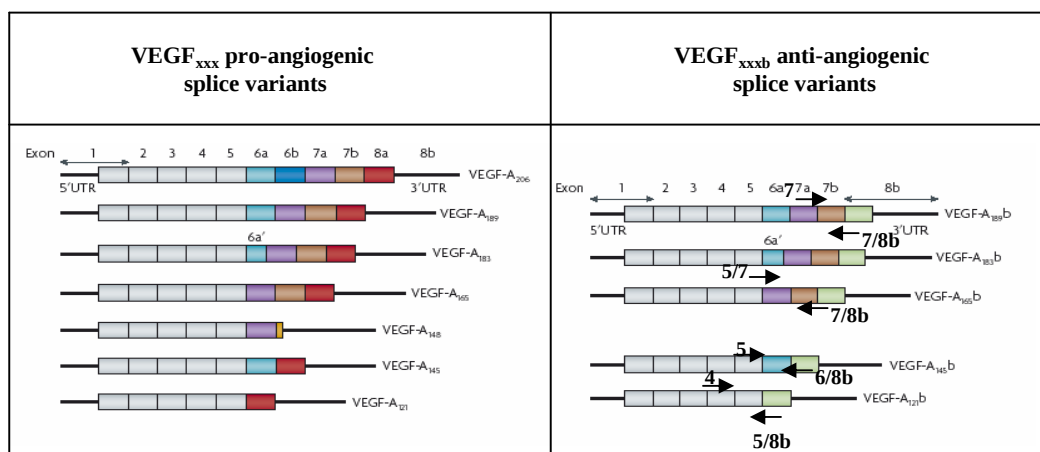
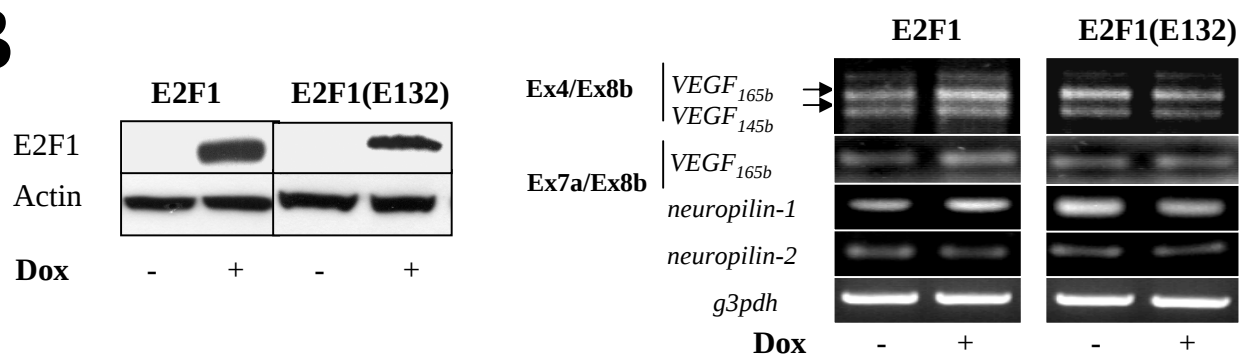


Fig 4

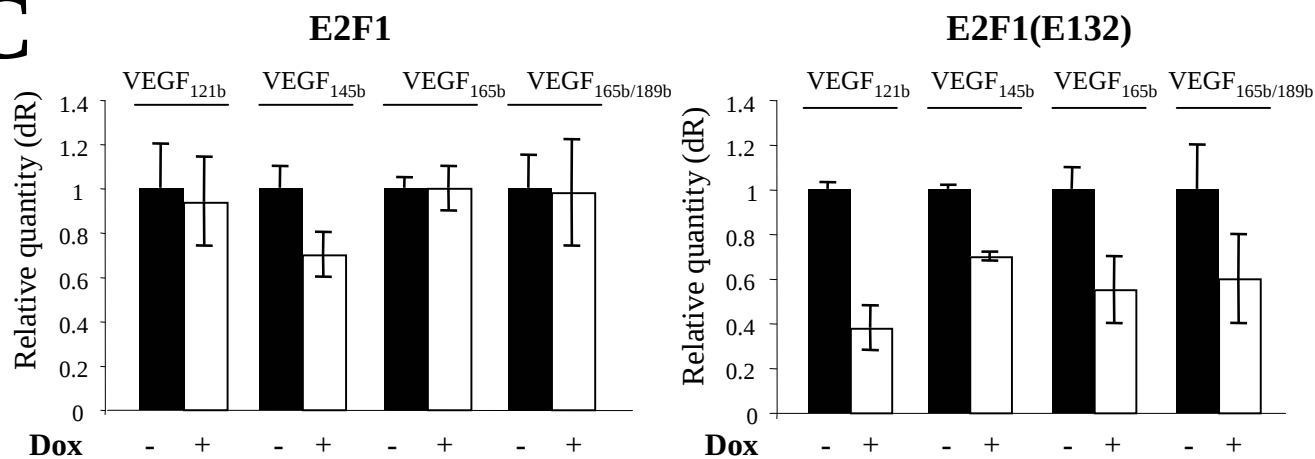
A



B



C



D

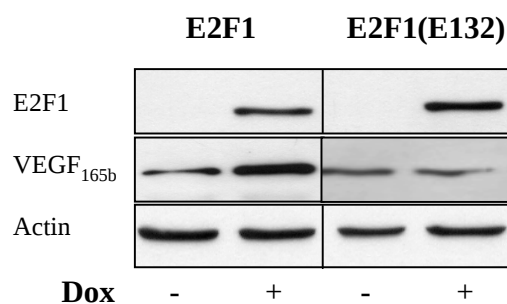


Fig 5

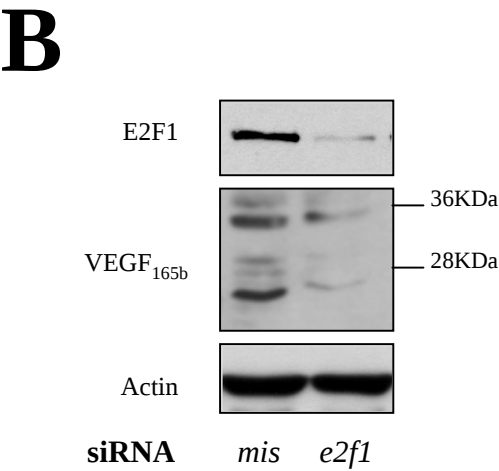
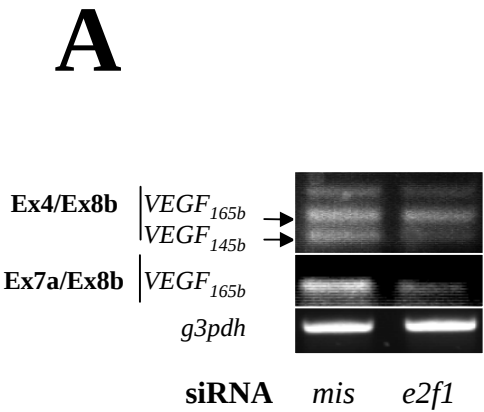


Fig 6

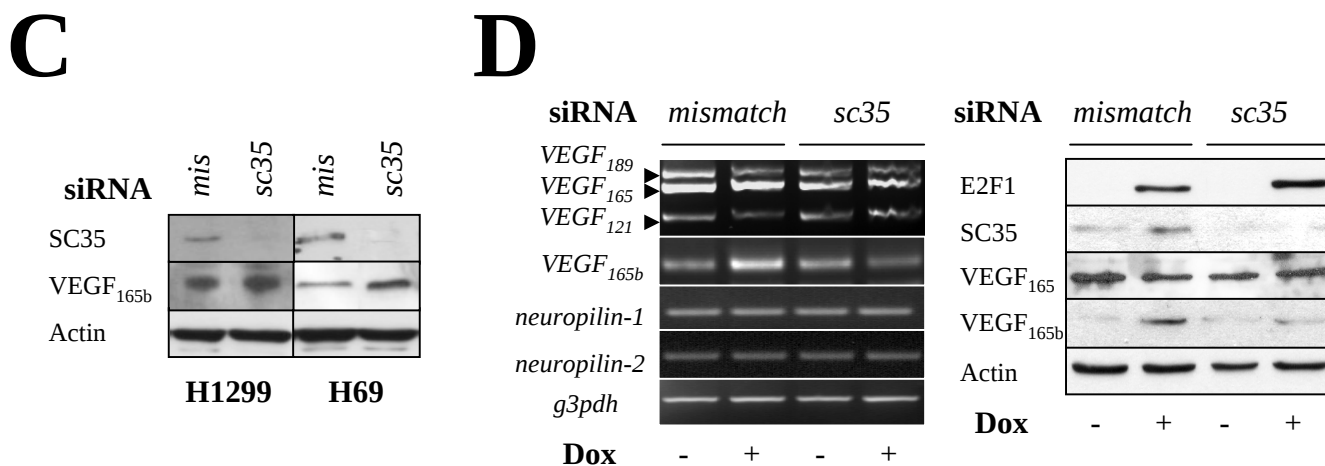
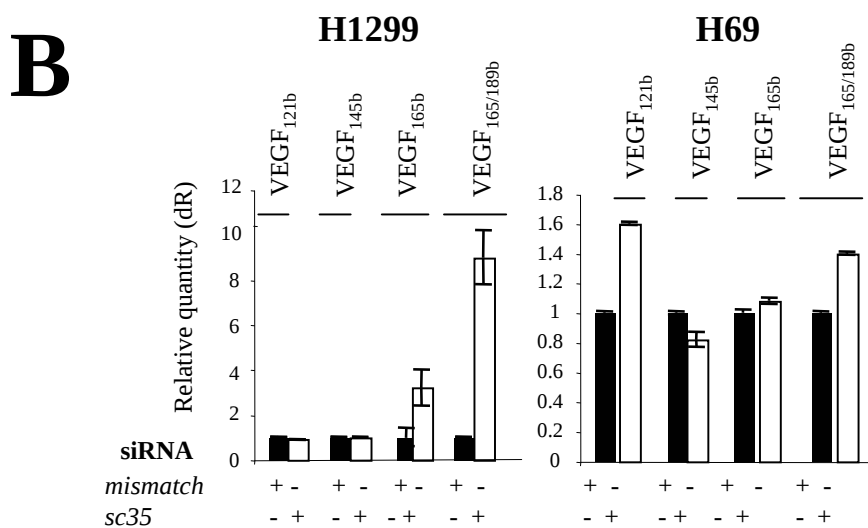
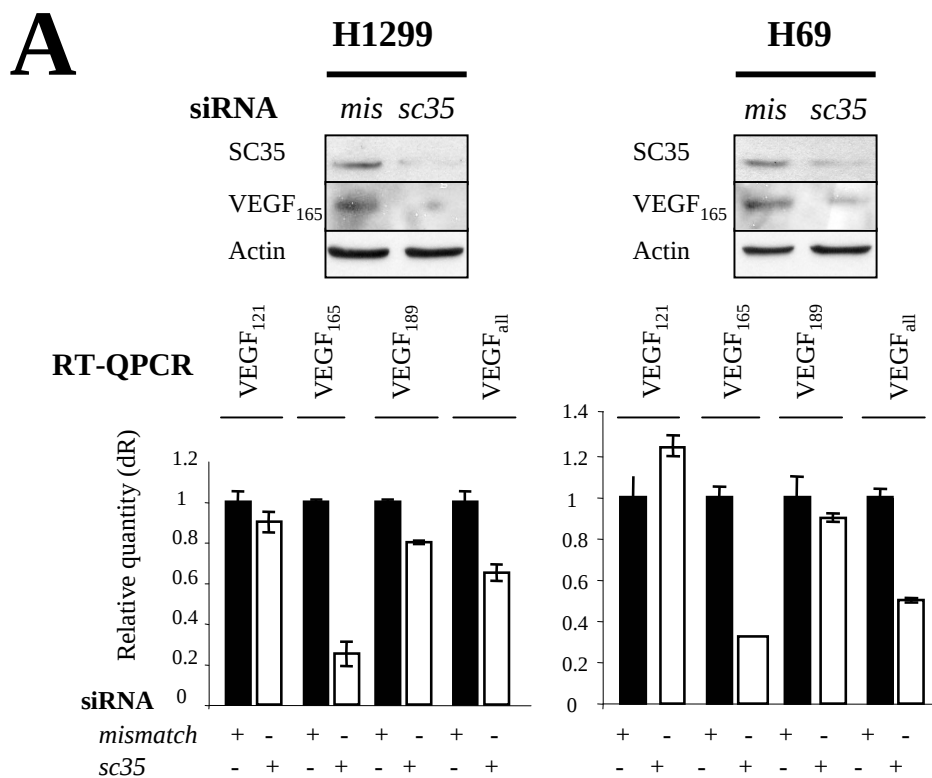
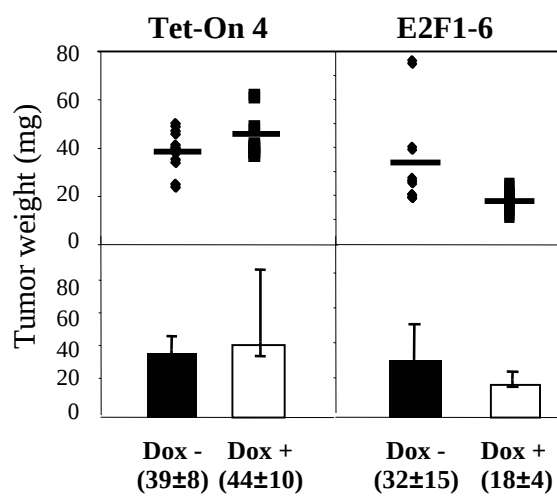
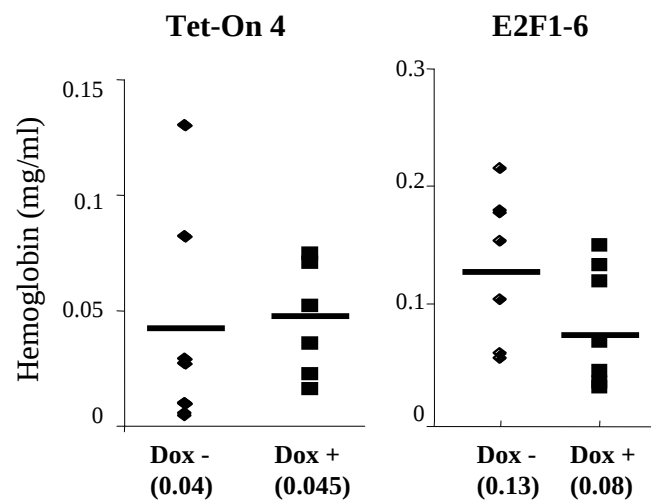


Fig 7

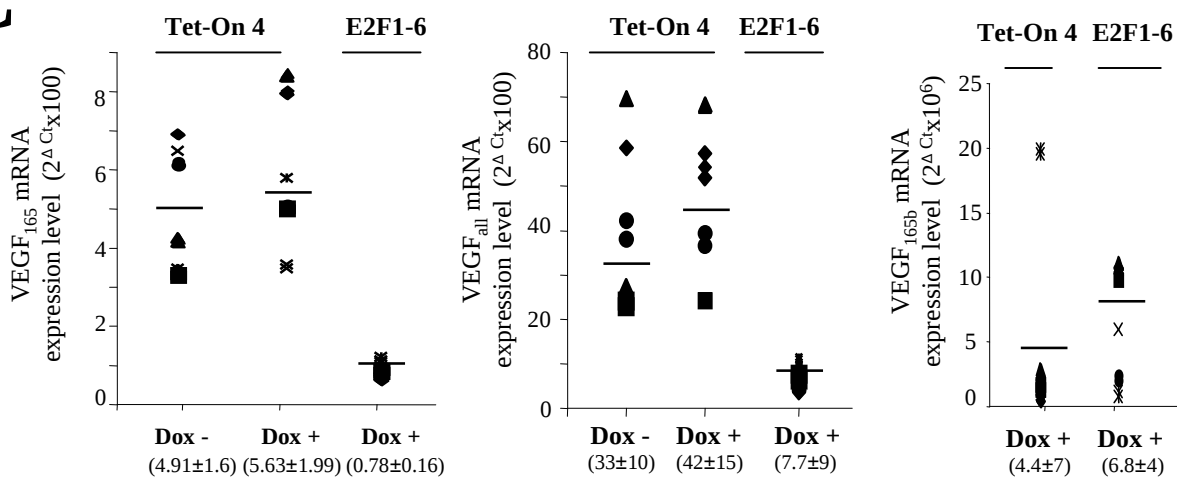
A



B



C



D

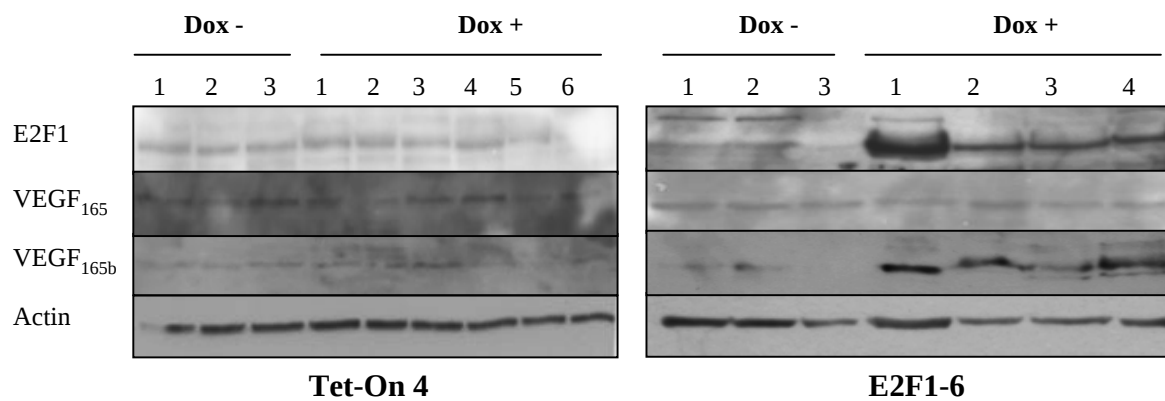


Table 1: Primers used in this study for detection of VEGF_{xxx} splice variants and neuropilin 1 or 2 mRNA.

Detection of VEGF _{xxx} by RT-PCR (ref 25)		Amplicon size (bp)
VEGF forward	5'-AGCTACTGCCATCCAATCGC-3'	VEGF ₁₂₁ 631
VEGF reverse	5'-GGGCGAATCCAATTCCAAGAG-3'	VEGF ₁₆₅ 690
		VEGF ₁₈₉ 762
		VEGF ₂₀₆ 813
Detection of neuropilins NP1 and NP2 by RT-PCR (ref 28)		
NP1 forward	5'-ATCACGTGCAGCTCAAGTGG-3'	167
NP1 reverse	5'-TCATGCAGTGGGCAGAGTTC-3'	
NP2 forward	5'-GGATGGCATTCCACATGTTG-3'	152
NP2 reverse	5'- ACCAGGTAGTAACGCGCAGAG-3'	
Detection of VEGF _{xxx} by RT-qPCR (ref 27)		
VEGF ₁₂₁ forward	5'-ATAGAGCAAGACAAGAAAAATG-5'	118
VEGF ₁₂₁ reverse	5'-ATCGTTCTGTATCAGTCTTTCCT-3'	
VEG ₁₆₅ forward	5'-AGAGCAAGACAAGAAAATCC-3'	60
VEGF ₁₆₅ reverse	5'-TACAAACAAATGCTTTCTCC-3'	
VEGF ₁₈₉ forward	5'-TATAAGTCCTGGAGCGTTC-3'	79
VEGF ₁₈₉ reverse	5'-TACACGTCTGCGGATCTTG-3'	
VEGF _{all} forward	5'-CTTCCTACAGCACAAACAAT-3'	53
VEGF _{all} reverse	5'-GTCTTGCTCTATCTTTCTTTGG-3'	

Table 2: Primers used in this study for detection of VEGF_{xxx}b splice variants.

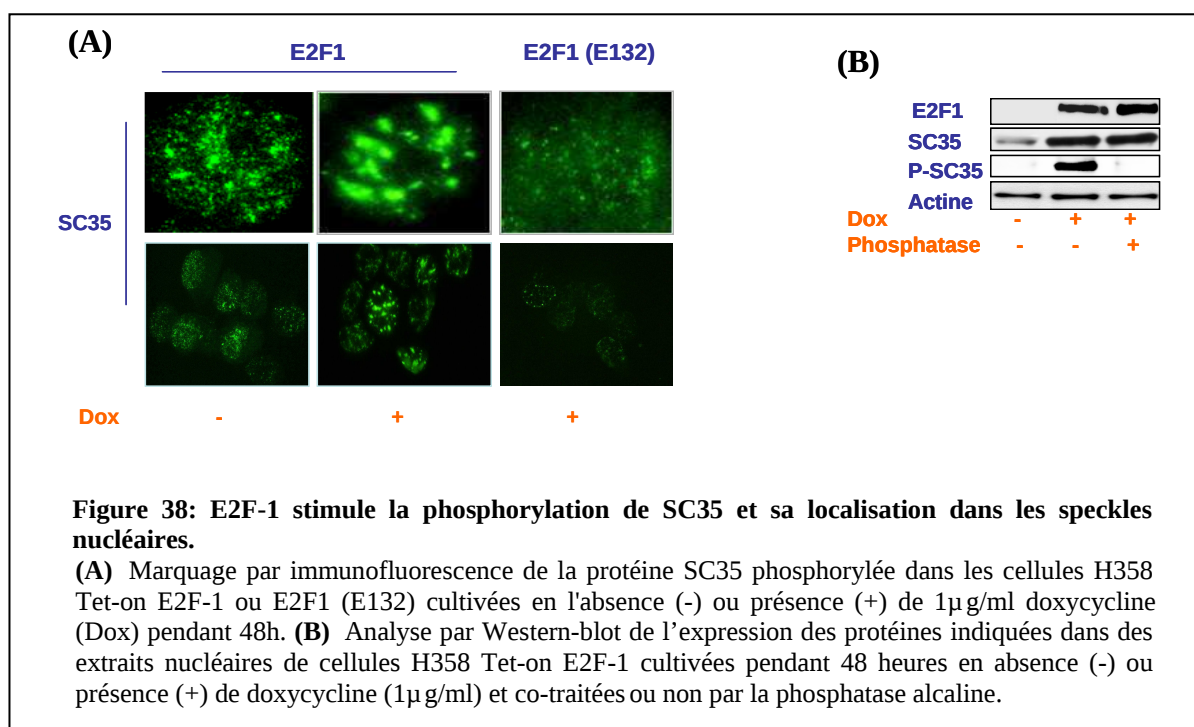
Detection of VEGF _{xxx} b by RT-PCR (ref 14, 29)		
VEGF-exon4 forward	5'- GAGATGAGCTTCCTACAGCAC-3'	VEGF _{121b} VEGF _{145b} VEGF _{165b}
VEGF-exon8b reverse	5'-TCAGTCTTTCCTGGTGAGAGATCTGCA-3'	
VEGF-exon7 forward	5'-GTAAGCTTGTACAAGATCCGCAGACG-3'	
VEGF-exon8b reverse	5'-TCAGTCTTTCCTGGTGAGAGATCTGCA-3'	VEGF _{165b}
Detection of VEGF _{xxx} b mRNAs by RT-qPCR		Amplicon sizes (bp)
VEGF _{121b} forward	5'-AAGGCCAGCACATAGGAGAG-5'	100
VEGF _{121b} reverse	5'-TTCCTGGTGAGAGATTTTCTTG-3'	
VEGF _{145b} forward	5'-CCAAAGAAAGATAGAGCAAGACAA-3'	101
VEGF _{145b} reverse	5'-ACGCTCCAGGACTTATACCG-3'	
VEGF _{165b} forward	5'-AAGACAAGAAAATCCCTGTGG-3'	151
VEGF _{165b} reverse	5'-TCCTGGTGAGAGATCTGCAA-3'	
VEGF _{165b/189b} forward	5'-CAAGATCCGCAGACGTGTAA-3'	158
VEGF _{165b/189b} reverse	5'-TCCTGGTGAGAGATCTGCAA-3'	

III RESULTATS NON PUBLIES

III.1 Effet de E2F1 sur la phosphorylation de SC35 et sur sa localisation sub-cellulaire

III.1.1 E2F1 induit l'accumulation d'une forme phosphorylée de SC35

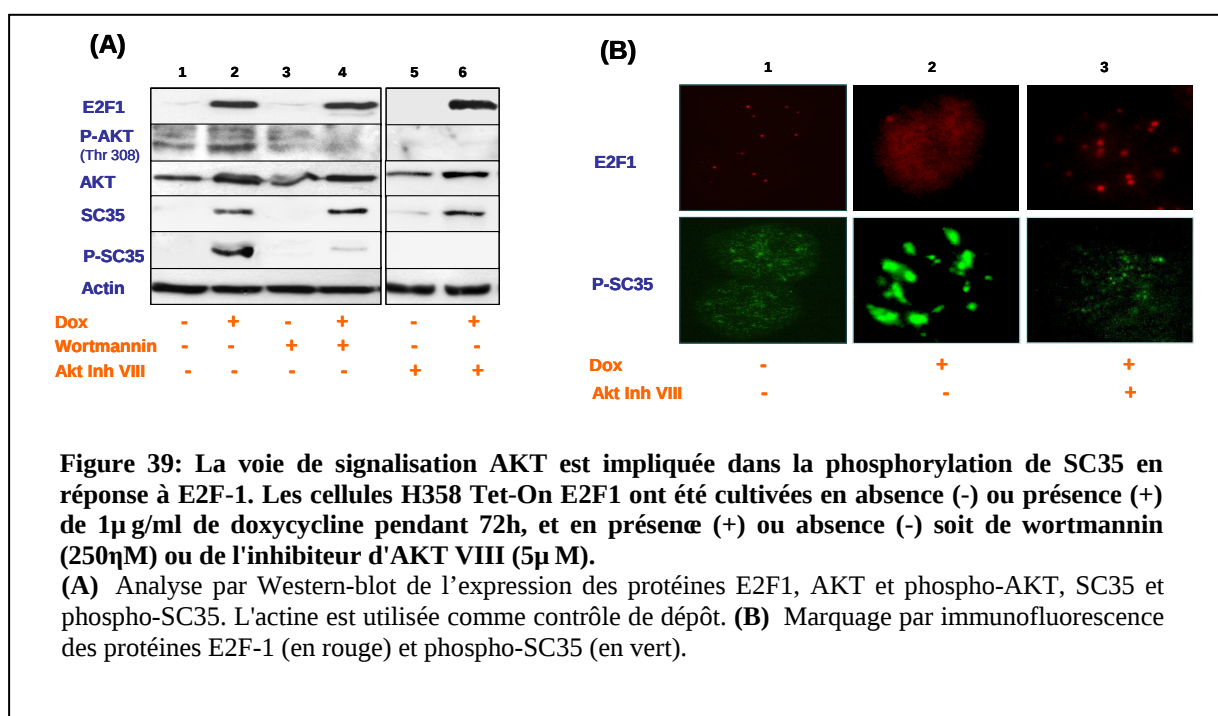
L'activité biologique des protéines SR et leur localisation sub-cellulaire sont régulées par phosphorylation. Après avoir identifié SC35 comme une nouvelle cible transcriptionnelle de E2F1, nous avons étudié l'effet de E2F1 sur la phosphorylation de SC35. Dans nos clones stables inductibles, nous avons réalisé un marquage de la forme phosphorylée de SC35 par immunofluorescence et utilisation d'un anticorps spécifique reconnaissant un phospho-épitope sur SC35 (**Figure 38, A**). En l'absence de E2F1, nous observons une expression faible de la forme phosphorylée de SC35 dans les "speckles"nucléaires. De façon intéressante, dans les cellules surexprimant E2F1 mais pas sa forme mutante (E132), la forme phosphorylée de SC35 s'accumule dans des speckles de plus grosse taille, plus réfringents et d'une forme plus irrégulière. Nous avons confirmé ces résultats par Western blot (**Figure 38, B**). Ainsi, SC35 s'accumule sous forme phosphorylée dans des extraits nucléaires de cellules surexprimant E2F1 comparativement aux cellules contrôle (**Figure 38, B**). Cette forme phosphorylée disparaît lorsque les extraits nucléaires sont prétraités à la phosphatase alcaline avant dépôt sur gel d'acrylamide. Ces résultats indiquent qu'E2F1 stimule la phosphorylation de SC35 et induit sa localisation dans des speckles nucléaires de grosse taille.



III.1.2 Implication de la voie PI3Kinase/AKT dans la phosphorylation de SC35 en réponse à E2F1

L'activation de la voie PI3Kinase/AKT en réponse aux facteurs de croissance contribue à la phosphorylation de certaines protéines SR et modifie en aval les processus d'épissage (Blaustein, et al., 2005). En s'appuyant sur ces données, nous avons recherché si la voie AKT jouait un rôle dans la phosphorylation de la protéine SC35 en réponse à E2F1. Nous avons traité nos cellules avec deux types d'inhibiteurs de cette voie, la wortmannin qui inhibe en amont la voie PI3K/AKT et l'inhibiteur AKT VIII qui inhibe spécifiquement l'activité kinase d'AKT, et étudié par Western blot le statut de phosphorylation de la protéine SC35 en condition induite ou non-induite (**Figure 39, A**). Dans les cellules surexprimant E2F1, nous avons observé une activation d'AKT visualisée par l'accumulation de sa forme phosphorylée (**Figure 39, A**, comparer colonnes 1 et 2). Les inhibiteurs de la voie AKT sont bien actifs dans notre modèle puisqu'ils préviennent cette phosphorylation (comparer colonnes 2 et 4). De façon importante, nos résultats montrent aussi que l'inhibition de l'activité kinase d'AKT prévient l'accumulation de SC35 sous sa forme phosphorylée observée dans les cellules surexprimant E2F1 (**Figure 39, A**, comparer lignes 2, 4 et 6). Parallèlement, pour confirmer ces résultats, nous avons analysé l'effet de ces inhibiteurs sur la localisation sub-nucléaire de SC35 par immunofluorescence (**Figure 39, B**). Le traitement de nos cellules avec l'inhibiteur AKT VIII prévient l'accumulation de la forme phosphorylée de SC35 dans des speckles de

grande taille dans les cellules surexprimant E2F1. Ainsi, en absence d'activité de la kinase AKT, les cellules induites pour l'expression de E2F1 présentent un profil de speckles nucléaires identiques au contrôle. Ces résultats suggèrent que E2F1 active la voie AKT et stimule par ce biais la phosphorylation de SC35 et son accumulation dans les speckles nucléaires. Cependant, ces résultats sont encore préliminaires et posent beaucoup de questions concernant notamment le mécanisme par lequel E2F1 active AKT pour phosphoryler la protéine SC35 et la contribution de cette phosphorylation de SC35 par AKT aux fonctions prolifératives et/ou apoptotiques de E2F1.



III.1.3 E2F1 affecte l'épissage de la kinase Clk/Sty

Parallèlement à notre étude sur la voie AKT, nous avons analysé dans notre modèle cellulaire le statut d'autres kinases connues pour phosphoryler les protéines SR. Nous avons ainsi étudié le niveau d'expression des protéines kinases SRPK1 et SRPK2 par Western blot dans nos clones stables inducibles. Comme le montre la figure 40 A, nous n'avons observé aucune différence de niveau d'expression des deux protéines entre les cellules contrôle et les cellules surexprimant E2F1 ou sa forme mutante. Nous avons ensuite analysé le statut de Clk/Sty. De façon intéressante, l'épissage alternatif du pré-ARNm de Clk/Sty génère 2 variants d'épissage codant l'un pour la forme entière de l'enzyme catalytiquement active (Sty) et l'autre pour une forme tronquée, dépourvue d'activité catalytique (tSty) (**Figure 40,B**). Ces différents variants sont détectables par RT-PCR et utilisation de primers spécifiques. Dans nos clones

stables inductibles, l'expression de E2F1 mais pas celle de sa forme mutante modifie le profil d'épissage de Clk/Sty en faveur de l'isoforme inactive (**Figure 40, C**). De façon importante, la neutralisation de SC35 par ARN interférence prévient cette accumulation (**Figure 40, C**). Nous avons confirmé ces résultats dans un modèle de surexpression, en transfectant les cellules H1299 transfectées par un plasmide contrôle ou un vecteur codant pour SC35 (**Figure 40, D**). Dans ces cellules, la surexpression de SC35 favorise la synthèse des variants codant pour tSty. Ces résultats indiquent donc qu'E2F1 et SC35 coopèrent pour modifier l'expression des différents variants d'épissage de Clk/Sty.

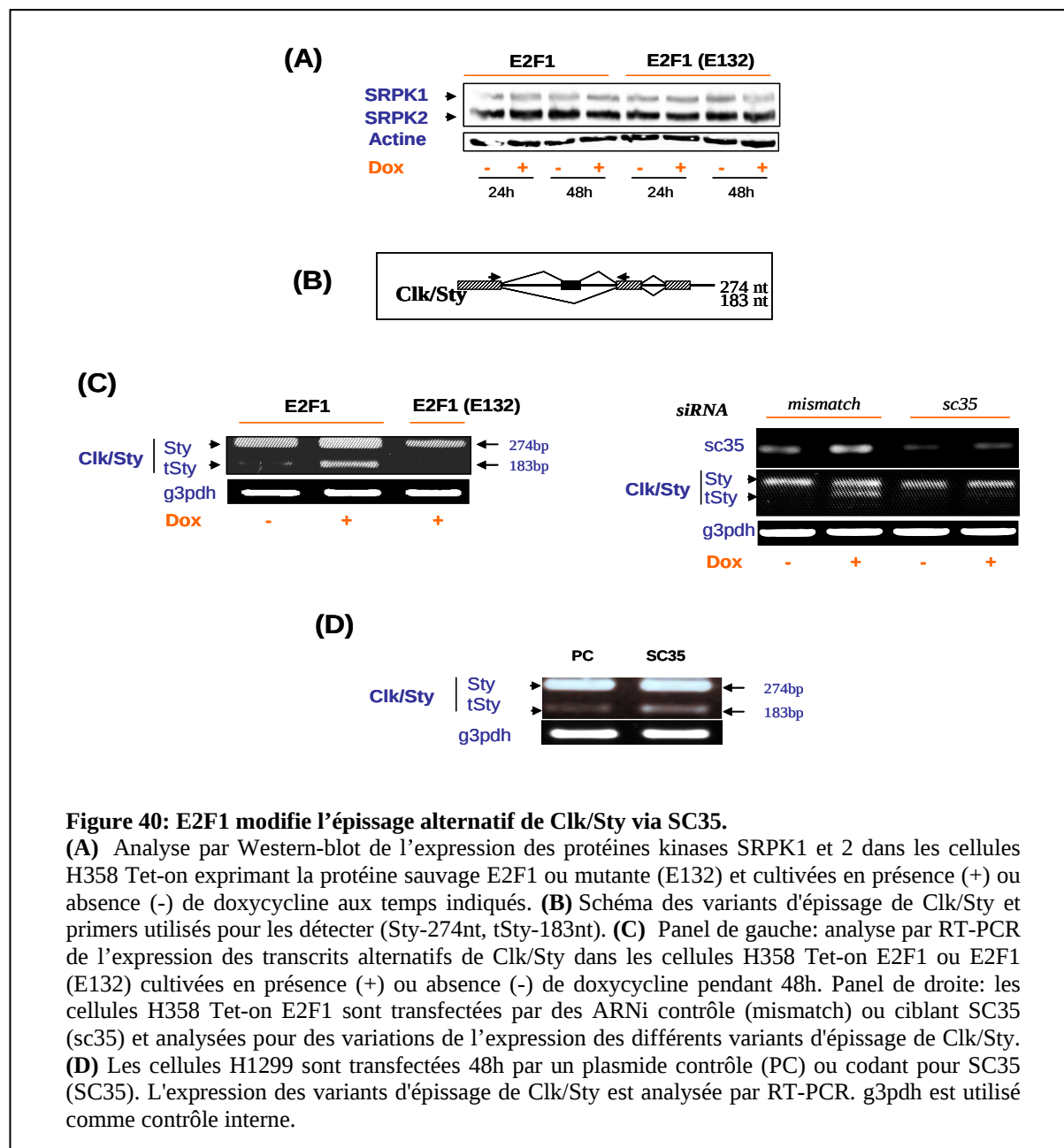
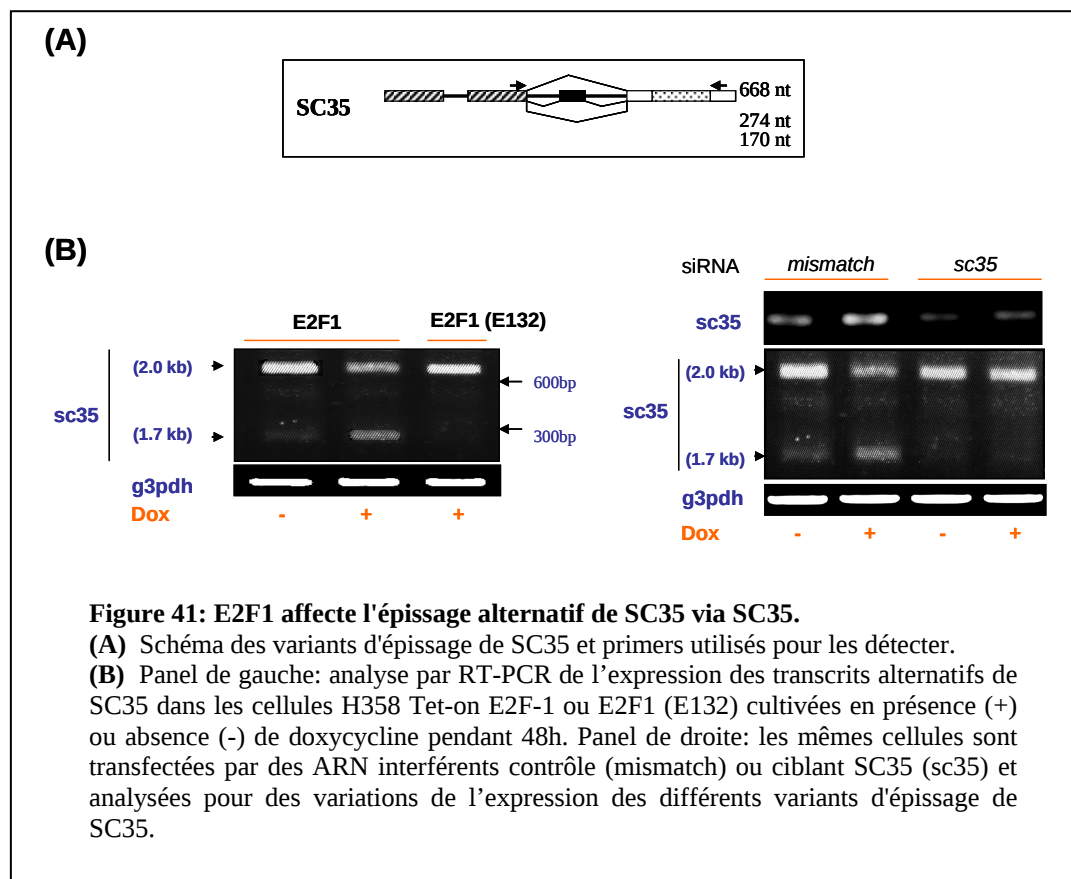


Figure 40: E2F1 modifie l'épissage alternatif de Clk/Sty via SC35.

(A) Analyse par Western-blot de l'expression des protéines kinases SRPK1 et 2 dans les cellules H358 Tet-on exprimant la protéine sauvage E2F1 ou mutante (E132) et cultivées en présence (+) ou absence (-) de doxycycline aux temps indiqués. **(B)** Schéma des variants d'épissage de Clk/Sty et primers utilisés pour les détecter (Sty-274nt, tSty-183nt). **(C)** Panel de gauche: analyse par RT-PCR de l'expression des transcrits alternatifs de Clk/Sty dans les cellules H358 Tet-on E2F1 ou E2F1 (E132) cultivées en présence (+) ou absence (-) de doxycycline pendant 48h. Panel de droite: les cellules H358 Tet-on E2F1 sont transfectées par des ARNi contrôle (mismatch) ou ciblant SC35 (sc35) et analysées pour des variations de l'expression des différents variants d'épissage de Clk/Sty. **(D)** Les cellules H1299 sont transfectées 48h par un plasmide contrôle (PC) ou codant pour SC35 (SC35). L'expression des variants d'épissage de Clk/Sty est analysée par RT-PCR. g3pdh est utilisé comme contrôle interne.

III.2 Effet de E2F1 sur l'épissage de SC35: existence d'une boucle de rétrocontrôle négatif?

Des données de la littérature indiquent que SC35 est capable de réguler l'épissage alternatif de son propre gène et active des événements d'épissage qui déstabilisent son ARNm (Sureau, 2001). Ainsi, SC35 favorise l'expression de transcrits alternatifs (1.6 et 1.7 kb) qui ne sont pas stables et sont dégradés par le système NMD (Sureau, et al., 2001). Afin de rechercher si E2F1 en induisant l'accumulation de SC35 modifie aussi l'épissage alternatif de son ARN pré-messager, nous avons réalisé des RT-PCR en utilisant des primers spécifiques amplifiant la région 3'-UTR des transcrits SC35 et permettant de détecter les variants majoritaire (2kb) et minoritaires (1, 6 et 1,7kb) déjà décrits (Pilch, et al., 2001) (**Figure 41, A**). Dans les cellules non-induites, nous détectons le transcrit majoritaire (2kb) et faiblement le transcrit minoritaire à 1,7kb. La surexpression de E2F1 conduit à l'accumulation de ce transcrit à 1,7kb connu dans la littérature comme instable et vite dégradé par le système NMD (**Figure 41 B**, panel de gauche). De plus, cet effet nécessite SC35 puisque la neutralisation de SC35 par ARN interférence prévient l'effet de E2F1 (**Figure 41, B** panel de droite). Ces résultats suggèrent l'existence d'une possible boucle de rétrocontrôle négatif, par laquelle SC35 accumulé en réponse à E2F1 pourrait contrôler négativement son niveau d'expression.



III.3 Rôle de SC35 dans les fonctions prolifératives de E2F1 (Edmond, Merdzhanova, *en préparation*)

E2F1 est une protéine clé de la transition des cellules entre les phases G1 et S du cycle cellulaire. Ayant mis en évidence une coopération entre E2F1 et SC35 dans le contrôle des processus apoptotiques, nous nous sommes demandés si SC35 pourrait aussi jouer un rôle dans les fonctions prolifératives de E2F1. Dans un premier temps, nous avons recherché si la protéine SC35 s'exprimait dans les cellules d'une manière cyclique au cours du cycle cellulaire comme son partenaire E2F1. Pour le savoir, nous avons synchronisé les cellules H1299 en phase G1 du cycle cellulaire par un traitement à l'hydroxyurée. A différents temps après la levée du bloc, nous avons étudié l'expression de SC35 et aussi celle de E2F1 et de certaines de ses cibles transcriptionnelles impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, dont les cyclines E et A, et la dihydrofolate réductase (DHFR), par RT-PCR et Western blot. Comme le montre la figure 42, l'expression de SC35 augmente progressivement dans notre modèle lors de la transition G1/S et de la progression en phase S (temps 1h et 3h après la levée du bloc) aussi bien au niveau transcriptionnel (**Figure 42, B**) qu'au niveau protéique (**Figure 42, C**), pour diminuer au moment de la transition G2/M. De façon intéressante, cette variation d'expression de SC35 corrèle avec l'accumulation de E2F1 mais aussi avec l'accumulation temporaire de cycline E et DHFR. Cette expérience de synchronisation des cellules montre donc que SC35 est exprimée d'une manière cyclique au cours du cycle et que son expression corrèle avec l'accumulation de la protéine E2F1. Ces résultats suggèrent que SC35 pourrait jouer un rôle au cours du passage et de la progression en phase S du cycle cellulaire.

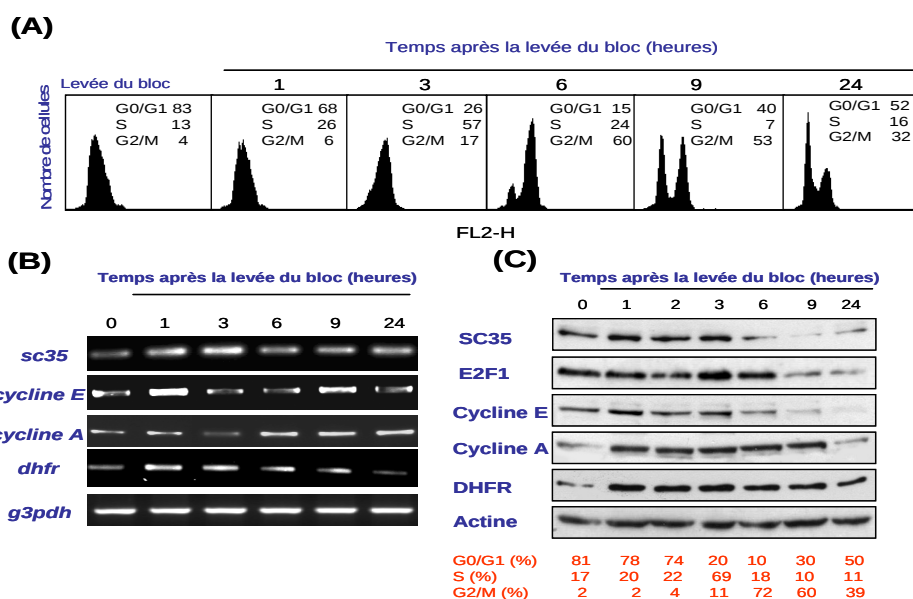
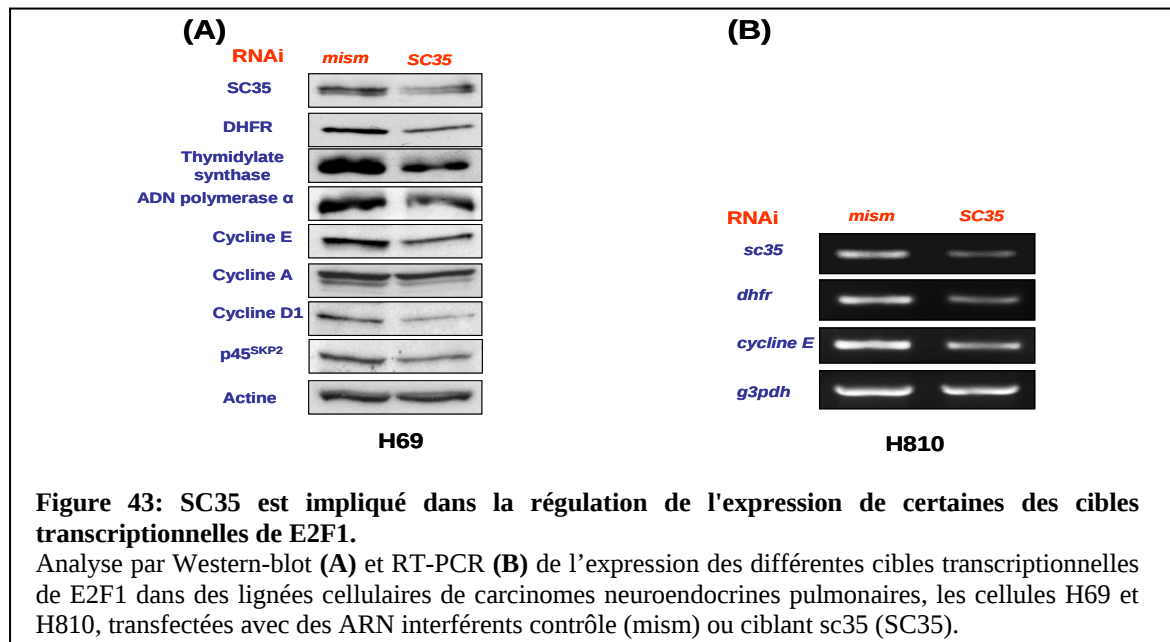


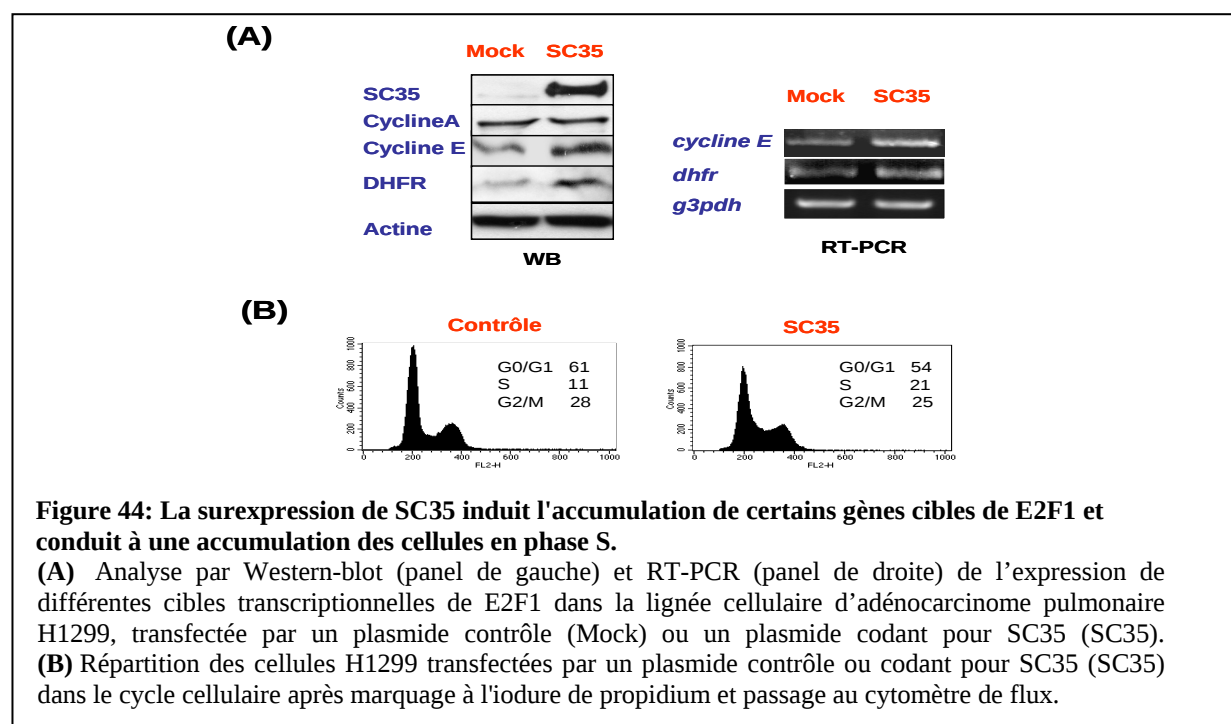
Figure 42: Au cours du cycle cellulaire, SC35 est exprimée d'une manière cyclique et s'accumule au moment de la transition et progression en phase S.

(A) Les cellules d'adénocarcinome pulmonaire H1299 ont été traitées pendant 18 heures avec 1mM d'hydroxyurée, lavées, remises dans du milieu neuf à T0, puis analysées par cytométrie en flux au moment de la levée du bloc et à 1h, 3h, 6h, 9h, et 24h après la réentrée en cycle cellulaire, par marquage à l'iodure de propidium. Les chiffres indiquent le pourcentage des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. **(B)** Analyse par RT-PCR de l'expression des transcrits codant pour SC35 et certaines cibles transcriptionnelles de E2F1 à différents temps après la levée du bloc. **(C)** Analyse par Western blot des différentes protéines indiquées. En bas, le pourcentage de répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est indiqué pour chaque temps.

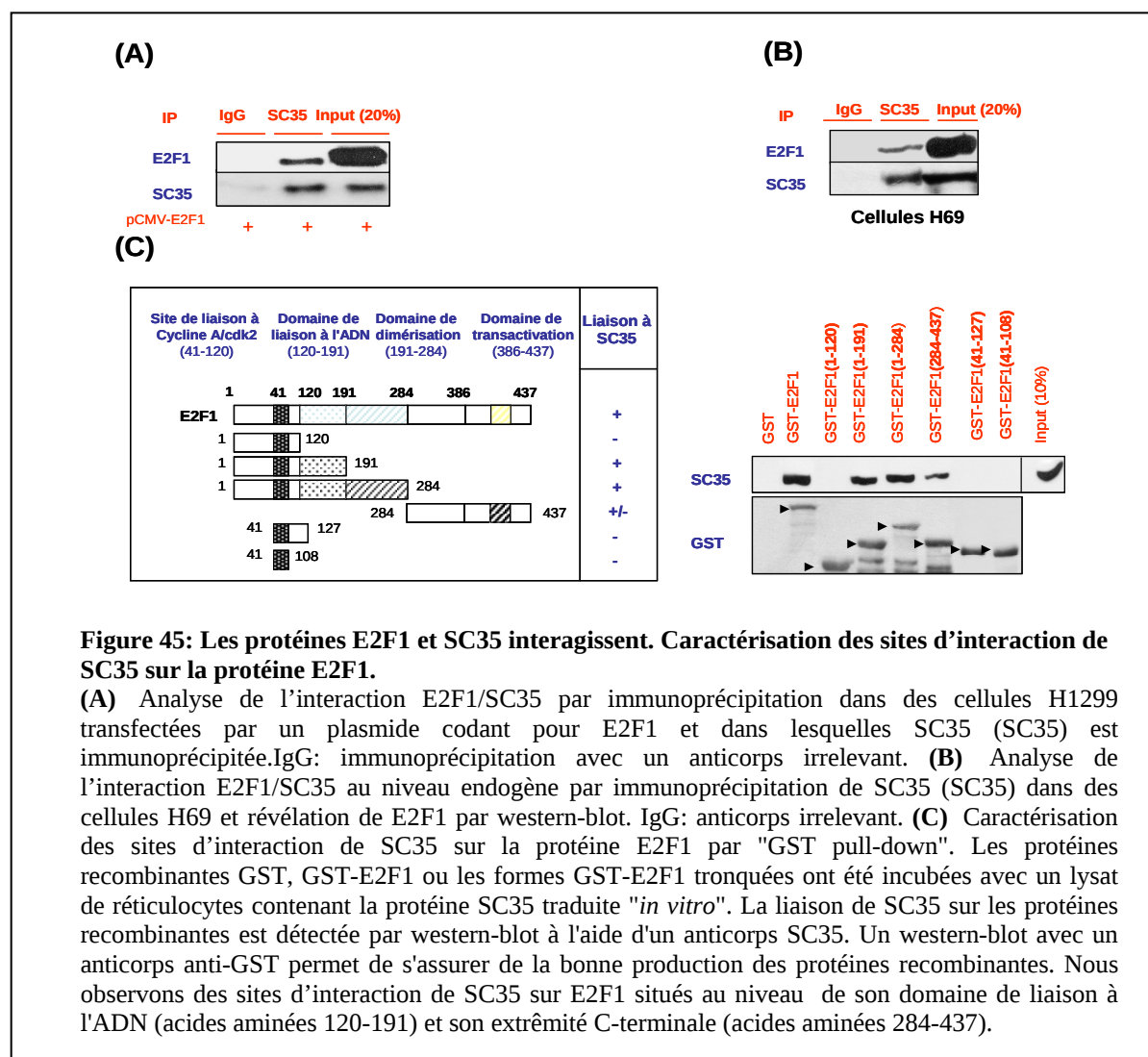
Afin d'approfondir ces résultats, nous avons neutralisé par ARN interférence l'expression de SC35 dans deux lignées cellulaires issues de tumeurs neuroendocrines pulmonaires, les cellules H69 et H810, qui surexpriment la protéine E2F1 (**Figure 43**). De façon intéressante, la neutralisation de SC35 dans ces cellules affecte l'expression de certaines cibles transcriptionnelles de E2F1 impliquées notamment dans la transition G1/S. Ainsi, nous avons observé par Western blot que la neutralisation de SC35 affecte l'expression des protéines DHFR, thymidilate synthase, cycline E, DNA polymérase α , cycline D1 ou p45^{SKP2} (**Figure 43, A**). De plus, par RT-PCR, nous avons montré que la neutralisation de SC35 diminue le niveau des transcrits codants pour les protéines DHFR et cycline E (**Figure 43, B**). Cet effet de SC35 ne passe pas par une diminution du niveau d'expression de E2F1 (données non montrées).



A l'inverse, la surexpression de la protéine SC35 dans la lignée H1299 qui exprime faiblement E2F1, induit l'accumulation des protéines cycline E et DHFR par un mécanisme mettant en jeu une augmentation du niveau de leur transcrit (**Figure 44, A**). De façon importante, la surexpression de SC35 augmente le nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire (**Figure 44, B**). Ces résultats suggèrent que SC35 pourrait participer au contrôle de l'expression de certaines des cibles transcriptionnelles de E2F1 jouant un rôle au cours du cycle cellulaire.



Afin d'approfondir les mécanismes moléculaires par lesquels SC35 contrôle l'expression des cibles d'E2F1, nous avons recherché si les protéines SC35 et E2F1 pourraient interagir. Pour ce faire, nous avons transfecté les cellules H1299 par un plasmide codant pour E2F1 et immunoprécipité SC35 dans ces cellules. Comme le montre la figure 45 A, E2F1 est détectée dans les immunoprécipitats, indiquant que les protéines E2F1 et SC35 interagissent. Nous avons confirmé ces résultats au niveau endogène dans les cellules H69 après immunoprécipitation de la protéine SC35 et révélation par Western-blot de la protéine E2F1 (**Figure 45, B**). Finalement, nous avons identifié le(s) site(s) d'interaction de SC35 sur E2F1 par "GST pull-down" (**Figure 45, C**). Ainsi, par utilisation de différents mutants tronqués de E2F1 incubés avec la protéine SC35 "transcrite-traduite" *"in vitro"* en lysat de réticulocytes, nous avons caractérisé deux sites de liaison de SC35 sur E2F1: le premier site correspond au site de liaison à l'ADN de E2F1 (acides aminés 120–191), et le second site correspond à la région C-terminale de E2F (acides aminés 284-437) incluant le domaine de liaison à RB. Ces résultats démontrent que les protéines E2F1 et SC35 sont capables d'interagir.



Ayant finalement montré que SC35 modifie l'expression des cibles transcriptionnelles de E2F1 et interagit avec E2F1, nous nous sommes demandés si SC35 pourrait modifier l'activité transactivatrice de E2F1. Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé un plasmide rapporteur possédant le promoteur de la cycline E situé en amont du gène codant pour la luciférase (**Figure 46, A**). Pour étudier l'influence des protéines E2F1 et SC35 sur l'activité du promoteur de la cycline E, nous avons transfecté les cellules H1299 ou SAOS2 (cellules d'ostéosarcome humaines) par des concentrations croissantes de plasmides codants pour E2F1 et/ou SC35. Comme attendu, E2F1 stimule l'activité du promoteur de la cycline E (**Figure 46, A**). De façon importante, SC35 augmente significativement l'effet de E2F1 sur ce promoteur. Cependant, seul, SC35 n'a aucun effet stimulateur tant sur le vecteur rapporteur cycline E-luciférase, que sur le vecteur contrôle pGL3-luc (**Figure 46, A**). De plus, SC35 stimule aussi l'activité transactivatrice de E2F1 sur un second gène rapporteur (**Figure 46, B**), contenant le promoteur p45^{SKP2}, un autre gène cible de E2F1. Finalement, pour confirmer ces résultats, nous avons neutralisé l'expression de SC35 par ARN interférence dans les cellules H1299 transfectées ou non avec un plasmide codant pour E2F1 et les différents vecteurs rapporteurs (**Figure 46, C**). Dans ces conditions, la neutralisation de SC35 mais pas un ARN interférent contrôle prévient l'activation des promoteurs de cycline E ou p45^{SKP2} en réponse à E2F1. A l'inverse, le knock-down de SC35 est sans effet sur le vecteur rapporteur contrôle pGL3-luc. Ces résultats indiquent que SC35 est capable de stimuler l'activité transactivatrice de E2F1 sur le promoteur de certains de ses gènes cibles et suggèrent que SC35 pourrait contribuer par ce biais aux fonctions prolifératives de E2F1.

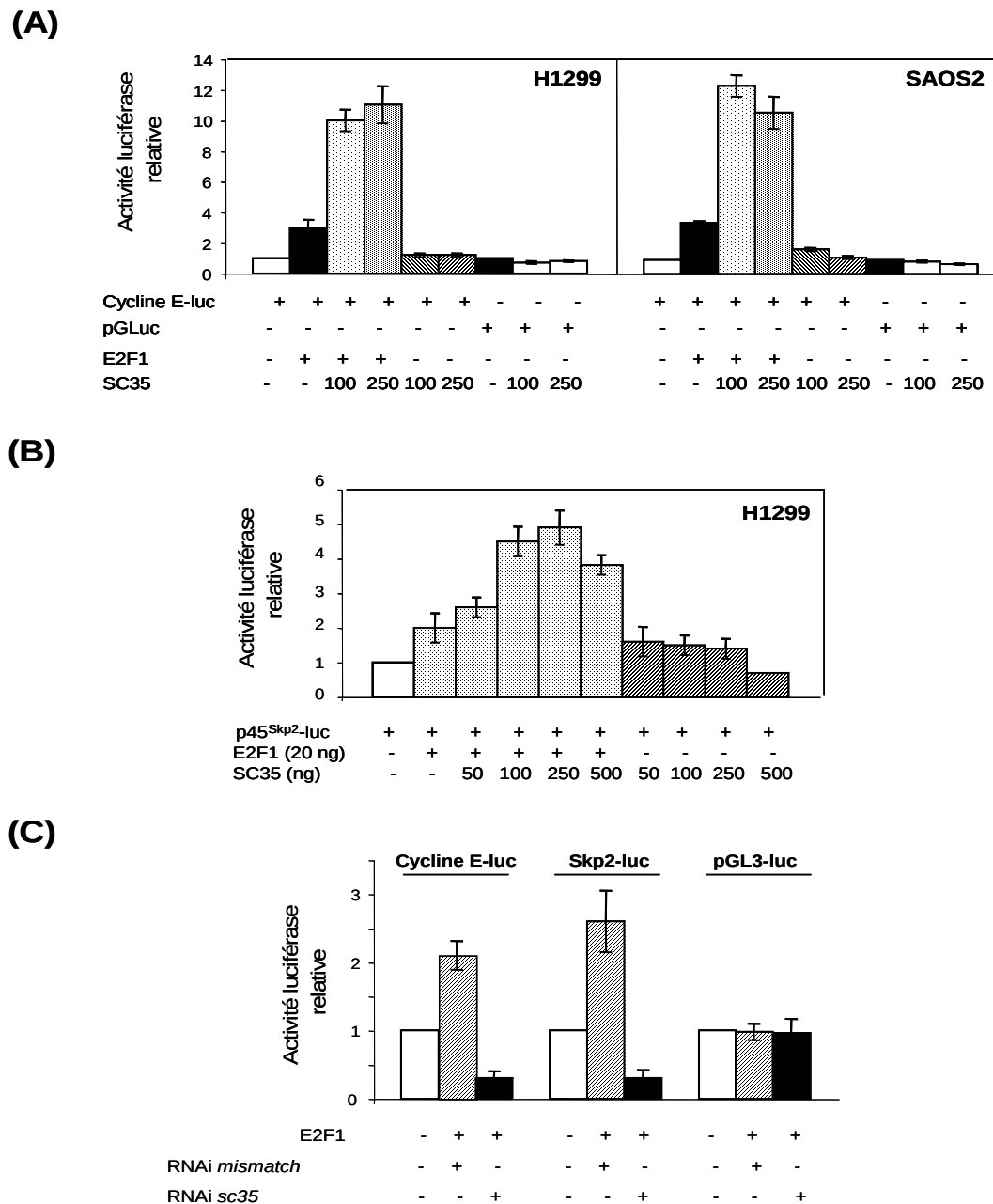
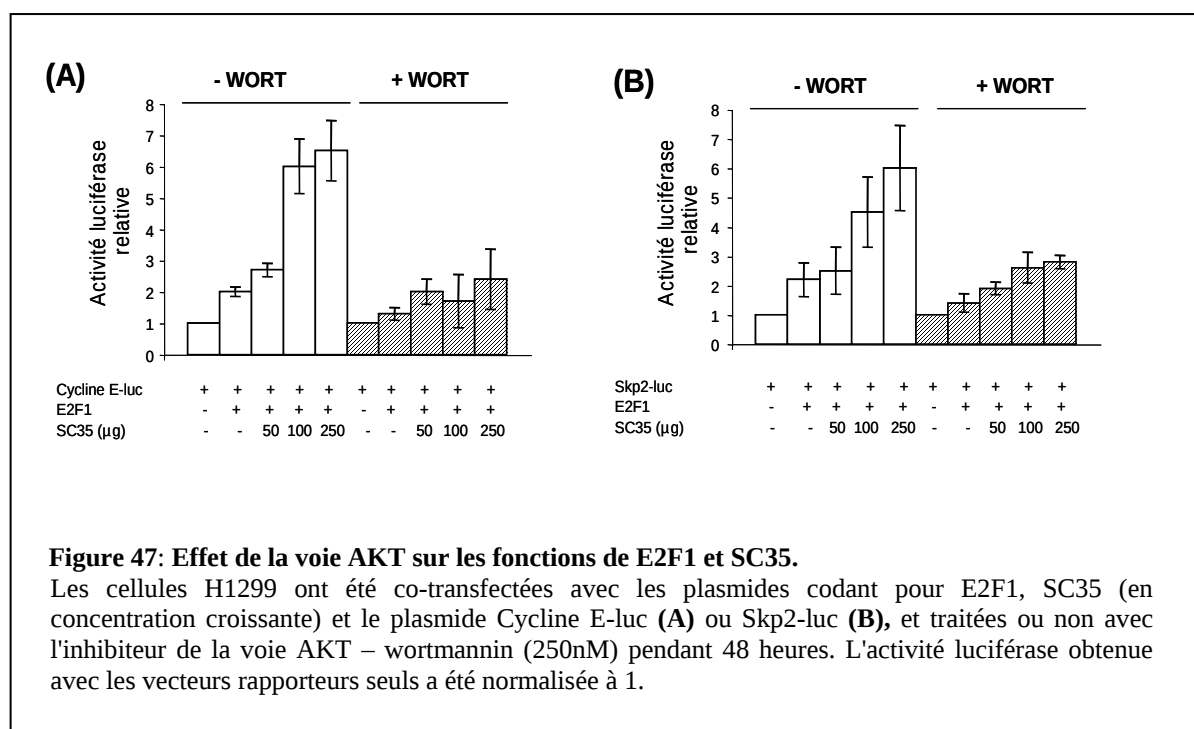


Figure 46: SC35 stimule l'activité transcriptionnelle de E2F1 sur le promoteur de ses gènes cibles cycline E et p45^{SKP2}.

(A) Les cellules d'adénocarcinome pulmonaire H1299 et d'ostéosarcome SaOS2 ont été co-transfectées avec les vecteurs rapporteurs contrôle pGLuc ou contenant le promoteur de la cycline E en amont de la luciférase, en présence ou en absence de plasmides codant pour E2F1 et/ou SC35 comme indiqué. (B) Les cellules H1299 ont été co-transfectées avec le plasmide rapporteur contenant le promoteur de p45^{SKP2} en amont de la luciférase, en présence ou en absence des plasmides codant pour E2F1 et/ou SC35. (C) Les cellules H1299 ont été transfectées avec les plasmides cycline E-Luc, p45^{SKP2}-Luc ou pGL3-luc en absence ou présence du plasmide codant pour E2F1 et co-transfectées par des ARN interférents contrôle (mismatch) ou ciblant SC35(SC35). L'activité luciférase obtenue dans les cellules transfectées par les vecteurs rapporteurs seuls a été normalisée à 1 et l'activité luciférase relative a été calculée pour chaque échantillon.

Comme nous l'avons montré précédemment, la voie AKT est impliquée dans la phosphorylation de SC35 en réponse à E2F1. Finalement, nous avons recherché son rôle dans les effets de SC35 sur l'activité transactivatrice de E2F1. Comme le montre la figure 47, la wortmannin prévient l'activité transactivatrice de E2F1 sur les promoteurs de la cycline E (**Figure 47, A**) et p45^{SKP2} (**Figure 47, B**). De plus, en présence de wortmannin, SC35 n'est plus capable de stimuler l'activité transactivatrice de E2F1 sur ces promoteurs. Ces résultats indiquent que la voie AKT est impliquée dans les fonctions transactivatrices de E2F1 au niveau de certains gènes cibles, et sur les effets de SC35 dans ce contexte.



En conclusion, nos résultats démontrent que SC35 est exprimé dans les cellules tumorales d'une manière cyclique au cours du cycle cellulaire, qu'il interagit avec E2F1 au niveau de son domaine de liaison à l'ADN et qu'il stimule son activité transcriptionnelle au niveau de gènes cibles impliqués dans la transition et la progression en phase S. Ces résultats suggèrent un rôle coopératif de SC35 dans le contrôle des fonctions prolifératives de E2F1, et identifient certains de ses gènes cibles dans ce contexte. Ils suggèrent en outre que SC35 pourrait agir comme un co-activateur transcriptionnel de E2F1.

DISCUSSION

ET PERSPECTIVES

I E2F1 ET SC35: UNE INTERCONNEXION ETROITE POUR LE CONTROLE DE LA CROISSANCE CELLULAIRE

I.1 SC35 : une nouvelle cible de E2F1

I.1.1 SC35 : cible transcriptionnelle directe de E2F1

A l'heure actuelle, très peu de données existent concernant les facteurs protéiques qui contrôlent l'expression des protéines SR et notamment l'implication des facteurs de transcription dans ce contrôle. La famille des protéines E2F avait été impliquée dans le contrôle de l'expression de certaines protéines SR (dont SRp30c, SRp20 et 9G8) via des études de « macro-array » et d'immunoprécipitation de la chromatine identifiant des séquences consensus de fixation des E2Fs sur les promoteurs de ces gènes (Muller, et al., 2001; Ren, et al., 2002; Young, et al., 2003). Cependant, aucune étude n'avait jusqu'à présent recherché le rôle potentiel des protéines SR dans les processus cellulaires contrôlés par les protéines de la famille E2F comme la prolifération ou l'apoptose.

Dans ce travail, nous avons identifié le facteur d'épissage SC35 comme une cible transcriptionnelle directe de E2F1. Nous avons ainsi démontré la capacité de E2F1 à augmenter spécifiquement l'ARN codant pour SC35 dans nos modèles cellulaires de carcinomes pulmonaires surexprimant E2F1. De plus, nous avons montré par des expériences de ChIP que E2F1 est capable de se lier sur le promoteur de *sc35* et de le transactiver. Des études cherchant de nouveaux gènes cibles de E2F1 ont démontré que plusieurs gènes exprimés d'une manière cyclique au cours du cycle cellulaire possèdent sur leurs promoteurs des séquences consensus de liaison à E2F1. Pour notre part, la fixation de E2F1 sur le promoteur de SC35 est détectée dans des cellules asynchronisées et l'affinité de fixation de la protéine E2F1 endogène sur le promoteur de *sc35* augmente en réponse au traitement des cellules avec le cyclophosphamide. Ces résultats indiquent que la fixation d'E2F1 sur le promoteur de *sc35* survient au cours du processus apoptotique. Cependant, puisque nous avons aussi montré que SC35 est une protéine qui cycle, il reste à déterminer si la fixation de E2F1 au niveau du promoteur de *sc35* est aussi modulée au cours du cycle cellulaire.

Nos résultats décrivent le premier lien fonctionnel entre E2F1 et l'un des facteurs qui régulent l'épissage. Il reste à savoir si l'expression d'autres protéines SR pourrait être régulée

par E2F1. Il a été suggéré que E2F1 est capable de réguler l'expression de la protéine SRp20 (Jumaa, et al., 1997). Dans des modèles murins, les auteurs ont montré que SRp20 est exprimée "*in vivo*" d'une manière cyclique au cours du cycle cellulaire et s'accumule à la fin de la phase G1 et au cours de la transition en phase S. Ils ont aussi identifié après séquençage du gène, un deuxième promoteur possédant deux séquences consensus pour E2F1. Ces résultats suggèrent une régulation de l'expression de SRp20 par les protéines E2F et particulièrement par E2F1 au cours du cycle cellulaire. Cependant, dans ce travail, nous avons étudié le niveau d'expression de la protéine SRp20 et d'autres protéines SR dans nos modèles cellulaires surexprimant E2F1 ou down-régulés pour l'expression de E2F1 et nous n'avons pas observé d'effet de E2F1 sur leur expression. Il est possible que la régulation des protéines SR médiée par E2F1 ou d'autres facteurs E2F dépende du contexte tissulaire, cellulaire et/ou des co-signaux d'amont reçus par la cellule.

I.1.2 E2F1 contrôle l'épissage de SC35

Des données de la littérature indiquent que SC35 est capable de réguler l'épissage alternatif de son propre gène et active des événements d'épissage qui déstabilisent son ARNm (Sureau, et al., 2001). Parallèlement à l'activité transcriptionnelle de E2F1 sur le promoteur de *sc35*, nous avons observé que la surexpression de E2F1 conduit à l'accumulation d'un transcrit de SC35 à 1,7kb, celui la même décrit comme instable et dégradé par le système NMD. Nos résultats suggèrent l'existence d'une possible boucle de rétrocontrôle négatif, par laquelle SC35 accumulé en réponse à E2F1 pourrait contrôler négativement son niveau d'expression. De façon intéressante, nous avons observé dans nos clones stables inductibles pour E2F1, une décroissance du niveau d'expression de SC35 survenant 6 jours après le début de l'induction par la doxycycline. Ces résultats sont en accord avec cette possible boucle de contrôle négatif. E2F1 apparaît donc comme capable à la fois de stimuler au niveau transcriptionnel l'accumulation du transcrit codant pour SC35, mais aussi de contrôler l'épissage alternatif de SC35. De façon intéressante, cette boucle de retro-contrôle négatif décrite pour SC35 semble être un mécanisme commun à d'autres facteurs d'épissage. Ainsi, il a été montré que les facteurs d'épissage Tra-2 chez la drosophile, SWAP et la protéine murine SRp20 autorégulent l'épissage alternatif de leur propre pré-ARNm conduisant à l'expression de formes tronquées (Jumaa and Nielsen, 1997; Mattox and Baker, 1991; Zachar, et al., 1994). Il reste à déterminer si E2F1 pourrait aussi jouer un rôle dans ce contexte. Il a été démontré que le rôle des protéines SR dans la sélection des sites alternatifs d'épissage dépendait aussi de leur

concentration dans la cellule, ainsi que de la concentration de leurs antagonistes les protéines hnRNP A/B (Smith and Valcarcel, 2000). Cependant, les mécanismes et les facteurs protéiques impliqués dans le contrôle de cette balance sont encore mal connus (Fu and Maniatis, 1992a; Hanamura, et al., 1998; Screaton, et al., 1995; Vellard, et al., 1992). Dans notre étude, nous nous sommes aussi intéressés aux protéines hnRNP. Nous avons recherché l'effet de E2F1 sur l'expression de certaines protéines de cette famille, mais nos résultats n'ont pas montré d'effet.

I.1.3 E2F1 régule la phosphorylation de SC35

La modulation du niveau de phosphorylation des protéines SR contrôle leur activité, leur spécificité et leur localisation subcellulaire. Plusieurs kinases, dont SRPK1, SRPK2, Clk/Sty ou l'ADN topoisomérase I, ont été décrites comme phosphorylant les protéines SR, mais rien n'est actuellement connu sur les signaux d'amont qui activent ces kinases, les sites de phosphorylation sur les protéines SR, et leur spécificité sur telles ou telles protéines SR. Nos résultats montrent que E2F1 modifie le niveau de phosphorylation de SC35 dans nos modèles cellulaires. Cette variation de la phosphorylation semble affecter à la fois la localisation subcellulaire de SC35, mais aussi pourrait modifier son activité. Ainsi, E2F1 induit l'accumulation de la forme phosphorylée de SC35 dans des speckles nucléaires de grosse taille. Cet effet de E2F1 sur la phosphorylation de SC35 nécessite sa fixation sur l'ADN, parce que la forme mutante de E2F1 (E132) n'est pas capable d'induire la phosphorylation de SC35, ni son accumulation dans les speckles. Des études récentes suggèrent un rôle beaucoup plus actif des speckles dans le couplage transcription/épissage que le rôle suggéré initialement (Hall, et al., 2006; Stamm, 2008). Ces travaux proposent que les speckles transcriptionnellement actifs ont une forme irrégulière et une plus grosse taille causée par l'accumulation, dans des structures appelées "paraspeckles" de différents facteurs de transcription et d'épissage (Kavanagh, et al., 2005) (**Figure 33**). Cette région enrichie significativement en ARN poly (A), est associée avec plusieurs fibres péri-chromatiniennes et contient aussi différents facteurs d'épissage dont les protéines SR. En tenant compte de ces données, il semble possible que E2F1 stimule l'accumulation de la forme phosphorylée de SC35 dans ces régions périphériques des speckles où SC35 participerait aux processus d'épissage. Il faudrait réaliser des expériences de microscopie confocale pour affiner nos résultats.

De façon intéressante, alors que la phosphorylation des protéines SR par les kinases Clk/Sty ou SRPK surexprimées dans les cellules induit leur délocalisation des speckles vers le nucléoplasme, la surexpression d'AKT ne modifie pas l'accumulation des protéines SR dans les speckles nucléaires (Blaustein, et al., 2005). Dans nos modèles cellulaires, nous montrons que la voie PI3K/AKT est impliquée dans la phosphorylation de SC35 médiée par E2F1 puisque la wortmannin, un inhibiteur d'AKT, prévient la phosphorylation de SC35 en réponse à E2F1 et son accumulation dans les speckles de grande taille. Ces résultats sont en accord avec des données de la littérature montrant que E2F1 est capable d'activer la voie AKT (Ladu, et al., 2008; Levine, et al., 2006). De plus, cette voie de signalisation semble importante dans le contrôle de la balance prolifération/apoptose contrôlée par E2F1 via la répression de gènes cibles pro-apoptotiques de E2F1 (Hallstrom, et al., 2008). Il reste à approfondir dans nos modèles d'étude le rôle exact de la phosphorylation de SC35 dépendante d'AKT sur ses fonctions apoptotiques et/ou prolifératives. Dans ce contexte, il faudrait regarder l'effet des inhibiteurs de la voie AKT sur la capacité de SC35 à réguler l'épissage alternatif des cibles que nous avons identifiées. Il est aussi possible que des kinases autres que AKT phosphorylent SC35 et contrôlent son activité en réponse à E2F1 ou non, dans nos modèles d'étude. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire suggèrent que la famille SRPK participe aussi à la phosphorylation de SC35 en réponse aux agents endommageant l'ADN. Dans ce contexte, nos données indiquent que la phosphorylation de SC35 par les SRPKs pourrait conditionner sa fonction apoptotique. De plus, nous montrons que E2F1 et SC35 contrôlent l'épissage de la kinase Clk/Sty. Ainsi, nous avons observé une modification de l'épissage alternatif de Clk/Sty dans les cellules surexprimant E2F1 en faveur de l'isoforme inactive tronquée (tSty), par un mécanisme mettant en jeu SC35. Ces résultats indiquent que E2F1 est capable de réguler l'activité de deux des kinases, AKT et Clk/Sty, phosphorylant les protéines SR. Puisqu'il a été montré que l'hyperphosphorylation de SC35 par la kinase Clk/Sty à la fin du processus de maturation de l'ARNm l'inactive, nos données suggèrent que E2F1 régule à la fois la localisation subcellulaire et l'activité de SC35 via le contrôle qu'elle exerce sur AKT et Clk/Sty. De plus, dans la mesure où le cycle dynamique phosphorylation/déphosphorylation des protéines SR est nécessaire pour la réaction d'épissage il reste à déterminer comment E2F1 régule l'épissage des gènes cibles identifiés (*caspase-8*, *-9*, *bcl-x*) tout en maintenant SC35 sous sa forme phosphorylée. Finalement, la phosphorylation des protéines SR étant nécessaire à leur interaction avec le domaine CTD de l'ARN polymérase II (Hirose and Manley, 2000; Misteli and Spector, 1999), il nous reste à déterminer si E2F1 modifie aussi

l'interaction de SC35 avec l'ARN polymérase II, suggérant un autre moyen pour E2F1 de contrôler les fonctions de SC35.

I.1.4 E2F1 et SC35 interagissent directement

Nous montrons que les protéines SC35 et E2F1 sont capable d'interagir. Sur la base du couplage transcription/épissage, une interaction de facteurs de transcription avec des composants de la machinerie du spliceosome a été rapportée, et le rôle de ces facteurs de transcription dans l'épissage démontré (Chansky, et al., 2001; Guillouf, et al., 2006). De façon importante, le facteur de transcription Spi-1/PU.1 est capable de modifier l'épissage de certains de ses gènes cibles, indépendamment de sa capacité à les transactiver. Nous montrons que E2F1 aussi affecte l'épissage de certains de ses gènes cibles, dont les caspases. Nous savons que la liaison à l'ADN de E2F1 est nécessaire à son activité sur le profil d'épissage. Il nous reste à savoir si son activité transactivatrice est requise. Nous avons identifié les sites d'interaction de SC35 sur E2F1 et caractérisé deux sites de liaison: le premier site correspond au domaine de liaison à l'ADN de E2F1 (acides aminés 120–191), et le second, plus faible, correspond à la région C-terminale de E2F1 (acides aminés 284-437) incluant le domaine de liaison à RB. Nous avons recherché si SC35 modifiait la capacité de E2F1 à lier l'ADN. Nous n'avons pas trouvé d'effet de SC35. Sur la base de ces résultats, nous émettons donc l'hypothèse selon laquelle E2F1 pourrait recruter SC35 au niveau du promoteur de certains de ses gènes cibles, et par ce biais modifierait l'épissage du pré-ARNm et/ou le niveau de transcrit. SC35 pourrait donc agir comme un co-activateur transcriptionnel de E2F1 (**Figure 48**). De façon intéressante, nous avons effectué des expériences préliminaires d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), et retrouvé SC35 au niveau du promoteur de certains gènes cibles de E2F1 dont *c-flip*. Ces résultats vont donc dans le sens de notre modèle. De plus, ils suggèrent la possibilité que E2F1 recrute aussi d'autres composants de la machinerie du spliceosome, voir même d'autres protéines SR. Nous n'avons pas recherché l'interaction de E2F1 avec d'autres protéines SR dans ce travail. Dans ce modèle, il reste aussi à déterminer si la neutralisation de SC35 modifie la liaison de E2F1 au niveau de certains promoteurs de ses cibles.

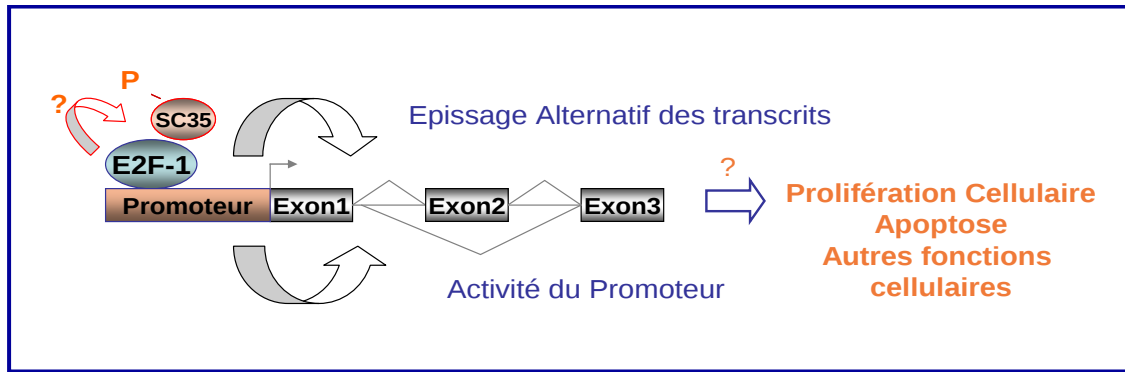


Figure 48: Hypothèse de travail basée sur le couplage transcription/épissage.

Via sa liaison à E2F1, la protéine SC35 pourrait être recrutée au niveau du promoteur de certains gènes cibles de E2F1. Selon le gène envisagé et les signaux associés, ce recrutement pourrait contribuer à la régulation de l'épissage alternatif du transcrit de ce gène, déterminant ainsi le type d'isoforme protéique produit ou modifier l'activité transactivatrice de E2F1 au niveau de ce promoteur, conditionnant le niveau de transcrit produit. Ainsi, SC35 participerait aux activités prolifératives, apoptotiques, ou aux autres fonctions cellulaires de E2F1

I.2 E2F1 et SC35 coopèrent pour induire l'apoptose

I.2.1 Caractérisation d'une nouvelle voie de signalisation par laquelle E2F1 induit l'apoptose.

La protéine E2F1 est capable d'induire l'apoptose des cellules par deux mécanismes différents: (1) d'une manière dépendante de la transcription par transactivation de gènes cibles apoptotiques variés, tels que p14^{ARF}, p73, Apaf-1, certaines caspases, Bcl-2, Bad et les co-facteurs pro-apoptotiques de p53, ASPP1 et ASPP2; (2) de manière indépendante de la transcription par inhibition des voies de signalisation anti-apoptotiques ou par stimulation des voies pro-apoptotiques (Bell, et al., 2006; Iaquinta and Lees, 2007). Dans cette étude, nous identifions un nouveau mécanisme par lequel E2F1 induit l'apoptose, via le contrôle de l'épissage alternatif de gènes apoptotiques. De façon importante, certains des gènes dont l'épissage est modifié par E2F1 sont des gènes ciblés transcriptionnellement par E2F1, suggérant l'existence d'un double niveau de contrôle pour induire l'apoptose.

L'apoptose est un processus cellulaire dans lequel l'épissage alternatif joue un rôle régulateur très important puisque l'expression d'un grand nombre de gènes apoptotiques est régulée par épissage alternatif produisant des isoformes protéiques aux fonctions antagonistes: pro- ou anti-apoptotiques. De façon importante, il a été montré que certains facteurs d'épissage sont impliqués dans l'apoptose. Par exemple, la perte de SF2/ASF induit l'apoptose (Li, et al., 2005) indiquant que SF2/ASF est une protéine anti-apoptotique dans certains modèles. A

l'inverse, une autre étude démontre que l'expression ectopique de SC35 modifie l'épissage alternatif de l'ARNm de la *caspase-2* en faveur de son isoforme pro-apoptotique et induit l'apoptose (Jiang, et al., 1998). Ces données indiquent un rôle distinct des protéines SR dans la régulation de l'apoptose qui pourrait dépendre du type cellulaire, mais aussi des voies de signalisation qui se trouvent en amont de ces facteurs d'épissage et qui régulent leur expression et leur activation au cours de l'apoptose. Dans cette étude, nous identifions E2F1 comme un acteur régulant en amont l'expression de SC35 pour induire l'apoptose. En accord avec ces résultats, la neutralisation de SC35 par ARNi dans nos cellules inhibe l'apoptose induite en réponse à E2F1.

Nous avons préalablement montré au laboratoire que E2F1, via la modification de la balance des isoformes c-FLIP_{Court}/c-FLIP_{Long}, induisait l'activation de la caspase-8 au niveau du DISC et par ce biais l'apoptose (Salon, et al., 2006). Rien n'était connu jusqu'alors sur les facteurs d'épissage impliqués dans ce contrôle. Dans ce travail, nous montrons que SC35 régule négativement l'expression de c-FLIP_{Court} sans modifier l'expression de c-FLIP_{Long} et affecte donc cette balance. Ces résultats sont importants dans la mesure où il a été montré que la protéine c-FLIP_{Court} est un des déterminants majeurs de la réponse des cellules tumorales à la voie des récepteurs de mort, Fas ou TRAIL. Puisque la voie TRAIL est actuellement la cible d'agents anti-cancéreux, il est tentant de spéculer que SC35 pourrait conditionner la réponse des cellules tumorales à ces agents. Nous sommes en train d'élaborer des cellules stables et inductibles pour SC35 dans lesquelles nous testerons l'effet de la surexpression de SC35 sur la réponse des cellules tumorales à ces thérapies ciblant la voie de récepteurs de mort. De plus, il serait intéressant de rechercher si SC35 affecte l'épissage d'autres gènes impliqués dans cette voie, tels que Fas lui-même qui est régulé par épissage alternatif, ou Fas Ligand.

I.2.2 Rôle de cette voie dans la réponse aux agents génotoxiques

Il est bien connu que E2F1 s'accumule en présence d'un stress génotoxique et engage les cellules vers l'apoptose de manière dépendante ou non de p53 (Hong, et al., 2006; Hsieh, et al., 2002; Stevens, et al., 2003). A l'inverse, très peu de données existent concernant le rôle des protéines SR dans le contexte du stress génotoxique. Pourtant, il a été proposé que des altérations de l'épissage alternatif pourraient contribuer à la résistance des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques via la surexpression de variants codant pour les isoformes anti-apoptotiques (Hayes, et al., 2006; Mercatante and Kole, 2000). Nous montrons que SC35 s'accumule en réponse au traitement par le cyclophosphamide et le MMS dans les cellules de

carcinomes pulmonaires, et que cette accumulation nécessite E2F1. Nous avons confirmé ces données en réponse au cisplatine. De plus, nous montrons que les deux protéines coopèrent pour induire l'apoptose, en modifiant l'épissage de *bcl-x* et de la *caspase-9* en faveur des isoformes pro-apoptotiques. Nos travaux identifient donc SC35 comme un médiateur de la réponse au stress. De façon intéressante, des résultats que nous avons obtenu au laboratoire indiquent que SC35 s'accumule sous forme phosphorylée dans les cellules traitées par le cyclophosphamide ou le cisplatine et est aussi indispensable à l'apoptose des cellules en réponse à ces agents. De façon surprenante, nous avons aussi obtenu des résultats préliminaires indiquant que SC35 est un facteur de résistance à l'apoptose induite par l'étoposide. Il semble donc que SC35 puisse jouer des fonctions antagonistes pro- ou anti-apoptotiques selon l'agent génotoxique envisagé. Ces résultats sont intéressants car E2F1 est aussi capable d'exercer des fonctions pro- ou anti-apoptotiques en réponse aux stress génotoxiques, via notamment son rôle dans la réparation des lésions sur l'ADN. Une étudiante en M2 au laboratoire étudie actuellement le rôle éventuel de SC35 dans les mécanismes de réparation de ces lésions. Ces résultats indiquant un rôle de SC35 dans la réponse aux agents génotoxiques sont en accord avec d'autres travaux récents montrant que la protéine SC35 s'accumule dans des fibroblastes BALB/ 3T3 en réponse aux gamma-radiations (Cardoso, et al., 2002) ou que le niveau d'expression de certaines protéines SR (SRp55, SRp40, SRp30) augmente en réponse à la mitomycine C (Filippov, et al., 2007). Il reste cependant à déterminer les gènes cibles de ces protéines dans ce contexte. La compréhension des mécanismes moléculaires mettant en jeu ces protéines est importante car elle donnera peut-être de nouveaux outils dans le traitement des cellules tumorales avec les agents utilisés en chimiothérapie.

I.3 SC35 contrôle les fonctions prolifératives de E2F1

I.3.1 SC35: une protéine qui cycle au cours de la division cellulaire

Une nouvelle fonction des protéines SR dans le contrôle du cycle cellulaire a été décrite (Rasheva, et al., 2006). En accord avec le fait que SC35 est une cible transcriptionnelle directe de E2F1, nous montrons que SC35 est une protéine qui cycle. Ainsi, l'ARN et le niveau protéique de SC35 varient au cours du cycle cellulaire, avec un pic lors de la transition G1/S qui coïncide avec l'augmentation de l'expression de la protéine E2F1, et de certaines de ses cibles régulant la progression en phase S comme DHFR et la cycline E. Il faudra maintenant vérifier si le recrutement de E2F1 au niveau du promoteur de SC35 varie lui aussi au cours du cycle cellulaire afin de savoir si cette régulation de SC35 est bien dépendante de E2F1. De plus, il serait aussi intéressant de tester le niveau de phosphorylation de SC35 dans ce contexte. De façon importante, nos travaux suggèrent un rôle de SC35 au cours de la progression en phase S puisque la neutralisation de SC35 par ARN interférence diminue le nombre de cellules en phase S, et inversement sa surexpression augmente le nombre des cellules en phase S. Nous avons confirmé ces résultats en réalisation des tests d'incorporation de Brdu dans ces cellules, et nous avons montré que la neutralisation de SC35 prévient l'incorporation de Brdu, donc la réplication de l'ADN. Ces résultats mettent pour la première fois en évidence le rôle de SC35 dans le contrôle de la division cellulaire de cellules tumorales humaines, même si un rôle de SC35 dans le contrôle de la transition G2/M a été récemment décrit dans des MEF (Xiao, et al., 2007). De plus, nos données identifient certains des gènes cibles de SC35 dans ce contexte puisque la neutralisation ou la surexpression de SC35 dans nos modèles d'étude affecte le niveau d'expression des protéines cycline E, DHFR ou Thymidilate synthase, toutes impliquées dans les processus de réplication de l'ADN et gènes cibles de E2F1.

I.3.2 SC35: un régulateur des activités transactivatrices de E2F1

Nos travaux montrent que SC35 potentialise l'activité transactivatrice de E2F1 au niveau de certains de ses promoteurs cibles comme cycline E et p45^{SKP2}. En revenant sur notre modèle hypothétique (Figure 49), ces résultats suggèrent qu'au cours de la prolifération, E2F1 pourrait recruter SC35 sur le promoteur de ses gènes, et qu'en réponse, SC35 stimulerait l'activité transactivatrice de E2F1 sur ces promoteurs. Dans ce contexte, SC35 se comporterait comme un co-régulateur transcriptionnel de E2F1. Récemment, un rôle de SC35 en tant que stimulateur de l'élongation de la transcription de gènes spécifiques a été rapporté (Lin, et al., 2008). S'il s'avère que SC35 est effectivement recruté au niveau du promoteur de certains gènes via E2F1 et stimule son activité transactivatrice, SC35 pourrait donc aussi jouer un rôle positif sur l'étape d'initiation de la transcription. Nous avons recherché la fixation de SC35 par ChIP sur les promoteurs de la cycline E, DHFR ou cycline A dans nos modèles cellulaires, sans succès. Nous sommes actuellement en train de refaire ces expériences dans des cellules synchronisées car il se peut que la fixation de SC35 sur ces promoteurs soit dépendante du cycle. De plus, nous avons obtenu des résultats préliminaires montrant que la neutralisation de SC35 prévient la fixation de E2F1 sur le promoteur de la cycline E, suggérant l'existence d'une coopération étroite entre les deux protéines au niveau des promoteurs de certains gènes.

Parallèlement, nous recherchons si SC35 affecte le recrutement de RB au sein des complexes transcriptionnels mettant en jeu E2F1. Nous avons déjà obtenu des résultats indiquant que SC35 contrôle négativement le niveau d'expression de RB, en accord avec l'effet positif exercé sur l'activité transactivatrice de E2F1. Enfin, l'activité transactivatrice de E2F1 au niveau des promoteurs étant étroitement contrôlée par son interaction avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, nous avons entrepris de rechercher si SC35 ne pourrait pas interagir avec des protéines de ce type. Le travail de Valérie Edmond au laboratoire a permis d'identifier une histone acétyltransférase, la protéine Tip60, comme un nouveau partenaire de SC35. De façon intéressante, il a été montré que Tip60 est recruté au niveau de certains promoteurs cibles de E2F1 et stimule leur activité.

II IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE FONCTION BIOLOGIQUE DE E2F1 DANS LE CONTROLE DU PROCESSUS ANGIOGENIQUE

II.1 E2F1 affecte la balance des variants pro- versus anti-angiogéniques du VEGF-A

Nous montrons dans notre modèle cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire H358 dépourvu de p53 et dans des conditions normoxiques que la protéine E2F1, mais pas sa forme mutante E2F1(E132), est capable de diminuer spécifiquement l'expression des isoformes pro-angiogéniques du VEGF-A (VEGF_{xxx}) au niveau protéique et ARNm. Ainsi, nous confirmons l'effet inhibiteur de E2F1 sur l'expression du VEGF et démontrons que E2F1 contrôle négativement l'expression du VEGF de façon indépendante de p53. Nous n'avons pas observé de variations globales du niveau d'expression entre les isoformes VEGF_{xxx}: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, sous l'effet de E2F1 qui les diminue toutes de la même façon. Ces résultats sont en accord avec le fait que E2F1 réprime le promoteur du VEGF-A. Ils suggèrent aussi que E2F1 ne module pas l'épissage alternatif des isoformes pro-angiogéniques. A l'inverse, nous montrons que E2F1 n'affecte pas négativement le niveau d'expression des isoformes anti-angiogéniques VEGF_{xxx}b. Ces résultats indiquent que E2F1 module la balance VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b en faveur des isoformes anti-angiogéniques. Les mécanismes moléculaires par lesquels E2F1 favorise l'expression des variants VEGF_{xxx}b pourraient mettre en jeu: (1) une inclusion de l'exon 8b via une sélection préférentielle du site distal; (2) une augmentation de la stabilité des transcrits VEGF_{xxx}b puisqu'il a été récemment décrit un rôle de E2F1 dans le contrôle de la stabilité des ARN (Petrocca, et al., 2008); (3) un effet stimulateur de E2F1 sur la traduction des ARNm codant pour les isoformes VEGF_{xxx}b, puisqu'il a aussi été montré un rôle de E2F1 dans ce processus (Sylvestre, et al., 2007; Woods, et al., 2007). De plus, un travail visant à étudier les voies de signalisation mises en jeu dans ces effets a été initié. Ainsi, la voie AKT activée par E2F1 pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la balance VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b. Nous étudions l'effet de la wortmannin sur ces transcrits. Nos résultats identifient donc E2F1 comme une protéine anti-angiogénique, du moins dans nos modèles cellulaires. Une autre étude récente a identifié le co-récepteur NRP1 (neuropiline 1) comme une cible transcriptionnelle directe de E2F1 dans un modèle neuronal (Jiang, et al., 2007). Une de nos hypothèses actuelles est donc que E2F1 pourrait moduler à la

fois l'expression du VEGF et sa sécrétion, mais aussi contrôler le niveau d'expression des récepteurs du VEGF à la surface des cellules tumorales. Cela impliquerait E2F1 dans un contrôle de l'effet paracrine du VEGF sur les cellules endothéliales via la régulation de son expression et de sa sécrétion, mais aussi autocrine sur les cellules tumorales via l'effet sur les récepteurs. Ceci est d'importance, puisque les thérapies anti-angiogéniques ciblent à la fois le VEGF mais aussi ses voies de signalisation via ses récepteurs. Nous sommes actuellement en train de regarder l'effet de la surexpression et/ou de la neutralisation de E2F1, sur le niveau des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 dans nos modèles d'étude. De plus, nos résultats suggèrent que E2F1 pourrait conditionner la réponse des cellules tumorales aux thérapies anti-angiogéniques. En effet, l'anticorps monoclonal anti-VEGF, bevacizumab (Avastin®), reconnaît avec la même affinité les isoformes VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b, et il a été montré que la surexpression de l'isoforme VEGF₁₆₅b diminue la réponse de xénogreffes de carcinomes coliques et rénaux à l'Avastin®. Ainsi aujourd'hui, après la découverte des variants anti-angiogéniques VEGF_{xxx}b, la stratégie dans la recherche des médicaments anti-angiogéniques doit être différente. Dans cette stratégie, il faut tenir compte de la balance entre les isoformes pro- et anti-angiogéniques en recherchant des facteurs et des voies de signalisation contribuant au contrôle de cette balance. Nos travaux identifient E2F1 comme l'un des déterminants de cette balance.

II.2 Rôle des protéines SR dans cette fonction

Après avoir démontré que E2F1 régule la balance des variants VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b et favorise l'expression des isoformes anti-angiogéniques VEGF_{xxx}b, la question logique était d'investiguer le rôle de SC35 dans ces effets. De façon surprenante, nous avons observé que la neutralisation par ARN interférence de SC35 dans différentes lignées cellulaires diminue fortement l'expression de l'isoforme VEGF₁₆₅ sans affecter l'expression des isoformes VEGF₁₂₁ et VEGF₁₈₉. Ces résultats indiquent que SC35 est un régulateur positif de l'expression du VEGF₁₆₅ dans les cellules de carcinomes pulmonaires et n'exerce donc pas les mêmes fonctions que E2F1 dans le contrôle de l'expression du VEGF. Ils suggèrent aussi que contrairement à E2F1, SC35 est capable de réguler spécifiquement les isoformes angiogéniques du VEGF-A. Les facteurs d'épissage de la famille SR pourraient donc contrôler l'épissage alternatif des isoformes angiogéniques VEGF_{xxx}. De façon intéressante, une étude très récente réalisée dans des cellules normales a identifié un rôle potentiel des protéines SR dans le contrôle de la balance entre les isoformes pro-et anti-angiogéniques du VEGF (Nowak,

et al., 2008). Cette équipe a identifié la protéine SRp55 comme un régulateur positif de l'expression des isoformes VEGF_{xxx}b. A l'inverse, SF2/ASF et SRp40 stimulent l'expression des isoformes VEGF_{xxx} au détriment des formes VEGF_{xxx}b.

Dans nos modèles d'étude, nous avons obtenu des résultats différents selon le modèle cellulaire envisagé, puisque la neutralisation de SC35 affecte soit positivement, soit négativement l'expression des isoformes VEGF_{xxx}b. Ainsi, la capacité de SC35 à réguler la balance des isoformes VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b pourrait dépendre du type cellulaire et/ou des co-signaux reçus par la cellule. En accord avec ces données, nous avons pu montrer que SC35 est nécessaire à l'augmentation du VEGF₁₆₅b en réponse à la surexpression de E2F1. Nous approfondissons actuellement ces résultats, en analysant notamment le rôle de SF2/ASF dans ces effets.

III IMPLICATION DES PROTEINES E2F1 ET SC35 AU COURS DU PROCESSUS DE CARCINOGENESE BRONCHIQUE

III.1 Expression des protéines E2F1 et SC35 dans les tumeurs bronchiques

Comme discuté dans l'introduction, des modifications de l'expression et/ou de l'activité des protéines SR pourraient conduire à une altération des profils d'épissage et à une dérégulation de fonctions cellulaires essentielles contribuant à la tumorigénèse. Dans plus de 90 % des adénocarcinomes pulmonaires, l'expression de E2F1 est très faible, voir indétectable, alors que les tumeurs pulmonaires neuroendocrines incluant les carcinomes à petites cellules surexpriment E2F1 (Eymin, et al., 2001). Sur la base de nos résultats identifiant SC35 comme une nouvelle cible transcriptionnelle de E2F1, il était donc tentant de spéculer que les anomalies d'expression de E2F1 détectées dans les tumeurs bronchiques pourraient conduire à une dérégulation du niveau d'expression de certaines protéines SR dont SC35. A l'heure actuelle, aucune donnée n'existe concernant le niveau d'expression de SC35 et/ou de sa forme phosphorylée dans une large série de tumeurs pulmonaires. Cependant, il a été récemment montré que SF2/ASF était surexprimé dans une série de tumeurs du poumon et du colon (Karni, et al., 2007), via notamment une amplification du gène. De plus, certaines protéines SR, dont SRp20, sont surexprimées dans les cancers du sein (Stickeler, et al., 1999). Ces données sont en accord avec une expression anormale des protéines SR dans les tumeurs humaines, susceptible de conditionner en aval des anomalies d'épissage.

Nous avons entrepris une étude à large échelle de l'expression des protéines SC35 et P-SC35 par immunohistochimie (IHC) dans les tumeurs pulmonaires. Nos résultats préliminaires obtenus sur 86 carcinomes pulmonaires non à petites cellules incluant 48 carcinomes malpighiens et 38 adénocarcinomes indiquent que SC35 s'accumule sous forme phosphorylée dans la majorité de ces tumeurs comparativement au tissu normal associé. Dans la mesure où ces tumeurs, et notamment les adénocarcinomes, expriment de faibles niveaux d'expression de E2F1, ces données suggèrent que d'autres régulateurs (autres facteurs de la famille E2F ??) pourraient intervenir dans le contrôle de l'expression de SC35 et contribuer à la dérégulation de son niveau de phosphorylation. Dans nos modèles cellulaires, une inhibition de la phosphorylation de SC35 en présence d'inhibiteurs de la voie AKT a été observée. Il se peut

que cette voie soit impliquée dans l'hyperphosphorylation de SC35 détectée dans les tumeurs bronchiques. Nous recherchons aussi si le niveau de transcription de SC35 varie entre tissu normal et tumoral. De plus, nous souhaitons étendre cette étude aux tumeurs neuroendocrines pulmonaires.

III.2 Conséquences possibles sur la carcinogénèse bronchique

Nous avons conforté les résultats précédemment obtenus au laboratoire démontrant que la restauration de l'expression de E2F1 dans des modèles de carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBnPC) induit l'apoptose (Salon, et al., 2006) et identifié une nouvelle cible de E2F1 dans ce contexte. Comme le montre le schéma (**Figure 49**), la faible expression de E2F1 détectée dans les CBnPC pourrait donc favoriser leur survie. Nous avons aussi mis en évidence une nouvelle fonction de E2F1 indépendante de p53 dans le contrôle du processus angiogénique. Ainsi, la faible expression de E2F1 détectée dans les carcinomes non à petites cellules pourrait participer au développement d'une néovascularisation tumorale en modifiant la balance des isoformes VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b en faveur des variants angiogéniques. Nous sommes actuellement en train d'étudier les isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF₁₆₅b dans ces tumeurs par IHC. Dans ce contexte, l'accumulation de SC35 détectée dans les CBnPC pourrait participer au processus de néo-angiogénèse tumorale en favorisant l'expression des isoformes VEGF_{xxx} (**Figure 49**). Il reste à comprendre pourquoi SC35 n'induit pas l'apoptose dans ces tumeurs. Une des possibilités est que l'expression en quantité suffisante de E2F1 soit nécessaire aux fonctions apoptotiques de SC35, via notamment l'activation de voies de signalisation définies et/ou le ciblage de SC35 au niveau de gènes spécifiques. A l'inverse, dans les tumeurs neuroendocrines pulmonaires qui surexpriment E2F1 et SC35, nos résultats pourraient permettre d'expliquer des observations préalables faites au laboratoire montrant que ces tumeurs expriment peu de VEGF. Puisque dans ces modèles d'études, la neutralisation de SC35 affecte différemment le ratio des isoformes VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b, le rôle joué par SC35 dans ce cadre pourrait là encore dépendre des co-signaux reçus par la cellule. Dans ces tumeurs hautement agressives, une des hypothèses est que les protéines E2F1 et SC35 coopèrent non pas pour induire l'apoptose mais pour stimuler la prolifération cellulaire. En effet, nous avons montré que la neutralisation de SC35 dans des modèles cellulaires dérivés de tumeurs neuroendocrines diminue l'expression des protéines impliquées dans la progression des cellules en phase S et affecte le pourcentage de cellules en phase S. Il reste à savoir

pourquoi la voie proliférative prend le dessus sur la voie apoptotique. Une des pistes pourrait être la voie AKT dont nous avons montré l'effet sur les fonctions transactivatrices de E2F1 et co-activatrices de SC35. Conformément au modèle proposé par Hallstrom dans les tumeurs du sein (Hallstrom, et al., 2008), la voie AKT pourrait stimuler les fonctions prolifératives des protéines SC35 et E2F1 et inhiber leur fonction apoptotique dans ces tumeurs (**Figure 49**).

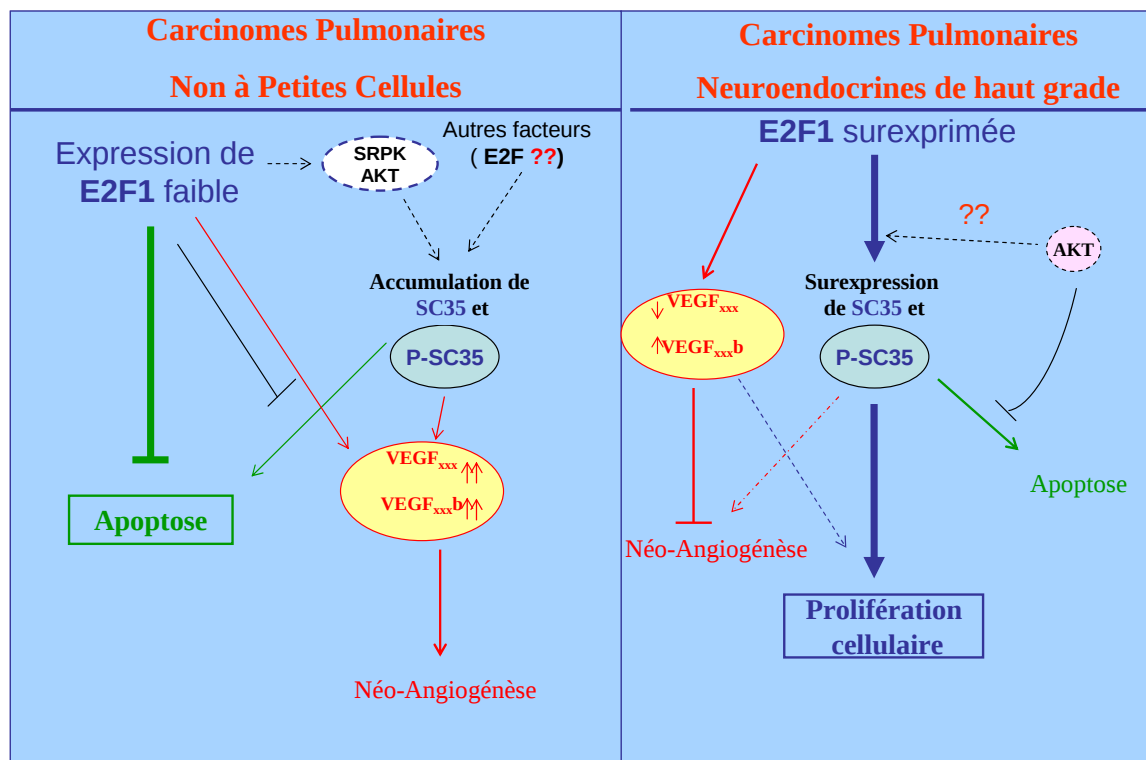


Figure 49: Rôle hypothétique des protéines E2F1 et/ou SC35 au cours de la carcinogénèse bronchique.

Se référer au texte pour les explications.

CONCLUSION

Le facteur de transcription E2F1 est une protéine aux fonctions ambigües impliqué à la fois dans la progression tumorale ou au contraire dans l'inhibition du développement des tumeurs selon le type tissulaire et le contexte génétique envisagés. En accord avec cet effet ambivalent, il a été décrit au laboratoire un profil d'expression différentiel de la protéine E2F1 en fonction des types histologiques de carcinome pulmonaire. Dans ce contexte, un des objectifs de mon travail de thèse visait à identifier de nouvelles cibles et fonctions biologiques de E2F1 susceptibles d'être dérégulées dans les cancers du poumon, en réponse à l'expression anormale de E2F1.

Dans un premier temps, mon travail a décrit pour la première fois un lien entre E2F1 et les protéines de la famille SR régulant l'épissage des transcrits. Nous avons identifié l'une de ces protéines, la protéine SC35, comme une cible transcriptionnelle directe de E2F1. Nous avons montré que les deux protéines coopèrent pour induire l'apoptose, notamment en réponse aux agents génotoxiques, en modifiant les patrons d'épissage de certains gènes apoptotiques dont *Bcl-x*, ou *caspase-9*, en faveur des transcrits codant pour les isoformes pro-apoptotiques. Sur la base de ces résultats démontrant la capacité de E2F1 à réguler les profils d'épissage de transcrits contrôlant l'apoptose via la protéine SC35, nous avons dans un second temps émis l'hypothèse selon laquelle le VEGF-A, un puissant facteur angiogénique dont l'activité est régulé par épissage alternatif pourrait être une cible de E2F1 et/ou SC35. En accord avec cette hypothèse, nos résultats montrent que E2F1, dans différents modèles de carcinomes pulmonaires, modifie la balance des variants pro- et anti-angiogéniques du VEGF-A, en faveur des isoformes anti-angiogéniques. De plus, la surexpression de E2F1 dans des modèles de xénogreffes implantés en sous-cutané chez la souris nude prévient la croissance de ces tumeurs et leur néo-vascularisation, via une modification du niveau d'expression des variants angiogéniques du VEGF. Ces résultats identifient donc un rôle de E2F1 dans le contrôle des processus de néo-angiogénèse tumorale. Finalement, nous avons obtenu des résultats impliquant SC35 dans le contrôle des fonctions transactivatrices de E2F1 au niveau de gènes contrôlant la division cellulaire, et notamment la synthèse d'ADN.

En conclusion, ces données indiquent l'existence d'une coopération étroite entre le facteur de transcription E2F1 et le facteur d'épissage SC35 dans le contrôle de fonctions biologiques essentielles, et amènent des arguments supplémentaires en faveur du couplage transcription/épissage. De plus, ces résultats ouvrent des nouvelles perspectives quand aux conséquences possibles de l'expression anormale de E2F1 détecté dans les tumeurs pulmonaires, tant sur le plan de la néo-angiogénèse tumorale et par ce biais de la réponse aux thérapies ciblées anti-angiogéniques, que sur le rôle potentiel des facteurs d'épissage de la

famille SR au cours du processus de carcinogénèse bronchique. Ainsi, nos résultats suggèrent que les variations d'expression de E2F1 détectées dans les tumeurs bronchiques pourraient être à l'origine d'une altération de l'expression des protéines SR, et notamment de la protéine SC35, conduisant à des anomalies d'épissage et à une modification de la balance prolifération/apoptose/angiogénèse dans les cancers bronchiques.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Adams, P.D., Sellers, W.R., Sharma, S.K., Wu, A.D., Nalin, C.M. and Kaelin, W.G., Jr. (1996) Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors, *Mol Cell Biol*, **16**, 6623-6633.
- Adrain, C. and Martin, S.J. (2001) The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas, *Trends Biochem Sci*, **26**, 390-397.
- Afshar, G., Jelluma, N., Yang, X., Basila, D., Arvold, N.D., Karlsson, A., Yount, G.L., Dansen, T.B., Koller, E. and Haas-Kogan, D.A. (2006) Radiation-induced caspase-8 mediates p53-independent apoptosis in glioma cells, *Cancer Res*, **66**, 4223-4232.
- Akusjarvi, G. and Stevenin, J. (2003) Remodelling of the host cell RNA splicing machinery during an adenovirus infection, *Curr Top Microbiol Immunol*, **272**, 253-286.
- Albani, D., Mariconti, L., Ricagno, S., Pitto, L., Moroni, C., Helin, K. and Cella, R. (2000) DcE2F, a functional plant E2F-like transcriptional activator from *Daucus carota*, *J Biol Chem*, **275**, 19258-19267.
- Alberg, A.J., Brock, M.V. and Samet, J.M. (2005) Epidemiology of lung cancer: looking to the future, *J Clin Oncol*, **23**, 3175-3185.
- Algeciras-Schimmich, A. and Peter, M.E. (2003) Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells, *FEBS Lett*, **546**, 185-188.
- Allemand, E., Hastings, M.L., Murray, M.V., Myers, M.P. and Krainer, A.R. (2007) Alternative splicing regulation by interaction of phosphatase PP2C γ with nucleic acid-binding protein YB-1, *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 630-638.
- Alonso, M.M., Fueyo, J., Shay, J.W., Aldape, K.D., Jiang, H., Lee, O.H., Johnson, D.G., Xu, J., Kondo, Y., Kanzawa, T., Kyo, S., Bekele, B.N., Zhou, X., Nigro, J., McDonald, J.M., Yung, W.K. and Gomez-Manzano, C. (2005) Expression of transcription factor E2F1 and telomerase in glioblastomas: mechanistic linkage and prognostic significance, *J Natl Cancer Inst*, **97**, 1589-1600.
- Amrein, H., Hedley, M.L. and Maniatis, T. (1994) The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by Transformer 2, *Cell*, **76**, 735-746.
- Asano, M., Nevins, J.R. and Wharton, R.P. (1996) Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs, *Genes Dev*, **10**, 1422-1432.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation, *Science*, **281**, 1305-1308.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors, *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 255-260.
- Aslanian, A., Iaquinta, P.J., Verona, R. and Lees, J.A. (2004) Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics, *Genes Dev*, **18**, 1413-1422.
- Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E. and Helin, K. (2004) The E2F family: specific functions and overlapping interests, *EMBO J*, **23**, 4709-4716.
- Auboeuf, D., Dowhan, D.H., Dutertre, M., Martin, N., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. (2005) A subset of nuclear receptor

coregulators act as coupling proteins during synthesis and maturation of RNA transcripts, *Mol Cell Biol*, **25**, 5307-5316.

Auboeuf, D., Dowhan, D.H., Kang, Y.K., Larkin, K., Lee, J.W., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. (2004a) Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2270-2274.

Auboeuf, D., Dowhan, D.H., Li, X., Larkin, K., Ko, L., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. (2004b) CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing, *Mol Cell Biol*, **24**, 442-453.

Auboeuf, D., Honig, A., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators, *Science*, **298**, 416-419.

Ayane, M., Preuss, U., Kohler, G. and Nielsen, P.J. (1991) A differentially expressed murine RNA encoding a protein with similarities to two types of nucleic acid binding motifs, *Nucleic Acids Res*, **19**, 1273-1278.

B

Balciunaite, E., Spektor, A., Lents, N.H., Cam, H., Te Riele, H., Scime, A., Rudnicki, M.A., Young, R. and Dynlacht, B.D. (2005) Pocket protein complexes are recruited to distinct targets in quiescent and proliferating cells, *Mol Cell Biol*, **25**, 8166-8178.

Barry, M. and Bleackley, R.C. (2002) Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death, *Nat Rev Immunol*, **2**, 401-409.

Bates, D.O., Cui, T.G., Doughty, J.M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J.D., Peat, D., Gillatt, D. and Harper, S.J. (2002) VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma, *Cancer Res*, **62**, 4123-4131.

Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L. and Vousden, K.H. (1998) p14ARF links the tumour suppressors RB and p53, *Nature*, **395**, 124-125.

Batsche, E., Yaniv, M. and Muchardt, C. (2006) The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing, *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 22-29.

Bauren, G. and Wieslander, L. (1994) Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription, *Cell*, **76**, 183-192.

Bell, L.A., O'Prey, J. and Ryan, K.M. (2006) DNA-binding independent cell death from a minimal proapoptotic region of E2F-1, *Oncogene*, **25**, 5656-5663.

Bell, L.A. and Ryan, K.M. (2004) Life and death decisions by E2F-1, *Cell Death Differ*, **11**, 137-142.

Bentley, D.L. (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors, *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 251-256.

Berkovich, E. and Ginsberg, D. (2003) ATM is a target for positive regulation by E2F-1, *Oncogene*, **22**, 161-167.

Berton, T.R., Mitchell, D.L., Guo, R. and Johnson, D.G. (2005) Regulation of epidermal apoptosis and DNA repair by E2F1 in response to ultraviolet B radiation, *Oncogene*, **24**, 2449-2460.

- Beyer, A.L., Christensen, M.E., Walker, B.W. and LeStourgeon, W.M. (1977) Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles, *Cell*, **11**, 127-138.
- Beyer, A.L. and Osheim, Y.N. (1988) Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts, *Genes Dev*, **2**, 754-765.
- Bi, B., Littlewood, N.K. and Crispe, I.N. (2001) Cleavage of E2F-1-regulating proteins and activation of E2F-1 during CD95-induced death of thymocytes, *Immunology*, **104**, 37-42.
- Black, A.R. and Azizkhan-Clifford, J. (1999) Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control, *Gene*, **237**, 281-302.
- Blaustein, M., Pelisch, F., Tanos, T., Munoz, M.J., Wengier, D., Quadrana, L., Sanford, J.R., Muschietti, J.P., Kornblihtt, A.R., Caceres, J.F., Coso, O.A. and Srebrow, A. (2005) Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT, *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 1037-1044.
- Blencowe, B.J. (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses, *Cell*, **126**, 37-47.
- Blencowe, B.J., Bauren, G., Eldridge, A.G., Issner, R., Nickerson, J.A., Rosonina, E. and Sharp, P.A. (2000) The SRm160/300 splicing coactivator subunits, *RNA*, **6**, 111-120.
- Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J. and Tschoop, J. (2000) TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8, *Nat Cell Biol*, **2**, 241-243.
- Boukis, L.A. and Bruzik, J.P. (2001) Functional selection of splicing enhancers that stimulate trans-splicing in vitro, *RNA*, **7**, 793-805.
- Bourgeois, C.F., Lejeune, F. and Stevenin, J. (2004) Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **78**, 37-88.
- Brambilla, E., Constantin, B., Drabkin, H. and Roche, J. (2000) Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: A suggested role in cell adhesion and cell migration, *Am J Pathol*, **156**, 939-950.
- Brambilla, E., Moro, D., Gazzeri, S. and Brambilla, C. (1999) Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance, *J Pathol*, **188**, 351-360.
- Bramis, J., Zacharatos, P., Papaconstantinou, I., Kotsinas, A., Sigala, F., Korkolis, D.P., Nikiteas, N., Pazaiti, A., Kittas, C., Bastounis, E. and Gorgoulis, V.G. (2004) E2F-1 transcription factor immunoexpression is inversely associated with tumor growth in colon adenocarcinomas, *Anticancer Res*, **24**, 3041-3047.
- Branlant, C., Krol, A., Ebel, J.P., Lazar, E., Gallinaro, H., Jacob, M., Sri-Widada, J. and Jeanteur, P. (1980) Nucleotide sequences of nuclear U1A RNAs from chicken, rat and man, *Nucleic Acids Res*, **8**, 4143-4154.
- Branlant, C., Krol, A., Ebel, J.P., Lazar, E., Haendler, B. and Jacob, M. (1982) U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs, *EMBO J*, **1**, 1259-1265.
- Branlant, C., Krol, A., Lazar, E., Haendler, B., Jacob, M., Galego-Dias, L. and Pousada, C. (1983) High evolutionary

conservation of the secondary structure and of certain nucleotide sequences of U5 RNA, *Nucleic Acids Res*, **11**, 8359-8367.

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.

Brinkman, B.M. (2004) Splice variants as cancer biomarkers, *Clin Biochem*, **37**, 584-594.

Brook, A., Xie, J.E., Du, W. and Dyson, N. (1996) Requirements for dE2F function in proliferating cells and in post-mitotic differentiating cells, *EMBO J*, **15**, 3676-3683.

Brown, J.M., Green, J., das Neves, R.P., Wallace, H.A., Smith, A.J., Hughes, J., Gray, N., Taylor, S., Wood, W.G., Higgs, D.R., Iborra, F.J. and Buckle, V.J. (2008) Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment, *J Cell Biol*, **182**, 1083-1097.

Brown, M.T. and Cooper, J.A. (1996) Regulation, substrates and functions of src, *Biochim Biophys Acta*, **1287**, 121-149.

C

Caceres, J.F. and Krainer, A.R. (1993) Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains, *EMBO J*, **12**, 4715-4726.

Caceres, J.F., Misteli, T., Sreaton, G.R., Spector, D.L. and Krainer, A.R. (1997) Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity, *J Cell Biol*, **138**, 225-238.

Caceres, J.F., Sreaton, G.R. and Krainer, A.R. (1998) A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm, *Genes Dev*, **12**, 55-66.

Caceres, J.F., Stamm, S., Helfman, D.M. and Krainer, A.R. (1994) Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors, *Science*, **265**, 1706-1709.

Campanero, M.R. and Flemington, E.K. (1997) Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2221-2226.

Cao, Q., Xia, Y., Azadniv, M. and Crispe, I.N. (2004) The E2F-1 transcription factor promotes caspase-8 and bid expression, and enhances Fas signaling in T cells, *J Immunol*, **173**, 1111-1117.

Cao, W., Jamison, S.F. and Garcia-Blanco, M.A. (1997) Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro, *RNA*, **3**, 1456-1467.

Caputi, M., Mayeda, A., Krainer, A.R. and Zahler, A.M. (1999) hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing, *EMBO J*, **18**, 4060-4067.

Cardoso, R.S., Espanhol, A.R., Passos, G.A. and Sakamoto-Hojo, E.T. (2002) Differential gene expression in gamma-irradiated BALB/3T3 fibroblasts under the influence of 3-aminobenzamide, an inhibitor of parp enzyme, *Mutat Res*, **508**, 33-40.

Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M.Q. and Krainer, A.R. (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers, *Nucleic Acids Res*, **31**, 3568-3571.

- Carter, K.C., Bowman, D., Carrington, W., Fogarty, K., McNeil, J.A., Fay, F.S. and Lawrence, J.B. (1993) A three-dimensional view of precursor messenger RNA metabolism within the mammalian nucleus, *Science*, **259**, 1330-1335.
- Carter, K.C., Taneja, K.L. and Lawrence, J.B. (1991) Discrete nuclear domains of poly(A) RNA and their relationship to the functional organization of the nucleus, *J Cell Biol*, **115**, 1191-1202.
- Catros-Quemener, V., Bouet, F. and Genetet, N. (2003) (Antitumor immunity and cellular cancer therapies], *Med Sci (Paris)*, **19**, 43-53.
- Cavaloc, Y., Bourgeois, C.F., Kister, L. and Stevenin, J. (1999) The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers, *RNA*, **5**, 468-483.
- Cavaloc, Y., Popielarz, M., Fuchs, J.P., Gattoni, R. and Stevenin, J. (1994) Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: a novel 35 kDa factor of the serine/arginine protein family, *EMBO J*, **13**, 2639-2649.
- Cazalla, D., Zhu, J., Manche, L., Huber, E., Krainer, A.R. and Cáceres, J.F. (2002) Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins, *Mol Cell Biol*, **22**, 6871-6882.
- Ceol, C.J. and Horvitz, H.R. (2001) dpl-1 DP and efl-1 E2F act with lin-35 Rb to antagonize Ras signaling in *C. elegans* vulval development, *Mol Cell*, **7**, 461-473.
- Chalfant, C.E., Ogretmen, B., Galadari, S., Kroesen, B.J., Pettus, B.J. and Hannun, Y.A. (2001) FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1, *J Biol Chem*, **276**, 44848-44855.
- Chalfant, C.E., Rathman, K., Pinkerman, R.L., Wood, R.E., Obeid, L.M., Ogretmen, B. and Hannun, Y.A. (2002) De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1, *J Biol Chem*, **277**, 12587-12595.
- Chandler, S.D., Mayeda, A., Yeakley, J.M., Krainer, A.R. and Fu, X.D. (1997) RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3596-3601.
- Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E. and Yang, X. (2002) c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis, *EMBO J*, **21**, 3704-3714.
- Chansky, H.A., Hu, M., Hickstein, D.D. and Yang, L. (2001) Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein, *Cancer Res*, **61**, 3586-3590.
- Chaudhary, N., McMahon, C. and Blobel, G. (1991) Primary structure of a human arginine-rich nuclear protein that colocalizes with spliceosome components, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8189-8193.
- Chaussepied, M. and Ginsberg, D. (2004) Transcriptional regulation of AKT activation by E2F, *Mol Cell*, **16**, 831-837.
- Che, S., Weil, M.M., Etkin, L.D., Epstein, H.F. and Kuang, J. (1997) Molecular cloning of a splice variant of *Caenorhabditis elegans* YNK1, a putative element in signal transduction, *Biochim Biophys Acta*, **1354**, 231-240.

- Chen, C.R., Kang, Y., Siegel, P.M. and Massague, J. (2002) E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression, *Cell*, **110**, 19-32.
- Chen, G. and Goeddel, D.V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway, *Science*, **296**, 1634-1635.
- Chong, J.L., Tsai, S.Y., Sharma, N., Opavsky, R., Price, R., Wu, L., Fernandez, S.A. and Leone, G. (2009) E2f3a and E2f3b contribute to the control of cell proliferation and mouse development, *Mol Cell Biol*, **29**, 414-424.
- Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., Klinkenberg, D., Bracken, A.P., Trinh, E., Heeran, M., Di Stefano, L. and Helin, K. (2005) Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription, *Nucleic Acids Res*, **33**, 5458-5470.
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A. and David, C.N. (1999) Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra, *Curr Biol*, **9**, 959-962.
- Cohen, C.D., Doran, P.P., Blattner, S.M., Merkle, M., Wang, G.Q., Schmid, H., Mathieson, P.W., Saleem, M.A., Henger, A., Rastaldi, M.P. and Kretzler, M. (2005) Sam68-like mammalian protein 2, identified by digital differential display as expressed by podocytes, is induced in proteinuria and involved in splice site selection of vascular endothelial growth factor, *J Am Soc Nephrol*, **16**, 1958-1965.
- Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J.L., Bell, J.C. and Duncan, P.I. (1996) The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution, *EMBO J*, **15**, 265-275.
- Conner, E.A., Lemmer, E.R., Omori, M., Wirth, P.J., Factor, V.M. and Thorgeirsson, S.S. (2000) Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis, *Oncogene*, **19**, 5054-5062.
- Corden, J.L. and Patturajan, M. (1997) A CTD function linking transcription to splicing, *Trends Biochem Sci*, **22**, 413-416.
- Cory, S. and Adams, J.M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nat Rev Cancer*, **2**, 647-656.
- Craighead, J.E. (1984) Asbestos. An environmental reality, *JAMA*, **252**, 3292-3293.
- Cramer, P., Caceres, J.F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, A.F., Baralle, F.E. and Kornblihtt, A.R. (1999) Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer, *Mol Cell*, **4**, 251-258.
- Cramer, P., Pesce, C.G., Baralle, F.E. and Kornblihtt, A.R. (1997) Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11456-11460.
- Croxtan, R., Ma, Y., Song, L., Haura, E.B. and Cress, W.D. (2002) Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1, *Oncogene*, **21**, 1359-1369.

D

Dahiya, A., Wong, S., Gonzalo, S., Gavin, M. and Dean, D.C. (2001) Linking the Rb and polycomb pathways, *Mol Cell*, **8**, 557-569.

Das, R., Yu, J., Zhang, Z., Gygi, M.P., Krainer, A.R., Gygi, S.P. and Reed, R.

- (2007) SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing, *Mol Cell*, **26**, 867-881.
- Dauksaite, V. and Akusjarvi, G. (2004) The second RNA-binding domain of the human splicing factor ASF/SF2 is the critical domain controlling adenovirus E1A alternative 5'-splice site selection, *Biochem J*, **381**, 343-350.
- Davis, M.B., Dietz, J., Standiford, D.M. and Emerson, C.P., Jr. (1998) Transposable element insertions respecify alternative exon splicing in three *Drosophila* myosin heavy chain mutants, *Genetics*, **150**, 1105-1114.
- de la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D. and Kornblihtt, A.R. (2003) A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo, *Mol Cell*, **12**, 525-532.
- de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J. and Lowe, S.W. (1998) E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor, *Genes Dev*, **12**, 2434-2442.
- Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (2004) Death receptors in chemotherapy and cancer, *Oncogene*, **23**, 2950-2966.
- DeGregori, J. (2002) The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles, *Biochim Biophys Acta*, **1602**, 131-150.
- DeGregori, J. (2006) Surprising dependency for retinoblastoma protein in ras-mediated tumorigenesis, *Mol Cell Biol*, **26**, 1165-1169.
- DeGregori, J. and Johnson, D.G. (2006) Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis, *Curr Mol Med*, **6**, 739-748.
- DeGregori, J., Kowalik, T. and Nevins, J.R. (1995) Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes, *Mol Cell Biol*, **15**, 4215-4224.
- DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L. and Nevins, J.R. (1997) Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7245-7250.
- Del Gatto-Konczak, F., Olive, M., Gesnel, M.C. and Breathnach, R. (1999) hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer, *Mol Cell Biol*, **19**, 251-260.
- Deutsch, M. and Long, M. (1999) Intron-exon structures of eukaryotic model organisms, *Nucleic Acids Res*, **27**, 3219-3228.
- Dicker, A.J., Popa, C., Dahler, A.L., Serewko, M.M., Hilditch-Maguire, P.A., Frazer, I.H. and Saunders, N.A. (2000) E2F-1 induces proliferation-specific genes and suppresses squamous differentiation-specific genes in human epidermal keratinocytes, *Oncogene*, **19**, 2887-2894.
- Dimova, D.K. and Dyson, N.J. (2005) The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces, *Oncogene*, **24**, 2810-2826.
- Dimova, D.K., Stevaux, O., Frolov, M.V. and Dyson, N.J. (2003) Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the *Drosophila* E2F/RB pathway, *Genes Dev*, **17**, 2308-2320.
- Dimri, G.P., Itahana, K., Acosta, M. and Campisi, J. (2000) Regulation of a senescence checkpoint response by the

E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor, *Mol Cell Biol*, **20**, 273-285.

Ding, J.H., Xu, X., Yang, D., Chu, P.H., Dalton, N.D., Ye, Z., Yeakley, J.M., Cheng, H., Xiao, R.P., Ross, J., Chen, J. and Fu, X.D. (2004) Dilated cardiomyopathy caused by tissue-specific ablation of SC35 in the heart, *EMBO J*, **23**, 885-896.

Ding, J.H., Zhong, X.Y., Hagopian, J.C., Cruz, M.M., Ghosh, G., Feramisco, J., Adams, J.A. and Fu, X.D. (2006) Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells, *Mol Biol Cell*, **17**, 876-885.

Ding, W.Q., Kuntz, S.M. and Miller, L.J. (2002) A misspliced form of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in pancreatic carcinoma: role of reduced sellular U2AF35 and a suboptimal 3'-splicing site leading to retention of the fourth intron, *Cancer Res*, **62**, 947-952.

Dirks, P.B., Rutka, J.T., Hubbard, S.L., Mondal, S. and Hamel, P.A. (1998) The E2F-family proteins induce distinct cell cycle regulatory factors in p16-arrested, U343 astrocytoma cells, *Oncogene*, **17**, 867-876.

Dong, Y.B., Yang, H.L., Elliott, M.J. and McMasters, K.M. (2002) Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer sensitizes melanoma cells to apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors, *Cancer Res*, **62**, 1776-1783.

Dowhan, D.H., Hong, E.P., Auboeuf, D., Dennis, A.P., Wilson, M.M., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. (2005) Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta, *Mol Cell*, **17**, 429-439.

Dreyfuss, G., Kim, V.N. and Kataoka, N. (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 195-205.

Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S. and Burd, C.G. (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA, *Annu Rev Biochem*, **62**, 289-321.

Du, C., McGuffin, M.E., Dauwalder, B., Rabinow, L. and Mattox, W. (1998) Protein phosphorylation plays an essential role in the regulation of alternative splicing and sex determination in *Drosophila*, *Mol Cell*, **2**, 741-750.

Du, W., Xie, J.E. and Dyson, N. (1996) Ectopic expression of dE2F and dDP induces cell proliferation and death in the *Drosophila* eye, *EMBO J*, **15**, 3684-3692.

Dumont, D.J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M. and Alitalo, K. (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3, *Science*, **282**, 946-949.

Dunaief, J.L., Strober, B.E., Guha, S., Khavari, P.A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G.R. and Goff, S.P. (1994) The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest, *Cell*, **79**, 119-130.

Duncan, P.I., Stojdl, D.F., Marius, R.M., Scheit, K.H. and Bell, J.C. (1998) The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing, *Exp Cell Res*, **241**, 300-308.

Duronio, R.J., O'Farrell, P.H., Xie, J.E., Brook, A. and Dyson, N. (1995) The transcription factor E2F is required for S phase during *Drosophila* embryogenesis, *Genes Dev*, **9**, 1445-1455.

Dynlacht, B.D., Brook, A., Dembski, M., Yenush, L. and Dyson, N. (1994) DNA-binding and trans-activation properties of Drosophila E2F and DP proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6359-6363.

Dynlacht, B.D., Moberg, K., Lees, J.A., Harlow, E. and Zhu, L. (1997) Specific regulation of E2F family members by cyclin-dependent kinases, *Mol Cell Biol*, **17**, 3867-3875.

E

Ebihara, Y., Miyamoto, M., Shichinohe, T., Kawarada, Y., Cho, Y., Fukunaga, A., Murakami, S., Uehara, H., Kaneko, H., Hashimoto, H., Murakami, Y., Itoh, T., Okushiba, S., Kondo, S. and Katoh, H. (2004) Over-expression of E2F-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with tumor progression, *Dis Esophagus*, **17**, 150-154.

Eldridge, A.G., Li, Y., Sharp, P.A. and Blencowe, B.J. (1999) The SRm160/300 splicing coactivator is required for exon-enhancer function, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6125-6130.

Elliott, M.J., Dong, Y.B., Yang, H. and McMasters, K.M. (2001) E2F-1 up-regulates c-Myc and p14(ARF) and induces apoptosis in colon cancer cells, *Clin Cancer Res*, **7**, 3590-3597.

Emili, A., Shales, M., McCracken, S., Xie, W., Tucker, P.W., Kobayashi, R., Blencowe, B.J. and Ingles, C.J. (2002) Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD, *RNA*, **8**, 1102-1111.

Eymin, B., Gazzeri, S., Brambilla, C. and Brambilla, E. (2001) Distinct pattern of

E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma, *Oncogene*, **20**, 1678-1687.

Eymin, B., Gazzeri, S., Brambilla, C. and Brambilla, E. (2002) Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors, *Oncogene*, **21**, 2750-2761.

F

Fabrizio, E., El Messaoudi, S., Polanowska, J., Paul, C., Cook, J.R., Lee, J.H., Negre, V., Rousset, M., Pestka, S., Le Cam, A. and Sardet, C. (2002) Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5, *EMBO Rep*, **3**, 641-645.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A. and Henson, P.M. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells, *Nature*, **405**, 85-90.

Fagan, R., Flint, K.J. and Jones, N. (1994) Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein, *Cell*, **78**, 799-811.

Faustino, N.A. and Cooper, T.A. (2003) Pre-mRNA splicing and human disease, *Genes Dev*, **17**, 419-437.

Feng, Y., Chen, M. and Manley, J.L. (2008) Phosphorylation switches the general splicing repressor SRp38 to a sequence-specific activator, *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 1040-1048.

Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M. and Boyle, P. (2007) Estimates of the cancer incidence and

mortality in Europe in 2006, *Ann Oncol*, **18**, 581-592.

Ferrara, N. (2004) Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy, *Oncologist*, **9 Suppl 1**, 2-10.

Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor, *Endocr Rev*, **18**, 4-25.

Ferrara, N., Gerber, H.P. and LeCouter, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors, *Nat Med*, **9**, 669-676.

Ferreira, R., Magnaghi-Jaulin, L., Robin, P., Harel-Bellan, A. and Trouche, D. (1998) The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10493-10498.

Fetzer, S., Lauber, J., Will, C.L. and Luhrmann, R. (1997) The (U4/U6.U5) tri-snRNP-specific 27K protein is a novel SR protein that can be phosphorylated by the snRNP-associated protein kinase, *RNA*, **3**, 344-355.

Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.G., Jr., Livingston, D.M., Orkin, S.H. and Greenberg, M.E. (1996) E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation, *Cell*, **85**, 549-561.

Filippov, V., Filippova, M. and Duerksen-Hughes, P.J. (2007) The early response to DNA damage can lead to activation of alternative splicing activity resulting in CD44 splice pattern changes, *Cancer Res*, **67**, 7621-7630.

Fischer, D.C., Noack, K., Runnebaum, I.B., Watermann, D.O., Kieback, D.G., Stamm, S. and Stickeler, E. (2004) Expression of splicing factors in human ovarian cancer, *Oncol Rep*, **11**, 1085-1090.

Flemington, E.K., Speck, S.H. and Kaelin, W.G., Jr. (1993) E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6914-6918.

Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M. and Breitman, M.L. (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium, *Nature*, **376**, 66-70.

Fong, Y.W. and Zhou, Q. (2001) Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation, *Nature*, **414**, 929-933.

Fortin, A., MacLaurin, J.G., Arbour, N., Cregan, S.P., Kushwaha, N., Callaghan, S.M., Park, D.S., Albert, P.R. and Slack, R.S. (2004) The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1, *J Biol Chem*, **279**, 28706-28714.

Frolov, M.V. and Dyson, N.J. (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression, *J Cell Sci*, **117**, 2173-2181.

Frolov, M.V., Huen, D.S., Stevaux, O., Dimova, D., Balczarek-Strang, K., Elsdon, M. and Dyson, N.J. (2001) Functional antagonism between E2F family members, *Genes Dev*, **15**, 2146-2160.

Frolov, M.V., Stevaux, O., Moon, N.S., Dimova, D., Kwon, E.J., Morris, E.J. and Dyson, N.J. (2003) G1 cyclin-dependent kinases are insufficient to reverse dE2F2-mediated repression, *Genes Dev*, **17**, 723-728.

Fu, X.D. (1995) The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors, *RNA*, **1**, 663-680.

Fu, X.D. and Maniatis, T. (1990) Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus, *Nature*, **343**, 437-441.

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

Fu, X.D. and Maniatis, T. (1992b) Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35, *Science*, **256**, 535-538.

Fukuse, T., Hirata, T., Naiki, H., Hitomi, S. and Wada, H. (2000) Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer, *Cancer Res*, **60**, 242-244.

Furukawa, Y., Nishimura, N., Satoh, M., Endo, H., Iwase, S., Yamada, H., Matsuda, M., Kano, Y. and Nakamura, M. (2002) Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis, *J Biol Chem*, **277**, 39760-39768.

G

Gabut, M., Dejardin, J., Tazi, J. and Soret, J. (2007) The SR family proteins B52 and dASF/SF2 modulate development of the *Drosophila* visual system by regulating specific RNA targets, *Mol Cell Biol*, **27**, 3087-3097.

Gallego, M.E., Gattoni, R., Stevenin, J., Marie, J. and Expert-Bezancon, A. (1997) The SR splicing factors ASF/SF2 and SC35 have antagonistic effects on intronic enhancer-dependent splicing of the beta-tropomyosin alternative exon 6A, *EMBO J*, **16**, 1772-1784.

Garcia, I., Murga, M., Vicario, A., Field, S.J. and Zubiaga, A.M. (2000) A role for E2F1 in the induction of apoptosis during thymic negative selection, *Cell Growth Differ*, **11**, 91-98.

Gazzeri, S., Della Valle, V., Chaussade, L., Brambilla, C., Larsen, C.J. and Brambilla, E. (1998) The human p19ARF protein encoded by the beta transcript of the p16INK4a gene is frequently lost in small cell lung cancer, *Cancer Res*, **58**, 3926-3931.

Ge, H., Si, Y. and Wolffe, A.P. (1998) A novel transcriptional coactivator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2, *Mol Cell*, **2**, 751-759.

Ge, H., Zuo, P. and Manley, J.L. (1991) Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators, *Cell*, **66**, 373-382.

Geradts, J., Fong, K.M., Zimmerman, P.V., Maynard, R. and Minna, J.D. (1999) Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers, *Clin Cancer Res*, **5**, 791-800.

Ghigna, C., Giordano, S., Shen, H., Benvenuto, F., Castiglioni, F., Comoglio, P.M., Green, M.R., Riva, S. and Biamonti, G. (2005) Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene, *Mol Cell*, **20**, 881-890.

Ghigna, C., Moroni, M., Porta, C., Riva, S. and Biamonti, G. (1998) Altered expression of heterogenous nuclear ribonucleoproteins and SR factors in human colon adenocarcinomas, *Cancer Res*, **58**, 5818-5824.

- Ghigna, M.R., Drak Alsibai, K., Porras, J., Palazzo, L., Godchaux, J.M. and Fabre, M. (2008) Deep-seated rectal/anal basaloid carcinoma: useful immunocytochemistry in rare squamous cell carcinoma variants, *Cytopathology*.
- Giancotti, F.G. (2007) Targeting integrin beta4 for cancer and anti-angiogenic therapy, *Trends Pharmacol Sci*, **28**, 506-511.
- Gilbert, W. and Guthrie, C. (2004) The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA, *Mol Cell*, **13**, 201-212.
- Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Herzog, Y. and Neufeld, G. (2000) Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 (corrected), *J Biol Chem*, **275**, 18040-18045.
- Gobert, C., Bracco, L., Rossi, F., Olivier, M., Tazi, J., Lavelle, F., Larsen, A.K. and Riou, J.F. (1996) Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53, *Biochemistry*, **35**, 5778-5786.
- Gomez-Manzano, C., Mitlianga, P., Fueyo, J., Lee, H.Y., Hu, M., Spurgers, K.B., Glass, T.L., Koul, D., Liu, T.J., McDonnell, T.J. and Yung, W.K. (2001) Transfer of E2F-1 to human glioma cells results in transcriptional up-regulation of Bcl-2, *Cancer Res*, **61**, 6693-6697.
- Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Mariatos, G., Kotsinas, A., Bouda, M., Kletsas, D., Asimacopoulos, P.J., Agnantis, N., Kittas, C. and Papavassiliou, A.G. (2002) Transcription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas, *J Pathol*, **198**, 142-156.
- Gould, A. (1997) Functions of mammalian Polycomb group and trithorax group related genes, *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 488-494.
- Gouyer, V., Gazzeri, S., Bolon, I., Drevet, C., Brambilla, C. and Brambilla, E. (1998) Mechanism of retinoblastoma gene inactivation in the spectrum of neuroendocrine lung tumors, *Am J Respir Cell Mol Biol*, **18**, 188-196.
- Grabowski, P.J. and Black, D.L. (2001) Alternative RNA splicing in the nervous system, *Prog Neurobiol*, **65**, 289-308.
- Graveley, B.R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions, *RNA*, **6**, 1197-1211.
- Graveley, B.R. (2004) A protein interaction domain contacts RNA in the prespliceosome, *Mol Cell*, **13**, 302-304.
- Graveley, B.R., Hertel, K.J. and Maniatis, T. (1998) A systematic analysis of the factors that determine the strength of pre-mRNA splicing enhancers, *EMBO J*, **17**, 6747-6756.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M. and Harris, C.C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis, *Cancer Res*, **54**, 4855-4878.
- Greenlee, R.T., Murray, T., Bolden, S. and Wingo, P.A. (2000) Cancer statistics, 2000, *CA Cancer J Clin*, **50**, 7-33.
- Grugel, S., Finkenzeller, G., Weindel, K., Barleon, B. and Marme, D. (1995) Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells, *J Biol Chem*, **270**, 25915-25919.
- Grunstein, J., Masbad, J.J., Hickey, R., Giordano, F. and Johnson, R.S. (2000)

Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature, *Mol Cell Biol*, **20**, 7282-7291.

Gstaiger, M., Jordan, R., Lim, M., Catzavelos, C., Mestan, J., Slingerland, J. and Krek, W. (2001) Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5043-5048.

Gui, J.F., Lane, W.S. and Fu, X.D. (1994) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle, *Nature*, **369**, 678-682.

Gui, J.F., Tronchere, H., Chandler, S.D. and Fu, X.D. (1994) Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10824-10828.

Guillouf, C., Gallais, I. and Moreau-Gachelin, F. (2006) Spi-1/PU.1 oncoprotein affects splicing decisions in a promoter binding-dependent manner, *J Biol Chem*, **281**, 19145-19155.

H

Hagopian, J.C., Ma, C.T., Meade, B.R., Albuquerque, C.P., Ngo, J.C., Ghosh, G., Jennings, P.A., Fu, X.D. and Adams, J.A. (2008) Adaptable molecular interactions guide phosphorylation of the SR protein ASF/SF2 by SRPK1, *J Mol Biol*, **382**, 894-909.

Hall, L.L., Smith, K.P., Byron, M. and Lawrence, J.B. (2006) Molecular anatomy of a speckle, *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, **288**, 664-675.

Hallier, M., Lerga, A., Barnache, S., Tavitian, A. and Moreau-Gachelin, F.

(1998) The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS, *J Biol Chem*, **273**, 4838-4842.

Hallier, M., Tavitian, A. and Moreau-Gachelin, F. (1996) The transcription factor Spi-1/PU.1 binds RNA and interferes with the RNA-binding protein p54nrb, *J Biol Chem*, **271**, 11177-11181.

Hallstrom, T.C., Mori, S. and Nevins, J.R. (2008) An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death, *Cancer Cell*, **13**, 11-22.

Hallstrom, T.C. and Nevins, J.R. (2003) Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 10848-10853.

Hamelberg, D., Shen, T. and McCammon, J.A. (2007) A proposed signaling motif for nuclear import in mRNA processing via the formation of arginine claw, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 14947-14951.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell*, **100**, 57-70.

Hanamura, A., Caceres, J.F., Mayeda, A., Franza, B.R., Jr. and Krainer, A.R. (1998) Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors, *RNA*, **4**, 430-444.

Harbour, J.W., Lai, S.L., Whang-Peng, J., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Kaye, F.J. (1988) Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC, *Science*, **241**, 353-357.

Harper, S.J. and Bates, D.O. (2008) VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?, *Nat Rev Cancer*, **8**, 880-887.

Hartmann, A.M., Rujescu, D., Giannakouros, T., Nikolakaki, E., Goedert,

- M., Mandelkow, E.M., Gao, Q.S., Andreadis, A. and Stamm, S. (2001) Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors, *Mol Cell Neurosci*, **18**, 80-90.
- Hartmuth, K., Urlaub, H., Vornlocher, H.P., Will, C.L., Gentzel, M., Wilm, M. and Luhrmann, R. (2002) Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16719-16724.
- Hauck, L., Kaba, R.G., Lipp, M., Dietz, R. and von Harsdorf, R. (2002) Regulation of E2F1-dependent gene transcription and apoptosis by the ETS-related transcription factor GABPgamma1, *Mol Cell Biol*, **22**, 2147-2158.
- Hayes, G.M., Carrigan, P.E., Beck, A.M. and Miller, L.J. (2006) Targeting the RNA splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma, *Cancer Res*, **66**, 3819-3827.
- Hayes, G.M., Carrigan, P.E. and Miller, L.J. (2007) Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas, *Cancer Res*, **67**, 2072-2080.
- He, S., Cook, B.L., Deverman, B.E., Weihe, U., Zhang, F., Prachand, V., Zheng, J. and Weintraub, S.J. (2000) E2F is required to prevent inappropriate S-phase entry of mammalian cells, *Mol Cell Biol*, **20**, 363-371.
- Hein, L. and Schmitt, J.P. (2003) alpha(1)-adrenoceptors in the heart - friend or foe?, *J Mol Cell Cardiol*, **35**, 1183-1185.
- Helin, K., Harlow, E. and Fattaey, A. (1993) Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein, *Mol Cell Biol*, **13**, 6501-6508.
- Helin, K., Lees, J.A., Vidal, M., Dyson, N., Harlow, E. and Fattaey, A. (1992) A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F, *Cell*, **70**, 337-350.
- Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis, *Nature*, **407**, 770-776.
- Hensel, C.H., Hsieh, C.L., Gazdar, A.F., Johnson, B.E., Sakaguchi, A.Y., Naylor, S.L., Lee, W.H. and Lee, E.Y. (1990) Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small cell lung cancer, *Cancer Res*, **50**, 3067-3072.
- Hentze, M.W. and Kulozik, A.E. (1999) A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay, *Cell*, **96**, 307-310.
- Hernandez, F., Perez, M., Lucas, J.J., Mata, A.M., Bhat, R. and Avila, J. (2004) Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease, *J Biol Chem*, **279**, 3801-3806.
- Herr, I. and Debatin, K.M. (2001) Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy, *Blood*, **98**, 2603-2614.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Hershko, T., Chaussepied, M., Oren, M. and Ginsberg, D. (2005) Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F, *Cell Death Differ*, **12**, 377-383.

- Hershko, T. and Ginsberg, D. (2004) Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis, *J Biol Chem*, **279**, 8627-8634.
- Hertel, K.J. and Graveley, B.R. (2005) RS domains contact the pre-mRNA throughout spliceosome assembly, *Trends Biochem Sci*, **30**, 115-118.
- Himeji, D., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., Hayashi, K., Watanabe, T. and Harada, M. (2002) Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade, *Blood*, **99**, 4070-4078.
- Hirose, Y. and Manley, J.L. (1998) RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor, *Nature*, **395**, 93-96.
- Hirose, Y. and Manley, J.L. (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events, *Genes Dev*, **14**, 1415-1429.
- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation, *Annu Rev Genet*, **30**, 405-439.
- Holmes, D.I. and Zachary, I. (2005) The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease, *Genome Biol*, **6**, 209.
- Honda, R. and Yasuda, H. (1999) Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53, *EMBO J*, **18**, 22-27.
- Hong, S., Pusapati, R.V., Powers, J.T. and Johnson, D.G. (2006) Oncogenes and the DNA damage response: Myc and E2F1 engage the ATM signaling pathway to activate p53 and induce apoptosis, *Cell Cycle*, **5**, 801-803.
- Horiuchi, T., Himeji, D., Tsukamoto, H., Harashima, S., Hashimura, C. and Hayashi, K. (2000) Dominant expression of a novel splice variant of caspase-8 in human peripheral blood lymphocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, **272**, 877-881.
- Hou, S.T., Xie, X., Baggley, A., Park, D.S., Chen, G. and Walker, T. (2002) Activation of the Rb/E2F1 pathway by the nonproliferative p38 MAPK during Fas (APO1/CD95)-mediated neuronal apoptosis, *J Biol Chem*, **277**, 48764-48770.
- Hsieh, J.K., Yap, D., O'Connor, D.J., Fogal, V., Fallis, L., Chan, F., Zhong, S. and Lu, X. (2002) Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage, *Mol Cell Biol*, **22**, 78-93.
- Hu, D., Mayeda, A., Trembley, J.H., Lahti, J.M. and Kidd, V.J. (2003) CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing, *J Biol Chem*, **278**, 8623-8629.
- Huang, L.E. and Bunn, H.F. (2003) Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance, *J Biol Chem*, **278**, 19575-19578.
- Huang, S. and Spector, D.L. (1991) Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors, *Genes Dev*, **5**, 2288-2302.
- Huang, Y., Gattoni, R., Stevenin, J. and Steitz, J.A. (2003) SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export, *Mol Cell*, **11**, 837-843.
- Huang, Y. and Steitz, J.A. (2001) Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA, *Mol Cell*, **7**, 899-905.
- Huang, Y., Yario, T.A. and Steitz, J.A. (2004) A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA

export, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9666-9670.

Hui, L., Zhang, X., Wu, X., Lin, Z., Wang, Q., Li, Y. and Hu, G. (2004) Identification of alternatively spliced mRNA variants related to cancers by genome-wide ESTs alignment, *Oncogene*, **23**, 3013-3023.

Humbert, P.O., Rogers, C., Ganiatsas, S., Landsberg, R.L., Trimarchi, J.M., Dandapani, S., Brugnara, C., Erdman, S., Schrenzel, M., Bronson, R.T. and Lees, J.A. (2000) E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability, *Mol Cell*, **6**, 281-291.

I

Iaquinta, P.J. and Lees, J.A. (2007) Life and death decisions by the E2F transcription factors, *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 649-657.

Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H. and Kaelin, W.G., Jr. (2000) Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis, *Nature*, **407**, 645-648.

Iwanaga, R., Komori, H., Ishida, S., Okamura, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I. and Ohtani, K. (2006) Identification of novel E2F1 target genes regulated in cell cycle-dependent and independent manners, *Oncogene*, **25**, 1786-1798.

J

Janknecht, R. (2005) EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors, *Gene*, **363**, 1-14.

Jiang, S.X., Sheldrick, M., Desbois, A., Slinn, J. and Hou, S.T. (2007) Neuropilin-1 is a direct target of the transcription factor E2F1 during cerebral ischemia-induced neuronal death in vivo, *Mol Cell Biol*, **27**, 1696-1705.

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

Johnson, D.G. (1995) Regulation of E2F-1 gene expression by p130 (Rb2) and D-type cyclin kinase activity, *Oncogene*, **11**, 1685-1692.

Johnson, D.G., Cress, W.D., Jakoi, L. and Nevins, J.R. (1994) Oncogenic capacity of the E2F1 gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12823-12827.

Johnstone, R.W., Ruefli, A.A. and Lowe, S.W. (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy, *Cell*, **108**, 153-164.

Jolly, C., Vourc'h, C., Robert-Nicoud, M. and Morimoto, R.I. (1999) Intron-independent association of splicing factors with active genes, *J Cell Biol*, **145**, 1133-1143.

Jumaa, H., Guenet, J.L. and Nielsen, P.J. (1997) Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle, *Mol Cell Biol*, **17**, 3116-3124.

Jumaa, H. and Nielsen, P.J. (1997) The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation, *EMBO J*, **16**, 5077-5085.

Jumaa, H., Wei, G. and Nielsen, P.J. (1999) Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20, *Curr Biol*, **9**, 899-902.

Jurica, M.S. and Moore, M.J. (2002) Capturing splicing complexes to study structure and mechanism, *Methods*, **28**, 336-345.

Jurica, M.S. and Moore, M.J. (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins, *Mol Cell*, **12**, 5-14.

K

Kadener, S., Fededa, J.P., Rosbash, M. and Kornblihtt, A.R. (2002) Regulation of alternative splicing by a transcriptional enhancer through RNA pol II elongation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8185-8190.

Kaelin, W.G., Jr., Krek, W., Sellers, W.R., DeCaprio, J.A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C.S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P.J., Blonar, M.A. and et al. (1992) Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties, *Cell*, **70**, 351-364.

Kamachi, M., Le, T.M., Kim, S.J., Geiger, M.E., Anderson, P. and Utz, P.J. (2002) Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway, *J Exp Med*, **196**, 1213-1225.

Kameoka, S., Duque, P. and Konarska, M.M. (2004) p54(nrb) associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes, *EMBO J*, **23**, 1782-1791.

Kang, H., Cui, K. and Zhao, K. (2004) BRG1 controls the activity of the retinoblastoma protein via regulation of p21CIP1/WAF1/SDI, *Mol Cell Biol*, **24**, 1188-1199.

Kanopka, A., Muhlemann, O. and Akusjarvi, G. (1996) Inhibition by SR

proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA, *Nature*, **381**, 535-538.

Kanopka, A., Muhlemann, O., Petersen-Mahrt, S., Estmer, C., Ohrmalm, C. and Akusjarvi, G. (1998) Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins, *Nature*, **393**, 185-187.

Karlseder, J., Rotheneder, H. and Wintersberger, E. (1996) Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F, *Mol Cell Biol*, **16**, 1659-1667.

Karni, R., de Stanchina, E., Lowe, S.W., Sinha, R., Mu, D. and Krainer, A.R. (2007) The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene, *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 185-193.

Karni, R., Hippo, Y., Lowe, S.W. and Krainer, A.R. (2008) The splicing-factor oncoprotein SF2/ASF activates mTORC1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 15323-15327.

Kataoka, N. and Dreyfuss, G. (2004) A simple whole cell lysate system for in vitro splicing reveals a stepwise assembly of the exon-exon junction complex, *J Biol Chem*, **279**, 7009-7013.

Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy, *Exp Cell Res*, **256**, 42-49.

Kaufmann, S.H. and Vaux, D.L. (2003) Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance, *Oncogene*, **22**, 7414-7430.

Kavanagh, S.J., Schulz, T.C., Davey, P., Claudianos, C., Russell, C. and Rathjen, P.D. (2005) A family of RS domain proteins with novel subcellular localization

and trafficking, *Nucleic Acids Res*, **33**, 1309-1322.

Kawamura, H., Li, X., Harper, S.J., Bates, D.O. and Claesson-Welsh, L. (2008) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity, *Cancer Res*, **68**, 4683-4692.

Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J. and Connolly, D.T. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF, *Science*, **246**, 1309-1312.

Kent, O.A. and MacMillan, A.M. (2002) Early organization of pre-mRNA during spliceosome assembly, *Nat Struct Biol*, **9**, 576-581.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, **26**, 239-257.

Kim, E., Goren, A. and Ast, G. (2008) Insights into the connection between cancer and alternative splicing, *Trends Genet*, **24**, 7-10.

Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S. and Ferrara, N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo, *Nature*, **362**, 841-844.

Kisenge, R.R., Toyoda, H., Kang, J., Tanaka, S., Yamamoto, H., Azuma, E. and Komada, Y. (2003) Expression of short-form caspase 8 correlates with decreased sensitivity to Fas-mediated apoptosis in neuroblastoma cells, *Cancer Sci*, **94**, 598-605.

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

Koizumi, J., Okamoto, Y., Onogi, H., Mayeda, A., Krainer, A.R. and Hagiwara, M. (1999) The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs), *J Biol Chem*, **274**, 11125-11131.

Kong, L.J., Chang, J.T., Bild, A.H. and Nevins, J.R. (2007) Compensation and specificity of function within the E2F family, *Oncogene*, **26**, 321-327.

Kornblihtt, A.R. (2005) Promoter usage and alternative splicing, *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 262-268.

Kornblihtt, A.R. (2006) Chromatin, transcript elongation and alternative splicing, *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 5-7.

Kovesdi, I., Reichel, R. and Nevins, J.R. (1986) Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation, *Cell*, **45**, 219-228.

Kowalik, T.F., DeGregori, J., Leone, G., Jakoi, L. and Nevins, J.R. (1998) E2F1-specific induction of apoptosis and p53 accumulation, which is blocked by Mdm2, *Cell Growth Differ*, **9**, 113-118.

Koziczak, M., Krek, W. and Nagamine, Y. (2000) Pocket protein-independent repression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 gene expression by E2F1, *Mol Cell Biol*, **20**, 2014-2022.

Koziczak, M., Muller, H., Helin, K. and Nagamine, Y. (2001) E2F1-mediated transcriptional inhibition of the

plasminogen activator inhibitor type 1 gene, *Eur J Biochem*, **268**, 4969-4978.

Krainer, A.R., Mayeda, A., Kozak, D. and Binns, G. (1991) Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and *Drosophila* splicing regulators, *Cell*, **66**, 383-394.

Krek, W., Xu, G. and Livingston, D.M. (1995) Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint, *Cell*, **83**, 1149-1158.

Krol, A., Branlant, C., Lazar, E., Gallinaro, H. and Jacob, M. (1981) Primary and secondary structures of chicken, rat and man nuclear U4 RNAs. Homologies with U1 and U5 RNAs, *Nucleic Acids Res*, **9**, 2699-2716.

Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H. and Kirchhoff, S. (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex, *J Biol Chem*, **276**, 20633-20640.

Kruhlak, M.J., Lever, M.A., Fischle, W., Verdin, E., Bazett-Jones, D.P. and Hendzel, M.J. (2000) Reduced mobility of the alternate splicing factor (ASF) through the nucleoplasm and steady state speckle compartments, *J Cell Biol*, **150**, 41-51.

Kwek, K.Y., Murphy, S., Furger, A., Thomas, B., O'Gorman, W., Kimura, H., Proudfoot, N.J. and Akoulitchiev, A. (2002) U1 snRNA associates with TFIIH and regulates transcriptional initiation, *Nat Struct Biol*, **9**, 800-805.

Kwong, R.A., Nguyen, T.V., Bova, R.J., Kench, J.G., Cole, I.E., Musgrove, E.A., Henshall, S.M. and Sutherland, R.L. (2003) Overexpression of E2F-1 is associated with

increased disease-free survival in squamous cell carcinoma of the anterior tongue, *Clin Cancer Res*, **9**, 3705-3711.

L

La Thangue, N.B. and Rigby, P.W. (1987) An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells, *Cell*, **49**, 507-513.

Labourier, E., Rossi, F., Gallouzi, I.E., Allemand, E., Divita, G. and Tazi, J. (1998) Interaction between the N-terminal domain of human DNA topoisomerase I and the arginine-serine domain of its substrate determines phosphorylation of SF2/ASF splicing factor, *Nucleic Acids Res*, **26**, 2955-2962.

Ladomery, M.R., Harper, S.J. and Bates, D.O. (2007) Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm, *Cancer Lett*, **249**, 133-142.

Ladu, S., Calvisi, D.F., Conner, E.A., Farina, M., Factor, V.M. and Thorgeirsson, S.S. (2008) E2F1 inhibits c-Myc-driven apoptosis via PIK3CA/Akt/mTOR and COX-2 in a mouse model of human liver cancer, *Gastroenterology*, **135**, 1322-1332.

Lai, M.C., Lin, R.I., Huang, S.Y., Tsai, C.W. and Tarn, W.Y. (2000) A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins, *J Biol Chem*, **275**, 7950-7957.

Lai, M.C., Lin, R.I. and Tarn, W.Y. (2001) Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10154-10159.

- Lai, M.C. and Tarn, W.Y. (2004) Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins, *J Biol Chem*, **279**, 31745-31749.
- Lai, M.C., Teh, B.H. and Tarn, W.Y. (1999) A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing, *J Biol Chem*, **274**, 11832-11841.
- Lamond, A.I. and Spector, D.L. (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 605-612.
- Lantuejoul, S., Constantin, B., Drabkin, H., Brambilla, C., Roche, J. and Brambilla, E. (2003) Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines, *J Pathol*, **200**, 336-347.
- Lavin, M.F. and Gueven, N. (2006) The complexity of p53 stabilization and activation, *Cell Death Differ*, **13**, 941-950.
- Lavrrar, J.L. and Farnham, P.J. (2004) The use of transient chromatin immunoprecipitation assays to test models for E2F1-specific transcriptional activation, *J Biol Chem*, **279**, 46343-46349.
- Lawrence, J.B., Carter, K.C. and Xing, X. (1993) Probing functional organization within the nucleus: is genome structure integrated with RNA metabolism?, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **58**, 807-818.
- Lawrence, J.B. and Clemson, C.M. (2008) Gene associations: true romance or chance meeting in a nuclear neighborhood?, *J Cell Biol*, **182**, 1035-1038.
- Lazzerini Denchi, E. and Helin, K. (2005) E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis, *EMBO Rep*, **6**, 661-668.
- Lee, C.H., Ko, Y.C., Goggins, W., Huang, J.J., Huang, M.S., Kao, E.L. and Wang, H.Z. (2000) Lifetime environmental exposure to tobacco smoke and primary lung cancer of non-smoking Taiwanese women, *Int J Epidemiol*, **29**, 224-231.
- Lemaire, R., Prasad, J., Kashima, T., Gustafson, J., Manley, J.L. and Lafyatis, R. (2002) Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins, *Genes Dev*, **16**, 594-607.
- Leone, G., Nuckolls, F., Ishida, S., Adams, M., Sears, R., Jakoi, L., Miron, A. and Nevins, J.R. (2000) Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins, *Mol Cell Biol*, **20**, 3626-3632.
- Leone, G., Sears, R., Huang, E., Rempel, R., Nuckolls, F., Park, C.H., Giangrande, P., Wu, L., Saavedra, H.I., Field, S.J., Thompson, M.A., Yang, H., Fujiwara, Y., Greenberg, M.E., Orkin, S., Smith, C. and Nevins, J.R. (2001) Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis, *Mol Cell*, **8**, 105-113.
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V. and Ferrara, N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science*, **246**, 1306-1309.
- Levine, A.J., Feng, Z., Mak, T.W., You, H. and Jin, S. (2006) Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways, *Genes Dev*, **20**, 267-275.
- Lewis, J.D. and Izaurralde, E. (1997) The role of the cap structure in RNA processing

and nuclear export, *Eur J Biochem*, **247**, 461-469.

Li, H., Yonekura, H., Kim, C.H., Sakurai, S., Yamamoto, Y., Takiya, T., Futo, S., Watanabe, T. and Yamamoto, H. (2004) Possible participation of pICln in the regulation of angiogenesis through alternative splicing of vascular endothelial growth factor receptor mRNAs, *Endothelium*, **11**, 293-300.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell*, **94**, 491-501.

Li, J., Ran, C., Li, E., Gordon, F., Comstock, G., Siddiqui, H., Cleghorn, W., Chen, H.Z., Kornacker, K., Liu, C.G., Pandit, S.K., Khanizadeh, M., Weinstein, M., Leone, G. and de Bruin, A. (2008) Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development, *Dev Cell*, **14**, 62-75.

Li, L.Y., Luo, X. and Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, *Nature*, **412**, 95-99.

Li, X. and Manley, J.L. (2005a) Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability, *Cell*, **122**, 365-378.

Li, X. and Manley, J.L. (2005b) New talents for an old acquaintance: the SR protein splicing factor ASF/SF2 functions in the maintenance of genome stability, *Cell Cycle*, **4**, 1706-1708.

Li, X., Wang, J. and Manley, J.L. (2005) Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation, *Genes Dev*, **19**, 2705-2714.

Lin, S., Coutinho-Mansfield, G., Wang, D., Pandit, S. and Fu, X.D. (2008) The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation, *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 819-826.

Lin, S., Xiao, R., Sun, P., Xu, X. and Fu, X.D. (2005) Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation, *Mol Cell*, **20**, 413-425.

Lin, S.Y., Black, A.R., Kostic, D., Pajovic, S., Hoover, C.N. and Azizkhan, J.C. (1996) Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction, *Mol Cell Biol*, **16**, 1668-1675.

Lin, W.C., Lin, F.T. and Nevins, J.R. (2001) Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation, *Genes Dev*, **15**, 1833-1844.

Lindeman, G.J., Dagnino, L., Gaubatz, S., Xu, Y., Bronson, R.T., Warren, H.B. and Livingston, D.M. (1998) A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting, *Genes Dev*, **12**, 1092-1098.

Lindstrom, M.S. and Wiman, K.G. (2003) Myc and E2F1 induce p53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts, *Oncogene*, **22**, 4993-5005.

Lissy, N.A., Davis, P.K., Irwin, M., Kaelin, W.G. and Dowdy, S.F. (2000) A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation, *Nature*, **407**, 642-645.

Listerman, I., Sapra, A.K. and Neugebauer, K.M. (2006) Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells, *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 815-822.

- Liston, P., Fong, W.G. and Korneluk, R.G. (2003) The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2, *Oncogene*, **22**, 8568-8580.
- Liu, H.X., Zhang, M. and Krainer, A.R. (1998) Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins, *Genes Dev*, **12**, 1998-2012.
- Liu, K., Lin, F.T., Ruppert, J.M. and Lin, W.C. (2003) Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1, *Mol Cell Biol*, **23**, 3287-3304.
- Liu, K., Luo, Y., Lin, F.T. and Lin, W.C. (2004) TopBP1 recruits Brg1/Brm to repress E2F1-induced apoptosis, a novel pRb-independent and E2F1-specific control for cell survival, *Genes Dev*, **18**, 673-686.
- Logan, N., Graham, A., Zhao, X., Fisher, R., Maiti, B., Leone, G. and La Thangue, N.B. (2005) E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7, *Oncogene*, **24**, 5000-5004.
- Longman, D., Johnstone, I.L. and Caceres, J.F. (2000) Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans*, *EMBO J*, **19**, 1625-1637.
- Lopato, S., Kalyna, M., Dorner, S., Kobayashi, R., Krainer, A.R. and Barta, A. (1999) atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, regulates splicing of specific plant genes, *Genes Dev*, **13**, 987-1001.
- Lou, H. and Gagel, R.F. (1998) Alternative RNA processing--its role in regulating expression of calcitonin/calcitonin gene-related peptide, *J Endocrinol*, **156**, 401-405.
- Loughran, O. and La Thangue, N.B. (2000) Apoptotic and growth-promoting activity of E2F modulated by MDM2, *Mol Cell Biol*, **20**, 2186-2197.
- Lubin, J.H., Caporaso, N., Wichmann, H.E., Schaffrath-Rosario, A. and Alavanja, M.C. (2007) Cigarette smoking and lung cancer: modeling effect modification of total exposure and intensity, *Epidemiology*, **18**, 639-648.
- Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J. and Helin, K. (1996) Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression, *Mol Cell Biol*, **16**, 1047-1057.
- Luo, R.X., Postigo, A.A. and Dean, D.C. (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription, *Cell*, **92**, 463-473.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors, *Cell*, **94**, 481-490.

M

- Ma, X. and He, F. (2003) Advances in the study of SR protein family, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **1**, 2-8.
- Ma, Y., Cress, W.D. and Haura, E.B. (2003) Flavopiridol-induced apoptosis is mediated through up-regulation of E2F1 and repression of Mcl-1, *Mol Cancer Ther*, **2**, 73-81.
- 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.
- Maniatis, T. and Reed, R. (2002) An extensive network of coupling among gene expression machines, *Nature*, **416**, 499-506.
- Manley, J.L. and Tacke, R. (1996) SR proteins and splicing control, *Genes Dev*, **10**, 1569-1579.
- Mann, D.J. and Jones, N.C. (1996) E2F-1 but not E2F-4 can overcome p16-induced G1 cell-cycle arrest, *Curr Biol*, **6**, 474-483.
- Maquat, L.E. and Carmichael, G.G. (2001) Quality control of mRNA function, *Cell*, **104**, 173-176.
- Marchand, V., Mereau, A., Jacquenet, S., Thomas, D., Mougin, A., Gattoni, R., Stevenin, J. and Branlant, C. (2002) A Janus splicing regulatory element modulates HIV-1 tat and rev mRNA production by coordination of hnRNP A1 cooperative binding, *J Mol Biol*, **323**, 629-652.
- Maris, C., Dominguez, C. and Allain, F.H. (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression, *FEBS J*, **272**, 2118-2131.
- Markham, D., Munro, S., Soloway, J., O'Connor, D.P. and La Thangue, N.B. (2006) DNA-damage-responsive acetylation of pRb regulates binding to E2F-1, *EMBO Rep*, **7**, 192-198.
- Martinez-Balbas, M.A., Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, A. and Kouzarides, T. (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation, *EMBO J*, **19**, 662-671.
- Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M.I., Cartwright, P., Helin, K. and Giacca, M. (2000) E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation, *J Biol Chem*, **275**, 10887-10892.
- Massiello, A. and Chalfant, C.E. (2006) SRp30a (ASF/SF2) regulates the alternative splicing of caspase-9 pre-mRNA and is required for ceramide-responsiveness, *J Lipid Res*, **47**, 892-897.
- Mathew, R., Hartmuth, K., Mohlmann, S., Urlaub, H., Ficner, R. and Luhrmann, R. (2008) Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome, *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 435-443.
- Mattaj, I.W. (1994) RNA processing. Splicing in space, *Nature*, **372**, 727-728.
- Matter, N., Marx, M., Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P. and Konig, H. (2000) Heterogeneous ribonucleoprotein A1 is part of an exon-specific splice-silencing complex controlled by oncogenic signaling pathways, *J Biol Chem*, **275**, 35353-35360.
- Mattox, W. and Baker, B.S. (1991) Autoregulation of the splicing of transcripts from the transformer-2 gene of *Drosophila*, *Genes Dev*, **5**, 786-796.
- Mattson, M.P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease, *Nature*, **430**, 631-639.
- Mayeda, A., Badolato, J., Kobayashi, R., Zhang, M.Q., Gardiner, E.M. and Krainer, A.R. (1999) Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing, *EMBO J*, **18**, 4560-4570.
- Mayeda, A., Helfman, D.M. and Krainer, A.R. (1993) Modulation of exon skipping

and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF, *Mol Cell Biol*, **13**, 2993-3001.

Mayeda, A. and Krainer, A.R. (1992) Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2, *Cell*, **68**, 365-375.

Mayeda, A., Sreaton, G.R., Chandler, S.D., Fu, X.D. and Krainer, A.R. (1999) Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements, *Mol Cell Biol*, **19**, 1853-1863.

McClellan, K.A. and Slack, R.S. (2007) Specific in vivo roles for E2Fs in differentiation and development, *Cell Cycle*, **6**, 2917-2927.

Mercatante, D. and Kole, R. (2000) Modification of alternative splicing pathways as a potential approach to chemotherapy, *Pharmacol Ther*, **85**, 237-243.

Merdzhanova, G., Edmond, V., De Seranno, S., Van den Broeck, A., Corcos, L., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S. and Eymin, B. (2008) E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35, *Cell Death Differ*, **15**, 1815-1823.

Mermoud, J.E., Cohen, P.T. and Lamond, A.I. (1994) Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism, *EMBO J*, **13**, 5679-5688.

Merrick, D.T., Haney, J., Petrunich, S., Sugita, M., Miller, Y.E., Keith, R.L., Kennedy, T.C. and Franklin, W.A. (2005) Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial

dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis, *Lung Cancer*, **48**, 31-45.

Michaud, S. and Reed, R. (1991) An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway, *Genes Dev*, **5**, 2534-2546.

Micheau, O., Hammann, A., Solary, E. and Dimanche-Boitrel, M.T. (1999a) STAT-1-independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs, *Biochem Biophys Res Commun*, **256**, 603-607.

Micheau, O., Solary, E., Hammann, A. and Dimanche-Boitrel, M.T. (1999b) Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs, *J Biol Chem*, **274**, 7987-7992.

Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C. and Grutter, M.G. (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex, *J Biol Chem*, **277**, 45162-45171.

Michlewski, G., Sanford, J.R. and Caceres, J.F. (2008) The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1, *Mol Cell*, **30**, 179-189.

Miki, T., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Smith, C.L., Burgess, W.H., Chan, A.M. and Aaronson, S.A. (1992) Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 246-250.

Minchenko, A., Salceda, S., Bauer, T. and Caro, J. (1994) Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene, *Cell Mol Biol Res*, **40**, 35-39.

- Misteli, T. (1999) RNA splicing: What has phosphorylation got to do with it?, *Curr Biol*, **9**, R198-200.
- Misteli, T., Caceres, J.F., Clement, J.Q., Krainer, A.R., Wilkinson, M.F. and Spector, D.L. (1998) Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo, *J Cell Biol*, **143**, 297-307.
- Misteli, T., Caceres, J.F. and Spector, D.L. (1997) The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells, *Nature*, **387**, 523-527.
- Misteli, T. and Spector, D.L. (1996) Serine/threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors, *Mol Biol Cell*, **7**, 1559-1572.
- Misteli, T. and Spector, D.L. (1997) Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing, *Trends Cell Biol*, **7**, 135-138.
- Misteli, T. and Spector, D.L. (1998) The cellular organization of gene expression, *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 323-331.
- Misteli, T. and Spector, D.L. (1999) RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo, *Mol Cell*, **3**, 697-705.
- Modrek, B. and Lee, C. (2002) A genomic view of alternative splicing, *Nat Genet*, **30**, 13-19.
- Mole, S., Milligan, S.G. and Graham, S.V. (2009) Human papillomavirus type 16 E2 protein transcriptionally activates the promoter of a key cellular splicing factor, SF2/ASF, *J Virol*, **83**, 357-367.
- Molenaar, C., Abdulle, A., Gena, A., Tanke, H.J. and Dirks, R.W. (2004) Poly(A)+ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle domains in transcriptionally active and inactive cells, *J Cell Biol*, **165**, 191-202.
- Moller, M.B., Kania, P.W., Ino, Y., Gerdes, A.M., Nielsen, O., Louis, D.N., Skjodt, K. and Pedersen, N.T. (2000) Frequent disruption of the RB1 pathway in diffuse large B cell lymphoma: prognostic significance of E2F-1 and p16INK4A, *Leukemia*, **14**, 898-904.
- Moon, N.S., Di Stefano, L., Morris, E.J., Patel, R., White, K. and Dyson, N.J. (2008) E2F and p53 induce apoptosis independently during Drosophila development but intersect in the context of DNA damage, *PLoS Genet*, **4**, e1000153.
- Moon, N.S. and Dyson, N. (2008) E2F7 and E2F8 keep the E2F family in balance, *Dev Cell*, **14**, 1-3.
- Moon, N.S., Frolov, M.V., Kwon, E.J., Di Stefano, L., Dimova, D.K., Morris, E.J., Taylor-Harding, B., White, K. and Dyson, N.J. (2005) Drosophila E2F1 has context-specific pro- and antiapoptotic properties during development, *Dev Cell*, **9**, 463-475.
- Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzerini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H. and Helin, K. (2001) Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53, *Nat Cell Biol*, **3**, 552-558.
- Morris, L., Allen, K.E. and La Thangue, N.B. (2000) Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators, *Nat Cell Biol*, **2**, 232-239.
- Mortillaro, M.J., Blencowe, B.J., Wei, X., Nakayasu, H., Du, L., Warren, S.L., Sharp, P.A. and Berezney, R. (1996) A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear

matrix, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8253-8257.

Mougin, A., Gottschalk, A., Fabrizio, P., Luhrmann, R. and Branlant, C. (2002) Direct probing of RNA structure and RNA-protein interactions in purified HeLa cell's and yeast spliceosomal U4/U6.U5 tri-snRNP particles, *J Mol Biol*, **317**, 631-649.

Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D. and Helin, K. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis, *Genes Dev*, **15**, 267-285.

Mundle, S.D. and Saberwal, G. (2003) Evolving intricacies and implications of E2F1 regulation, *FASEB J*, **17**, 569-574.

Muraki, M., Ohkawara, B., Hosoya, T., Onogi, H., Koizumi, J., Koizumi, T., Sumi, K., Yomoda, J., Murray, M.V., Kimura, H., Furuichi, K., Shibuya, H., Krainer, A.R., Suzuki, M. and Hagiwara, M. (2004) Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks, *J Biol Chem*, **279**, 24246-24254.

N

Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R.V., McCurrach, M.E., Jacobson, M.D., Narita, M., Zhang, M.Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D. and Lowe, S.W. (2002) Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F, *Nat Cell Biol*, **4**, 859-864.

Nakayama, K.I. and Nakayama, K. (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer, *Nat Rev Cancer*, **6**, 369-381.

Narlikar, G.J., Fan, H.Y. and Kingston, R.E. (2002) Cooperation between

complexes that regulate chromatin structure and transcription, *Cell*, **108**, 475-487.

Nayler, O., Schnorrer, F., Stamm, S. and Ullrich, A. (1998) The cellular localization of the murine serine/arginine-rich protein kinase CLK2 is regulated by serine 141 autophosphorylation, *J Biol Chem*, **273**, 34341-34348.

Nelson, M.A., Reynolds, S.H., Rao, U.N., Goulet, A.C., Feng, Y., Beas, A., Honchak, B., Averill, J., Lowry, D.T., Senft, J.R., Jefferson, A.M., Johnson, R.C. and Sargent, L.M. (2006) Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma, *Cancer Biol Ther*, **5**, 407-412.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *FASEB J*, **13**, 9-22.

Neuman, E., Sellers, W.R., McNeil, J.A., Lawrence, J.B. and Kaelin, W.G., Jr. (1996) Structure and partial genomic sequence of the human E2F1 gene, *Gene*, **173**, 163-169.

Ngo, J.C., Giang, K., Chakrabarti, S., Ma, C.T., Huynh, N., Hagopian, J.C., Dorrestein, P.C., Fu, X.D., Adams, J.A. and Ghosh, G. (2008) A sliding docking interaction is essential for sequential and processive phosphorylation of an SR protein by SRPK1, *Mol Cell*, **29**, 563-576.

Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E. and Kouzarides, T. (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters, *Nature*, **412**, 561-565.

Nip, J., Strom, D.K., Eischen, C.M., Cleveland, J.L., Zambetti, G.P. and Hiebert, S.W. (2001) E2F-1 induces the

stabilization of p53 but blocks p53-mediated transactivation, *Oncogene*, **20**, 910-920.

Nishi, M., Abe, Y., Tomii, Y., Tsukamoto, H., Kijima, H., Yamazaki, H., Ohnishi, Y., Iwasaki, M., Inoue, H., Ueyama, Y. and Nakamura, M. (2005) Cell binding isoforms of vascular endothelial growth factor-A (VEGF189) contribute to blood flow-distant metastasis of pulmonary adenocarcinoma, *Int J Oncol*, **26**, 1517-1524.

Nissim-Rafinia, M. and Kerem, B. (2005) The splicing machinery is a genetic modifier of disease severity, *Trends Genet*, **21**, 480-483.

Nogues, G., Kadener, S., Cramer, P., Bentley, D. and Kornblihtt, A.R. (2002) Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing, *J Biol Chem*, **277**, 43110-43114.

Novoyatleva, T., Heinrich, B., Tang, Y., Benderska, N., Butchbach, M.E., Lorson, C.L., Lorson, M.A., Ben-Dov, C., Fehlbaum, P., Bracco, L., Burghes, A.H., Bollen, M. and Stamm, S. (2008) Protein phosphatase 1 binds to the RNA recognition motif of several splicing factors and regulates alternative pre-mRNA processing, *Hum Mol Genet*, **17**, 52-70.

Nowak, D.G., Woolard, J., Amin, E.M., Konopatskaya, O., Saleem, M.A., Churchill, A.J., Ladomery, M.R., Harper, S.J. and Bates, D.O. (2008) Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors, *J Cell Sci*, **121**, 3487-3495.

O

Oberley, M.J., Inman, D.R. and Farnham, P.J. (2003) E2F6 negatively regulates BRCA1 in human cancer cells without

methylation of histone H3 on lysine 9, *J Biol Chem*, **278**, 42466-42476.

Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M. and Nakatani, Y. (2002) A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells, *Science*, **296**, 1132-1136.

Ohtani, K. and Nevins, J.R. (1994) Functional properties of a Drosophila homolog of the E2F1 gene, *Mol Cell Biol*, **14**, 1603-1612.

Okada, F., Rak, J.W., Croix, B.S., Lieubeau, B., Kaya, M., Roncari, L., Shirasawa, S., Sasazuki, T. and Kerbel, R.S. (1998) Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3609-3614.

Orphanides, G. and Reinberg, D. (2002) A unified theory of gene expression, *Cell*, **108**, 439-451.

Osada, H. and Takahashi, T. (2002) Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer, *Oncogene*, **21**, 7421-7434.

Osada, H., Tatematsu, Y., Yatabe, Y., Nakagawa, T., Konishi, H., Harano, T., Tezel, E., Takada, M. and Takahashi, T. (2002) Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3sigma in human lung cancers, *Oncogene*, **21**, 2418-2424.

Oshika, Y., Nakamura, M., Tokunaga, T., Ozeki, Y., Fukushima, Y., Hatanaka, H., Abe, Y., Yamazaki, H., Kijima, H., Tamaoki, N. and Ueyama, Y. (1998) Expression of cell-associated isoform of

vascular endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer, *Int J Oncol*, **12**, 541-544.

P

Page, B.D., Guedes, S., Waring, D. and Priess, J.R. (2001) The *C. elegans* E2F- and DP-related proteins are required for embryonic asymmetry and negatively regulate Ras/MAPK signaling, *Mol Cell*, **7**, 451-460.

Parisi, T., Pollice, A., Di Cristofano, A., Calabro, V. and La Mantia, G. (2002) Transcriptional regulation of the human tumor suppressor p14(ARF) by E2F1, E2F2, E2F3, and Sp1-like factors, *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 1138-1145.

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2005) Global cancer statistics, 2002, *CA Cancer J Clin*, **55**, 74-108.

Patel, A.A. and Steitz, J.A. (2003) Splicing double: insights from the second spliceosome, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 960-970.

Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., Cimino, L., Porcellini, A., Screpanti, I., Balsano, C., Alesse, E., Gulino, A. and Levrero, M. (2003) Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage, *Nat Cell Biol*, **5**, 552-558.

Peeper, D.S., Keblusek, P., Helin, K., Toebes, M., van der Eb, A.J. and Zantema, A. (1995) Phosphorylation of a specific cdk site in E2F-1 affects its electrophoretic mobility and promotes pRB-binding in vitro, *Oncogene*, **10**, 39-48.

Peter, M.E. and Krammer, P.H. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond, *Cell Death Differ*, **10**, 26-35.

Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M.R., Shah, M.H., Nicoloso, M.S., de Martino, I., Iliopoulos, D., Pillozzi, E., Liu, C.G., Negrini, M., Cavazzini, L., Volinia, S., Alder, H., Ruco, L.P., Baldassarre, G., Croce, C.M. and Vecchione, A. (2008) E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer, *Cancer Cell*, **13**, 272-286.

Phair, R.D. and Misteli, T. (2000) High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus, *Nature*, **404**, 604-609.

Philips, A.V. and Cooper, T.A. (2000) RNA processing and human disease, *Cell Mol Life Sci*, **57**, 235-249.

Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R. and Vousden, K.H. (1999) E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways, *Mol Cell*, **4**, 771-781.

Pickering, M.T. and Kowalik, T.F. (2006) Rb inactivation leads to E2F1-mediated DNA double-strand break accumulation, *Oncogene*, **25**, 746-755.

Pierce, A.M., Fisher, S.M., Conti, C.J. and Johnson, D.G. (1998a) Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with ras in skin tumor development, *Oncogene*, **16**, 1267-1276.

Pierce, A.M., Gimenez-Conti, I.B., Schneider-Broussard, R., Martinez, L.A., Conti, C.J. and Johnson, D.G. (1998b) Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8858-8863.

Pierce, A.M., Schneider-Broussard, R., Gimenez-Conti, I.B., Russell, J.L., Conti, C.J. and Johnson, D.G. (1999) E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model, *Mol Cell Biol*, **19**, 6408-6414.

Pilch, B., Allemand, E., Facompre, M., Bailly, C., Riou, J.F., Soret, J. and Tazi, J. (2001) Specific inhibition of serine- and arginine-rich splicing factors phosphorylation, spliceosome assembly, and splicing by the antitumor drug NB-506, *Cancer Res*, **61**, 6876-6884.

Pinkoski, M.J. and Green, D.R. (2002) Lymphocyte apoptosis: refining the paths to perdition, *Curr Opin Hematol*, **9**, 43-49.

Pinol-Roma, S. and Dreyfuss, G. (1992) Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm, *Nature*, **355**, 730-732.

Powers, J.T., Hong, S., Mayhew, C.N., Rogers, P.M., Knudsen, E.S. and Johnson, D.G. (2004) E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis, *Mol Cancer Res*, **2**, 203-214.

Pozzoli, U. and Sironi, M. (2005) Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals, *Cell Mol Life Sci*, **62**, 1579-1604.

Prasad, J., Colwill, K., Pawson, T. and Manley, J.L. (1999) The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing, *Mol Cell Biol*, **19**, 6991-7000.

Pritchard-Jones, R.O., Dunn, D.B., Qiu, Y., Varey, A.H., Orlando, A., Rigby, H., Harper, S.J. and Bates, D.O. (2007) Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma, *Br J Cancer*, **97**, 223-230.

Proudfoot, N.J., Furger, A. and Dye, M.J. (2002) Integrating mRNA processing with transcription, *Cell*, **108**, 501-512.

Purcell, D.F. and Martin, M.A. (1993) Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity, *J Virol*, **67**, 6365-6378.

Q

Qin, G., Kishore, R., Dolan, C.M., Silver, M., Wecker, A., Luedemann, C.N., Thorne, T., Hanley, A., Curry, C., Heyd, L., Dinesh, D., Kearney, M., Martelli, F., Murayama, T., Goukassian, D.A., Zhu, Y. and Losordo, D.W. (2006) Cell cycle regulator E2F1 modulates angiogenesis via p53-dependent transcriptional control of VEGF, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11015-11020.

Qin, X.Q., Livingston, D.M., Kaelin, W.G., Jr. and Adams, P.D. (1994) Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10918-10922.

R

Rabbani, F., Richon, V.M., Orlow, I., Lu, M.L., Drobnjak, M., Dudas, M., Charytonowicz, E., Dalbagni, G. and Cordon-Cardo, C. (1999) Prognostic significance of transcription factor E2F-1 in bladder cancer: genotypic and phenotypic characterization, *J Natl Cancer Inst*, **91**, 874-881.

- Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M.B. and Gutierrez, C. (1999) The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators, *Nucleic Acids Res*, **27**, 3527-3533.
- Rasheva, V.I., Knight, D., Bozko, P., Marsh, K. and Frolov, M.V. (2006) Specific role of the SR protein splicing factor B52 in cell cycle control in *Drosophila*, *Mol Cell Biol*, **26**, 3468-3477.
- Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hadano, S., Houtzager, V.M., Seiden, I., Keen, S.L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B.F., Peterson, E.P., Thornberry, N.A., Huang, J., MacPherson, D.P., Black, S.C., Hornung, F., Lenardo, M.J., Hayden, M.R., Roy, S. and Nicholson, D.W. (1998) Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex, *Cell Death Differ*, **5**, 271-288.
- Reed, J.C. (1999) Dysregulation of apoptosis in cancer, *J Clin Oncol*, **17**, 2941-2953.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A. and Dynlacht, B.D. (2002) E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints, *Genes Dev*, **16**, 245-256.
- Rennel, E., Waine, E., Guan, H., Schuler, Y., Leenders, W., Woolard, J., Sugiono, M., Gillatt, D., Kleinerman, E., Bates, D. and Harper, S. (2008) The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice, *Br J Cancer*, **98**, 1250-1257.
- Ring, H.Z. and Lis, J.T. (1994) The SR protein B52/SRp55 is essential for *Drosophila* development, *Mol Cell Biol*, **14**, 7499-7506.
- Rio, D.C. (1988) Accurate and efficient pre-mRNA splicing in *Drosophila* cell-free extracts, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 2904-2908.
- Robertson, K.D. and Jones, P.A. (1998) The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53, *Mol Cell Biol*, **18**, 6457-6473.
- Rodicker, F., Stiewe, T., Zimmermann, S. and Putzer, B.M. (2001) Therapeutic efficacy of E2F1 in pancreatic cancer correlates with TP73 induction, *Cancer Res*, **61**, 7052-7055.
- Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Debatis, M.E., Jones, S. and Kowalik, T.F. (2002) E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis, *Mol Cell Biol*, **22**, 5308-5318.
- Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Frame, F.M., Debatis, M.E., Sanchez, Y., Jones, S. and Kowalik, T.F. (2004) Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2, *Mol Cell Biol*, **24**, 2968-2977.
- Roscigno, R.F. and Garcia-Blanco, M.A. (1995) SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome, *RNA*, **1**, 692-706.
- Ross, J.F., Liu, X. and Dynlacht, B.D. (1999) Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumor suppressor protein, *Mol Cell*, **3**, 195-205.
- Rossignol, P., Stevens, R., Perennes, C., Jasinski, S., Cella, R., Tremousaygue, D. and Bergounioux, C. (2002) AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce Arabidopsis leaf cells to re-enter S phase, *Mol Genet Genomics*, **266**, 995-1003.

Rowen, L., Young, J., Birditt, B., Kaur, A., Madan, A., Philipps, D.L., Qin, S., Minx, P., Wilson, R.K., Hood, L. and Graveley, B.R. (2002) Analysis of the human neurexin genes: alternative splicing and the generation of protein diversity, *Genomics*, **79**, 587-597.

Rowland, B.D. and Bernards, R. (2006) Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs, *Cell*, **127**, 871-874.

Rubin, S.M., Gall, A.L., Zheng, N. and Pavletich, N.P. (2005) Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release, *Cell*, **123**, 1093-1106.

Russell, J.L., Powers, J.T., Rounbehler, R.J., Rogers, P.M., Conti, C.J. and Johnson, D.G. (2002) ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc, *Mol Cell Biol*, **22**, 1360-1368.

Russell, J.L., Weeks, R.L., Berton, T.R. and Johnson, D.G. (2006) E2F1 suppresses skin carcinogenesis via the ARF-p53 pathway, *Oncogene*, **25**, 867-876.

S

Saavedra, H.I., Wu, L., de Bruin, A., Timmers, C., Rosol, T.J., Weinstein, M., Robinson, M.L. and Leone, G. (2002) Specificity of E2F1, E2F2, and E2F3 in mediating phenotypes induced by loss of Rb, *Cell Growth Differ*, **13**, 215-225.

Salesse, S., Dylla, S.J. and Verfaillie, C.M. (2004) p210BCR/ABL-induced alteration of pre-mRNA splicing in primary human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells, *Leukemia*, **18**, 727-733.

Salon, C., Eymin, B., Micheau, O., Chaperot, L., Plumas, J., Brambilla, C.,

Brambilla, E. and Gazzeri, S. (2006) E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short), *Cell Death Differ*, **13**, 260-272.

Sanchez, G., Delattre, O., Auboeuf, D. and Dutertre, M. (2008) Coupled alteration of transcription and splicing by a single oncogene: boosting the effect on cyclin D1 activity, *Cell Cycle*, **7**, 2299-2305.

Sanford, J.R. and Bruzik, J.P. (1999) Developmental regulation of SR protein phosphorylation and activity, *Genes Dev*, **13**, 1513-1518.

Sanford, J.R. and Caceres, J.F. (2004) Pre-mRNA splicing: life at the centre of the central dogma, *J Cell Sci*, **117**, 6261-6263.

Sanford, J.R., Coutinho, P., Hackett, J.A., Wang, X., Ranahan, W. and Caceres, J.F. (2008) Identification of nuclear and cytoplasmic mRNA targets for the shuttling protein SF2/ASF, *PLoS ONE*, **3**, e3369.

Sanford, J.R., Ellis, J. and Caceres, J.F. (2005) Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing, *Biochem Soc Trans*, **33**, 443-446.

Sanz, G., Mir, L. and Jacquemin-Sablon, A. (2002) Bleomycin resistance in mammalian cells expressing a genetic suppressor element derived from the SRPK1 gene, *Cancer Res*, **62**, 4453-4458.

Sathasivam, S., Ince, P.G. and Shaw, P.J. (2001) Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence, *Neuropathol Appl Neurobiol*, **27**, 257-274.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas)

signaling pathways, *EMBO J*, **17**, 1675-1687.

Scheijen, B., Bronk, M., van der Meer, T. and Bernards, R. (2003) Constitutive E2F1 overexpression delays endochondral bone formation by inhibiting chondrocyte differentiation, *Mol Cell Biol*, **23**, 3656-3668.

Schenk, P.W., Stoop, H., Bokemeyer, C., Mayer, F., Stoter, G., Oosterhuis, J.W., Wiemer, E., Looijenga, L.H. and Nooter, K. (2004) Resistance to platinum-containing chemotherapy in testicular germ cell tumors is associated with downregulation of the protein kinase SRPK1, *Neoplasia*, **6**, 297-301.

Schmitz, I., Weyd, H., Krueger, A., Baumann, S., Fas, S.C., Krammer, P.H. and Kirchhoff, S. (2004) Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort, *J Immunol*, **172**, 2194-2200.

Schwerk, C. and Schulze-Osthoff, K. (2005) Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing, *Mol Cell*, **19**, 1-13.

Screatton, G.R., Caceres, J.F., Mayeda, A., Bell, M.V., Plebanski, M., Jackson, D.G., Bell, J.I. and Krainer, A.R. (1995) Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors, *EMBO J*, **14**, 4336-4349.

Sekido, Y., Fong, K.M. and Minna, J.D. (1998) Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer, *Biochim Biophys Acta*, **1378**, F21-59.

Sekido, Y., Fong, K.M. and Minna, J.D. (2003) Molecular genetics of lung cancer, *Annu Rev Med*, **54**, 73-87.

Sekido, Y., Sato, M., Usami, N., Shigemitsu, K., Mori, S., Maeda, O., Yokoi, T., Hasegawa, Y., Yoshioka, H. and Shimokata, K. (2002) Establishment of a large cell lung cancer cell line (Y-ML-1B) producing granulocyte colony-stimulating factor, *Cancer Genet Cytogenet*, **137**, 33-42.

Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S. and Dvorak, H.F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science*, **219**, 983-985.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L. and Schuh, A.C. (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice, *Nature*, **376**, 62-66.

Shan, B. and Lee, W.H. (1994) Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis, *Mol Cell Biol*, **14**, 8166-8173.

Shan, B., Zhu, X., Chen, P.L., Durfee, T., Yang, Y., Sharp, D. and Lee, W.H. (1992) Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma-associated proteins: identification of a gene with properties of the transcription factor E2F, *Mol Cell Biol*, **12**, 5620-5631.

Shen, H., Kan, J.L. and Green, M.R. (2004) Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly, *Mol Cell*, **13**, 367-376.

Shi, J., Hu, Z., Pabon, K. and Scotto, K.W. (2008) Caffeine regulates alternative splicing in a subset of cancer-associated genes: a role for SC35, *Mol Cell Biol*, **28**, 883-895.

- Shi, Y. and Manley, J.L. (2007) A complex signaling pathway regulates SRp38 phosphorylation and pre-mRNA splicing in response to heat shock, *Mol Cell*, **28**, 79-90.
- Shi, Y., Reddy, B. and Manley, J.L. (2006) PP1/PP2A phosphatases are required for the second step of Pre-mRNA splicing and target specific snRNP proteins, *Mol Cell*, **23**, 819-829.
- Shin, C., Kleiman, F.E. and Manley, J.L. (2005) Multiple properties of the splicing repressor SRp38 distinguish it from typical SR proteins, *Mol Cell Biol*, **25**, 8334-8343.
- Shivapurkar, N., Wiethage, T., Wistuba, II, Milchgrub, S., Muller, K.M. and Gazdar, A.F. (2000) Presence of simian virus 40 sequences in malignant pleural, peritoneal and noninvasive mesotheliomas, *Int J Cancer*, **85**, 743-745.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. and Keshet, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis, *Nature*, **359**, 843-845.
- Singh, P., Wong, S.H. and Hong, W. (1994) Overexpression of E2F-1 in rat embryo fibroblasts leads to neoplastic transformation, *EMBO J*, **13**, 3329-3338.
- Smith, C.W. and Nadal-Ginard, B. (1989) Mutually exclusive splicing of alpha-tropomyosin exons enforced by an unusual lariat branch point location: implications for constitutive splicing, *Cell*, **56**, 749-758.
- Smith, C.W. and Valcarcel, J. (2000) Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control, *Trends Biochem Sci*, **25**, 381-388.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G. and Klagsbrun, M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor, *Cell*, **92**, 735-745.
- Solis, A.S., Peng, R., Crawford, J.B., Phillips, J.A., 3rd and Patton, J.G. (2008) Growth hormone deficiency and splicing fidelity: two serine/arginine-rich proteins, ASF/SF2 and SC35, act antagonistically, *J Biol Chem*, **283**, 23619-23626.
- Soret, J., Gabut, M., Dupon, C., Kohlhagen, G., Stevenin, J., Pommier, Y. and Tazi, J. (2003) Altered serine/arginine-rich protein phosphorylation and exonic enhancer-dependent splicing in Mammalian cells lacking topoisomerase I, *Cancer Res*, **63**, 8203-8211.
- Soret, J., Gattoni, R., Guyon, C., Sureau, A., Popielarz, M., Le Rouzic, E., Dumon, S., Apiou, F., Dutrillaux, B., Voss, H., Ansoerge, W., Stevenin, J. and Perbal, B. (1998) Characterization of SRp46, a novel human SR splicing factor encoded by a PR264/SC35 retropseudogene, *Mol Cell Biol*, **18**, 4924-4934.
- Sotillo, R., Hernando, E., Diaz-Rodriguez, E., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W. and Benezra, R. (2007) Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice, *Cancer Cell*, **11**, 9-23.
- Spector, D.L., Fu, X.D. and Maniatis, T. (1991) Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus, *EMBO J*, **10**, 3467-3481.
- Srebrow, A. and Kornblihtt, A.R. (2006) The connection between splicing and cancer, *J Cell Sci*, **119**, 2635-2641.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Guo, Y., Zhan, Y., Lazebnik, Y., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. (1999) Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that

can regulate apoptosis, *Cancer Res*, **59**, 999-1002.

Stamm, S. (2008) Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation, *J Biol Chem*, **283**, 1223-1227.

Stanelle, J. and Putzer, B.M. (2006) E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics, *Trends Mol Med*, **12**, 177-185.

Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide, *Science*, **267**, 1445-1449.

Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S. (2000) Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation, *Biochim Biophys Acta*, **1477**, 299-306.

Stevaux, O., Dimova, D., Frolov, M.V., Taylor-Harding, B., Morris, E. and Dyson, N. (2002) Distinct mechanisms of E2F regulation by Drosophila RBF1 and RBF2, *EMBO J*, **21**, 4927-4937.

Stevaux, O. and Dyson, N.J. (2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function, *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 684-691.

Stevens, C. and La Thangue, N.B. (2004) The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control, *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1071-1079.

Stevens, C., Smith, L. and La Thangue, N.B. (2003) Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage, *Nat Cell Biol*, **5**, 401-409.

Stickeler, E., Kittrell, F., Medina, D. and Berget, S.M. (1999) Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis, *Oncogene*, **18**, 3574-3582.

Stiewe, T. and Putzer, B.M. (2000) Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis, *Nat Genet*, **26**, 464-469.

Storre, J., Elsasser, H.P., Fuchs, M., Ullmann, D., Livingston, D.M. and Gaubatz, S. (2002) Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2f6, *EMBO Rep*, **3**, 695-700.

Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stevenin, J. and Soret, J. (2001) SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs, *EMBO J*, **20**, 1785-1796.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature*, **397**, 441-446.

Suzuki, A. and Hemmati-Brivanlou, A. (2000) Xenopus embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis, *Mol Cell*, **5**, 217-229.

Sylvestre, Y., De Guire, V., Querido, E., Mukhopadhyay, U.K., Bourdeau, V., Major, F., Ferbeyre, G. and Chartrand, P. (2007) An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop, *J Biol Chem*, **282**, 2135-2143.

T

Tacke, R., Chen, Y. and Manley, J.L. (1997) Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: creation of an SRp40-

specific splicing enhancer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1148-1153.

Tacke, R. and Manley, J.L. (1995) The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities, *EMBO J*, **14**, 3540-3551.

Tacke, R. and Manley, J.L. (1999) Determinants of SR protein specificity, *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 358-362.

Takahashi, Y., Rayman, J.B. and Dynlacht, B.D. (2000) Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression, *Genes Dev*, **14**, 804-816.

Tammemagi, M.C., McLaughlin, J.R. and Bull, S.B. (1999) Meta-analyses of p53 tumor suppressor gene alterations and clinicopathological features in resected lung cancers, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8**, 625-634.

Tanaka, H., Matsumura, I., Ezoe, S., Satoh, Y., Sakamaki, T., Albanese, C., Machii, T., Pestell, R.G. and Kanakura, Y. (2002) E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination, *Mol Cell*, **9**, 1017-1029.

Tarn, W.Y. and Steitz, J.A. (1995) Modulation of 5' splice site choice in pre-messenger RNA by two distinct steps, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2504-2508.

Tatton, W.G., Chalmers-Redman, R., Brown, D. and Tatton, N. (2003) Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation, *Ann Neurol*, **53 Suppl 3**, S61-70; discussion S70-62.

Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S.R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M. and Amati, B. (2004) E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the

Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1, *Mol Cell Biol*, **24**, 4546-4556.

Teigelkamp, S., Mundt, C., Achsel, T., Will, C.L. and Luhrmann, R. (1997) The human U5 snRNP-specific 100-kD protein is an RS domain-containing, putative RNA helicase with significant homology to the yeast splicing factor Prp28p, *RNA*, **3**, 1313-1326.

Tenenbaum, S.A. and Aguirre-Ghiso, J. (2005) Dephosphorylation shows SR proteins the way out, *Mol Cell*, **20**, 499-501.

Theoleyre, O., Deguillien, M., Moriniere, M., Starck, J., Moreau-Gachelin, F., Morle, F. and Baklouti, F. (2004) Spi-1/PU.1 but not Fli-1 inhibits erythroid-specific alternative splicing of 4.1R pre-mRNA in murine erythroleukemia cells, *Oncogene*, **23**, 920-927.

Thiberville, L., Payne, P., Vielkinds, J., LeRiche, J., Horsman, D., Nouvet, G., Palcic, B. and Lam, S. (1995) Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus, *Cancer Res*, **55**, 5133-5139.

Thome, M. and Tschopp, J. (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP, *Nat Rev Immunol*, **1**, 50-58.

Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science*, **267**, 1456-1462.

Tian, H. (2001) RNA ligands generated against complex nuclear targets indicate a role for U1 snRNP in co-ordinating transcription and RNA splicing, *FEBS Lett*, **509**, 282-286.

Tian, M. and Maniatis, T. (1993) A splicing enhancer complex controls

alternative splicing of doublesex pre-mRNA, *Cell*, **74**, 105-114.

Tolbert, D., Lu, X., Yin, C., Tantama, M. and Van Dyke, T. (2002) p19(ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53-mediated apoptosis and tumor suppression in vivo, *Mol Cell Biol*, **22**, 370-377.

Travis, W.D. (2002) Pathology of lung cancer, *Clin Chest Med*, **23**, 65-81, viii.

Travis, W.D., Garg, K., Franklin, W.A., Wistuba, II, Sabloff, B., Noguchi, M., Kakinuma, R., Zakowski, M., Ginsberg, M., Padera, R., Jacobson, F., Johnson, B.E., Hirsch, F., Brambilla, E., Flieder, D.B., Geisinger, K.R., Thunnissen, F., Kerr, K., Yankelevitz, D., Franks, T.J., Galvin, J.R., Henderson, D.W., Nicholson, A.G., Hasleton, P.S., Roggli, V., Tsao, M.S., Cappuzzo, F. and Vazquez, M. (2006) Bronchioloalveolar carcinoma and lung adenocarcinoma: the clinical importance and research relevance of the 2004 World Health Organization pathologic criteria, *J Thorac Oncol*, **1**, S13-19.

Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Wen, J. and Lees, J.A. (2001) The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1519-1524.

Trimarchi, J.M. and Lees, J.A. (2002) Sibling rivalry in the E2F family, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 11-20.

Trinkle-Mulcahy, L., Andrews, P.D., Wickramasinghe, S., Sleeman, J., Prescott, A., Lam, Y.W., Lyon, C., Swedlow, J.R. and Lamond, A.I. (2003) Time-lapse imaging reveals dynamic relocalization of PP1gamma throughout the mammalian cell cycle, *Mol Biol Cell*, **14**, 107-117.

Tripathi, K. and Parnaik, V.K. (2008) Differential dynamics of splicing factor SC35 during the cell cycle, *J Biosci*, **33**, 345-354.

Trouche, D., Cook, A. and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator stimulates E2F1/DP1 activity, *Nucleic Acids Res*, **24**, 4139-4145.

Trouche, D. and Kouzarides, T. (1996) E2F1 and E1A(12S) have a homologous activation domain regulated by RB and CBP, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1439-1442.

Trouche, D., Le Chalony, C., Muchardt, C., Yaniv, M. and Kouzarides, T. (1997) RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11268-11273.

Tsai, K.Y., Hu, Y., Macleod, K.F., Crowley, D., Yamasaki, L. and Jacks, T. (1998) Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos, *Mol Cell*, **2**, 293-304.

Tsai, K.Y., MacPherson, D., Robinson, D.A., Crowley, D. and Jacks, T. (2002) ARF is not required for apoptosis in Rb mutant mouse embryos, *Curr Biol*, **12**, 159-163.

Tsantoulis, P.K. and Gorgoulis, V.G. (2005) Involvement of E2F transcription factor family in cancer, *Eur J Cancer*, **41**, 2403-2414.

Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, **249**, 505-510.

U

Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M.V. and Prives, C. (2004) p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2, *Genes Dev*, **18**, 3041-3054.

V

Varey, A.H., Rennel, E.S., Qiu, Y., Bevan, H.S., Perrin, R.M., Raffy, S., Dixon, A.R., Paraskeva, C., Zaccheo, O., Hassan, A.B., Harper, S.J. and Bates, D.O. (2008) VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy, *Br J Cancer*, **98**, 1366-1379.

Vellard, M., Sureau, A., Soret, J., Martinerie, C. and Perbal, B. (1992) A potential splicing factor is encoded by the opposite strand of the trans-spliced c-myc exon, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 2511-2515.

Venables, J.P. (2004) Aberrant and alternative splicing in cancer, *Cancer Res*, **64**, 7647-7654.

Venables, J.P. (2006) Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer, *Bioessays*, **28**, 378-386.

Verona, R., Moberg, K., Estes, S., Starz, M., Vernon, J.P. and Lees, J.A. (1997) E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization, *Mol Cell Biol*, **17**, 7268-7282.

Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C. and Helin, K. (1999) CDC25A phosphatase

is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase, *Mol Cell Biol*, **19**, 6379-6395.

Volm, M., Koomagi, R. and Rittgen, W. (1998) Clinical implications of cyclins, cyclin-dependent kinases, RB and E2F1 in squamous-cell lung carcinoma, *Int J Cancer*, **79**, 294-299.

W

Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, S., Finkel, T., Gu, W., Cress, W.D. and Chen, J. (2006) Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage, *Nat Cell Biol*, **8**, 1025-1031.

Wang, D., Russell, J.L. and Johnson, D.G. (2000) E2F4 and E2F1 have similar proliferative properties but different apoptotic and oncogenic properties in vivo, *Mol Cell Biol*, **20**, 3417-3424.

Wang, H.Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C. and Fu, X.D. (1998) SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells, *J Cell Biol*, **140**, 737-750.

Wang, H.Y., Xu, X., Ding, J.H., Bermingham, J.R., Jr. and Fu, X.D. (2001) SC35 plays a role in T cell development and alternative splicing of CD45, *Mol Cell*, **7**, 331-342.

Wang, J. and Manley, J.L. (1995) Overexpression of the SR proteins ASF/SF2 and SC35 influences alternative splicing in vivo in diverse ways, *RNA*, **1**, 335-346.

- Wang, J., Smith, P.J., Krainer, A.R. and Zhang, M.Q. (2005) Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes, *Nucleic Acids Res*, **33**, 5053-5062.
- Wang, J., Takagaki, Y. and Manley, J.L. (1996) Targeted disruption of an essential vertebrate gene: ASF/SF2 is required for cell viability, *Genes Dev*, **10**, 2588-2599.
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H. and Yuan, J. (1994) Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death, *Cell*, **78**, 739-750.
- Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P. and Konig, H. (2001) Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway, *EMBO J*, **20**, 4194-4203.
- Wei, X., Somanathan, S., Samarabandu, J. and Berezney, R. (1999) Three-dimensional visualization of transcription sites and their association with splicing factor-rich nuclear speckles, *J Cell Biol*, **146**, 543-558.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control, *Cell*, **81**, 323-330.
- Weinberg, R.J. and van Eyck, S.L. (1991) A tetramethylbenzidine/tungstate reaction for horseradish peroxidase histochemistry, *J Histochem Cytochem*, **39**, 1143-1148.
- Wells, J., Yan, P.S., Cechvala, M., Huang, T. and Farnham, P.J. (2003) Identification of novel pRb binding sites using CpG microarrays suggests that E2F recruits pRb to specific genomic sites during S phase, *Oncogene*, **22**, 1445-1460.
- Wikonkal, N.M., Remenyik, E., Knezevic, D., Zhang, W., Liu, M., Zhao, H., Berton, T.R., Johnson, D.G. and Brash, D.E. (2003) Inactivating E2f1 reverts apoptosis resistance and cancer sensitivity in Trp53-deficient mice, *Nat Cell Biol*, **5**, 655-660.
- Will, C.L. and Luhrmann, R. (1997) Protein functions in pre-mRNA splicing, *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 320-328.
- Williams, M.D. and Sandler, A.B. (2001) The epidemiology of lung cancer, *Cancer Treat Res*, **105**, 31-52.
- Wistuba, II, Behrens, C., Virmani, A.K., Mele, G., Milchgrub, S., Girard, L., Fondon, J.W., 3rd, Garner, H.R., McKay, B., Latif, F., Lerman, M.I., Lam, S., Gazdar, A.F. and Minna, J.D. (2000) High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints, *Cancer Res*, **60**, 1949-1960.
- Woods, K., Thomson, J.M. and Hammond, S.M. (2007) Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors, *J Biol Chem*, **282**, 2130-2134.
- Woolard, J., Wang, W.Y., Bevan, H.S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R.O., Cui, T.G., Sugiono, M., Waite, E., Perrin, R., Foster, R., Digby-Bell, J., Shields, J.D., Whittles, C.E., Mushens, R.E., Gillatt, D.A., Ziche, M., Harper, S.J. and Bates, D.O. (2004) VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression, *Cancer Res*, **64**, 7822-7835.
- Wu, J.Y. and Maniatis, T. (1993) Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing, *Cell*, **75**, 1061-1070.

Wu, X. and Levine, A.J. (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3602-3606.

X

Xi, L., Feber, A., Gupta, V., Wu, M., Bergemann, A.D., Landreneau, R.J., Litle, V.R., Pennathur, A., Luketich, J.D. and Godfrey, T.E. (2008) Whole genome exon arrays identify differential expression of alternatively spliced, cancer-related genes in lung cancer, *Nucleic Acids Res*, **36**, 6535-6547.

Xiao, R., Sun, Y., Ding, J.H., Lin, S., Rose, D.W., Rosenfeld, M.G., Fu, X.D. and Li, X. (2007) Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and cell proliferation during mammalian organogenesis, *Mol Cell Biol*, **27**, 5393-5402.

Xiao, S.H. and Manley, J.L. (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing, *Genes Dev*, **11**, 334-344.

Xiao, S.H. and Manley, J.L. (1998) Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2, *EMBO J*, **17**, 6359-6367.

Xie, W., Jiang, P., Miao, L., Zhao, Y., Zhimin, Z., Qing, L., Zhu, W.G. and Wu, M. (2006) Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1, *Nucleic Acids Res*, **34**, 2046-2055.

Xu, G., Livingston, D.M. and Krek, W. (1995) Multiple members of the E2F transcription factor family are the products

of oncogenes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1357-1361.

Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S. and Piwnica-Worms, H. (1994) Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation, *Mol Cell Biol*, **14**, 8420-8431.

Xu, Q. and Lee, C. (2003) Discovery of novel splice forms and functional analysis of cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences, *Nucleic Acids Res*, **31**, 5635-5643.

Y

Yamasaki, L., Bronson, R., Williams, B.O., Dyson, N.J., Harlow, E. and Jacks, T. (1998) Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice, *Nat Genet*, **18**, 360-364.

Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E. and Dyson, N.J. (1996) Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1, *Cell*, **85**, 537-548.

Yamazaki, K., Yajima, T., Nagao, T., Shinkawa, H., Kondo, F., Hanami, K., Asoh, A., Sugano, I. and Ishida, Y. (2003) Expression of transcription factor E2F-1 in pancreatic ductal carcinoma: an immunohistochemical study, *Pathol Res Pract*, **199**, 23-28.

Yang, X., Bani, M.R., Lu, S.J., Rowan, S., Ben-David, Y. and Chabot, B. (1994) The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6924-6928.

Yee, A.S., Reichel, R., Kovesdi, I. and Nevins, J.R. (1987) Promoter interaction of

the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex, *EMBO J*, **6**, 2061-2068.

Young, A.P., Nagarajan, R. and Longmore, G.D. (2003) Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway, *Oncogene*, **22**, 7209-7217.

Yun, C.Y. and Fu, X.D. (2000) Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol*, **150**, 707-718.

Yun, C.Y., Velazquez-Dones, A.L., Lyman, S.K. and Fu, X.D. (2003) Phosphorylation-dependent and -independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators, *J Biol Chem*, **278**, 18050-18055.

Z

Zachar, Z., Kramer, J. and Bingham, P.M. (1994) Looking at mRNA splicing and transport in situ, *Methods Cell Biol*, **44**, 599-611.

Zacharatos, P., Kotsinas, A., Evangelou, K., Karakaidos, P., Vassiliou, L.V., Rezaei, N., Kyroudi, A., Kittas, C., Patsouris, E., Papavassiliou, A.G. and Gorgoulis, V.G. (2004) Distinct expression patterns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas, *J Pathol*, **203**, 744-753.

Zahler, A.M., Neugebauer, K.M., Lane, W.S. and Roth, M.B. (1993) Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing, *Science*, **260**, 219-222.

Zerbe, L.K., Pino, I., Pio, R., Cosper, P.F., Dwyer-Nield, L.D., Meyer, A.M., Port, J.D., Montuenga, L.M. and Malkinson, A.M. (2004) Relative amounts of antagonistic splicing factors, hnRNP A1 and ASF/SF2, change during neoplastic lung growth: implications for pre-mRNA processing, *Mol Carcinog*, **41**, 187-196.

Zhang, G., Taneja, K.L., Singer, R.H. and Green, M.R. (1994) Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei, *Nature*, **372**, 809-812.

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, W.J. and Wu, J.Y. (1996) Functional properties of p54, a novel SR protein active in constitutive and alternative splicing, *Mol Cell Biol*, **16**, 5400-5408.

Zhang, Z. and Krainer, A.R. (2004) Involvement of SR proteins in mRNA surveillance, *Mol Cell*, **16**, 597-607.

Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepf, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Harper, J.W. and Pavletich, N.P. (2002) Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex, *Nature*, **416**, 703-709.

Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V.M. and Salvesen, G.S. (1997) Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases, *J Biol Chem*, **272**, 7797-7800.

Zhu, J.W., DeRyckere, D., Li, F.X., Wan, Y.Y. and DeGregori, J. (1999) A role for

E2F1 in the induction of ARF, p53, and apoptosis during thymic negative selection, *Cell Growth Differ*, **10**, 829-838.

Zhu, L. (2005) Tumour suppressor retinoblastoma protein Rb: a transcriptional regulator, *Eur J Cancer*, **41**, 2415-2427.

Ziebold, U., Reza, T., Caron, A. and Lees, J.A. (2001) E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos, *Genes Dev*, **15**, 386-391.

Zochbauer-Muller, S., Gazdar, A.F. and Minna, J.D. (2002) Molecular pathogenesis of lung cancer, *Annu Rev Physiol*, **64**, 681-708.

Zuo, P. and Manley, J.L. (1993) Functional domains of the human splicing factor ASF/SF2, *EMBO J*, **12**, 4727-4737.

ANNEXE

I. ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE E3 UBIQUITINE-LIGASE SKP2 ET CORRELATIONS AVEC L'EXPRESSION DES PROTEINES E2F1 ET CYCLINE E DANS LES TUMEURS PULMONAIRES

Au cours de ma thèse, j'ai contribué à cette étude en effectuant notamment les expériences identifiant SKP2 comme une nouvelle cible transcriptionnelles de E2F1.

a. Présentation de l'étude

La voie de la protéolyse médiée par le système ubiquitine-protéasome joue un rôle crucial dans le contrôle du niveau d'expression de certains facteurs dont l'activité doit être étroitement régulée, incluant les protéines du cycle cellulaire. La polyubiquitination d'un substrat a lieu en trois étapes qui font intervenir successivement trois enzymes distinctes: E1 pour l'activation, E2 pour la conjugaison et E3 pour la liaison de l'ubiquitine à son substrat. L'enzyme E3-ligase joue de plus un rôle important dans la reconnaissance spécifique du substrat. Le complexe protéique SKP1-CUL1-F-Box- (SCF) appartient à une vaste famille de protéines E3-ligases multimériques qui comportent trois composants communs : la protéine adaptatrice SKP1, la protéine de structure culline-1 (CUL-1) et la protéine à domaine « Ring Finger » Rbx1/Roc (Zheng, et al., 2002). Sur ce complexe multimérique constitutif vient se fixer une protéine variable, à domaine F-box, qui contrôle la spécificité du substrat du complexe SCF. La protéine SKP2 est l'une des sous-unités possibles de reconnaissance du substrat au sein du complexe multiprotéique de dégradation SCF E3-ligase. SKP2 entraîne la dégradation de multiples protéines régulatrices clés du cycle cellulaire, dont l'inhibiteur des cyclines/CDKs p27^{KIP1} ou les protéines cycline E et E2F1 (Nakayama and Nakayama, 2006). SKP2 se comporte ainsi comme un important régulateur de la progression dans les différentes phases du cycle cellulaire. Plus récemment, des propriétés oncogéniques de SKP2 « *in vitro* » et « *in vivo* » ont été caractérisées (Gstaiger, et al., 2001). En accord

avec cette activité oncogénique, la protéine SKP2 est surexprimée dans un grand nombre de tumeurs humaines (Nakayama and Nakayama, 2006).

Lors de notre analyse de l'expression de E2F1 dans les différents types histologiques de tumeurs pulmonaires, nous avons détecté un haut niveau des transcrits de E2F1 dans 75 % des carcinomes à petites cellules surexprimant la protéine alors que dans 25 % des cas restants, les niveaux d'expression des ARN messagers et de la protéine étaient discordants (Eymin, et al., 2001). Cette dissociation laissait suggérer que l'accumulation de E2F1 pourrait aussi être liée à un défaut de dégradation de la protéine. Partant sur la base, qu'à l'état physiologique, le niveau protéique de E2F1 est en partie régulé par sa protéolyse dépendante de la voie de l'ubiquitine-protéasome (Campanero and Flemington, 1997) et met en jeu SKP2, nous nous sommes posés la question d'une dérégulation potentielle de l'expression de SKP2 dans les tumeurs bronchiques, et avons tenté de rechercher un lien entre l'expression de E2F1 et SKP2 dans ces tumeurs. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse d'une corrélation inverse entre les deux facteurs, un bas niveau de SKP2 étant attendu dans les tumeurs neuroendocrines de haut grade et une surexpression dans les CBnPC. Pour cette étude, nous avons entrepris d'analyser l'expression protéique de SKP2 et E2F1 dans des échantillons tumoraux issus de 128 patients porteurs de CBnPC (21 adénocarcinomes, 29 carcinomes malpighiens) et de tumeurs à différenciation neuroendocrines (NE) (35 carcinomes à petites cellules, 19 carcinomes NE à grandes cellules, 10 carcinoïdes atypiques et 14 carcinoïdes typiques) par des méthodes semi-quantitatives immunohistochimiques et par western blot. De plus, nous avons approfondi l'étude des relations fonctionnelles existant entre ces deux facteurs de manière plus dynamique en utilisant des lignées cellulaires issues de carcinomes pulmonaires de types histologiques différents. Dans ces modèles, nous avons modulé l'expression protéique de SKP2 et E2F1, soit par des systèmes d'induction d'expression (transitoire ou stable), soit par neutralisation par la technique des petits ARN interférents (siRNA). Certaines expériences de cotransfections transitoires ont été réalisées dans des lignées cellulaires aisément transfectables (SaOS2). Nous avons obtenu des résultats inattendus.

Il existe en effet une corrélation directe très significative entre l'expression des protéines E2F1 et SKP2 dans les tumeurs à différenciation NE et une absence de

corrélation dans les CBnPC. De plus, un haut niveau d'expression de SKP2 est corrélé à un stade avancé de la maladie ainsi qu'à la présence de métastases ganglionnaires toujours dans les tumeurs NE de haut grade. Ces résultats indiquent que la surexpression de SKP2 participe à la progression des tumeurs neuroendocrines pulmonaires. Sur le plan moléculaire, nous avons identifié SKP2 comme une nouvelle cible transcriptionnelle de E2F1 dans les cellules carcinomateuses pulmonaires. De manière importante, nous avons aussi mis en évidence que SKP2 stimule l'activité transactivatrice de E2F1 sur le promoteur de la cycline E. Cette observation a été confortée « *in vivo* », dans notre série de tumeurs, où nous avons montré l'existence d'une étroite corrélation entre les trois facteurs protéines E2F1, SKP2 et cycline E dans les tumeurs neuroendocrines pulmonaires. Ces données ont permis de montrer que le profil différentiel d'expression de E2F1 détecté dans les tumeurs pulmonaires n'implique pas SKP2. De plus, elles mettent en évidence l'existence d'une interconnexion étroite entre les oncoprotéines E2F1, SKP2 et cycline-E, identifiant de nouveaux partenaires de E2F1.

b. Article

E2F1, SKP2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high grade neuroendocrine lung tumors. C.Salon, G. Merdzhanova, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Gazzeri and B. Eymin. *Oncogene*. 2007 Oct 18;26(48):6927-36. Epub 2007 Apr 30.

ORIGINAL ARTICLE

E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors

C Salon^{1,2}, G Merdzhanova^{1,2}, C Brambilla^{1,2}, E Brambilla^{1,2}, S Gazzeri^{1,2} and B Eymin^{1,2}¹Equipe Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Centre de Recherche INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble Cedex, France and ²Université Joseph Fourier, Grenoble Cedex, France

The transcription factor E2F-1 plays a crucial role in the control of cellular growth. We previously reported its differential pattern of expression in human lung tumors. In this study, we have investigated the relationships linking the status of E2F-1 and a mediator of its proteasomal degradation, the S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) F-box protein. Using immunohistochemistry in a series of 129 lung tumors of all histological types, we demonstrate that Skp2 accumulates preferentially in high-grade neuroendocrine (HGNE) lung carcinomas (86%, $P < 0.0001$), and show that Skp2 overexpression is associated with advanced stages ($P < 0.0001$) and nodal metastasis ($P < 0.0001$) in neuroendocrine (NE) lung tumors. Unexpectedly, we observe that Skp2 and E2F-1 expression directly correlates in NE lung tumors ($P < 0.0001$). Moreover, using cellular models, we identify Skp2 as a new E2F-1 transcriptional target. Furthermore, we also provide evidence that Skp2 interacts physiologically with E2F-1 and stimulates its transcriptional activity toward the cyclin E promoter. Consistently, we demonstrate that cyclin E expression directly correlates with Skp2 ($P < 0.0001$) and E2F-1 ($P = 0.0001$) status in NE lung tumors. Overall, our data provide the first evidence of a direct and functional interconnection between the E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins in HGNE lung carcinomas.

Oncogene (2007) 26, 6927–6936; doi:10.1038/sj.onc.1210499; published online 30 April 2007

Keywords: cyclin E; E2F-1; Skp2; lung tumors

Introduction

Bronchogenic carcinomas arise from the sequential accumulation of genetic and epigenetic abnormalities that affect various oncogene and tumor suppressor gene networks. In this respect, we have previously reported

the constant alteration of p53/Rb signaling pathways in lung tumors (Brambilla *et al.*, 1993, 1999; Gouyer *et al.*, 1998). E2F-1, the first-identified member of a family of transcription factors generically referred as E2F (DeGregori, 2002), is located at the interface of both p53/Rb pathways. E2F-1 is best known for its role in driving cell cycle progression, a process that is tightly regulated by its interaction with Rb (Harbour and Dean, 2000). Moreover, E2F-1 can also trigger p53-dependent or -independent apoptosis (Ginsberg, 2002). Aiming at identifying some components of the p53/Rb network that could contribute to lung carcinogenesis, we previously observed that E2F-1 is overexpressed in high-grade neuroendocrine (HGNE) lung tumors, whereas it is undetectable in a majority of non-small cell lung carcinoma (NSCLC) (Eymin *et al.*, 2001a). These results indicate that a deregulated E2F-1 activity contributes to lung tumorigenesis.

The ubiquitin/proteasome pathway plays a crucial role in the selective and temporally controlled elimination of key regulatory proteins. The conjugation of a polyubiquitin chain on substrates requires the sequential activity of three distinct enzymes including an ubiquitin–protein ligase E3 involved in substrate recognition. The SKP1-CUL1-F-box (SCF) protein complexes belong to a large family of multi-subunit E3 ligases that consist of three core components: (1) the adaptor protein SKP1; (2) the scaffold protein cullin-1 (CUL1) and (3) the RING-domain protein Rbx1/Roc (Zheng *et al.*, 2002). Their association with a variable F-box-containing protein determines the substrate specificity. Initially identified as a cyclin A/CDK2-interacting protein in transformed cells (Zhang *et al.*, 1995; Bai *et al.*, 1996), S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) is the substrate-recognition subunit of the SCF^{Skp2} E3 ligase complex. Through its capacity to target the proteasomal degradation of key regulators of the cell cycle such as the cyclin-cdk inhibitor p27^{Kip1} (Carrano *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 2004), the cyclin E (Yeh *et al.*, 2001) and the E2F-1 (Marti *et al.*, 1999) proteins, Skp2 is required for cell cycle progression at multiple stages (Carrano *et al.*, 1999; Deshaies, 1999; Zhang *et al.*, 1995; Nakayama *et al.*, 2004). Owing to this central role in the control of cell cycle regulatory proteins proteolysis, aberrant Skp2 expression is thought to exert oncogenic properties. Consistently, it has been shown that Skp2 cooperates with H-Ras in transforming primary rodent

Correspondence: Dr B Eymin, Equipe Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Centre de Recherche INSERM U823, Institut Albert Bonniot BP170, 38042 Grenoble Cedex 09, France.

E-mail: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr

Received 17 January 2007; revised 22 February 2007; accepted 29 March 2007; published online 30 April 2007

fibroblasts and in inducing tumor formation in nude mice (Gstaiger *et al.*, 2001). Furthermore, Skp2 expression is greatly enhanced in a broad spectrum of human tumors (Nakayama and Nakayama, 2006, for review). In this setting, it is currently thought that the oncogenic phenotype resulting from high Skp2 levels is mainly related to the proteasomal degradation of various Skp2 substrates.

Based on our data demonstrating a differential pattern of E2F-1 protein expression in human lung tumors (Eymin *et al.*, 2001a), we wondered whether some of the proteins involved in the control of E2F-1 proteolysis could be abnormally expressed in these tumors. In this context, the aim of this study was to investigate the relationships linking E2F-1 and its regulator Skp2 in lung cancer.

Results

Skp2 is overexpressed and associated with tumor progression in HGNE lung tumors

Skp2 expression was studied by immunohistochemistry (IHC) on a panel of 50 NSCLCs, 25 lung carcinoids and 54 HGNE lung carcinomas. Because Skp2 immunostaining was heterogeneous among lung tumors, differential scores were ascribed in each case according to the intensity of staining and the percentage of stained cells. Tumor samples were grouped in three classes as described in the 'Materials and methods' section. According to this, Skp2 was undetectable (class 0) in normal lung epithelium adjacent to tumor cells on sections, as well as in normal lung tissues localized at distance from lung cancer. As compared to these normal tissues, we observed a heterogeneous pattern of Skp2 expression with tumors exhibiting either undetectable (class 0), moderate (class 1) or strong (class 2)

immunostaining (Table 1, $P < 0.0001$). In this setting, overexpression of Skp2 was observed in 48% (62/129) of all tumors tested, predominantly in high-grade NE lung tumors (46/54, 85%) as compared to NSCLC (16/50, 32%) (Table 1 and Figure 1). Consistent with previous reports (Yokoi *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004), high levels of Skp2 were more frequent in squamous carcinomas (15/29, 51%) than in adenocarcinomas (1/21, 4%) ($P < 0.0001$). Moreover, Skp2 was undetectable in 25/25 (100%) atypical and typical lung carcinoids, whereas it was overexpressed in the majority of high-grade NE lung tumors, with SCLCs displaying higher levels (34/35, 97%) than large cell neuroendocrine carcinomas (LCNECs) (12/19, 63%) ($P = 0.003$). Therefore, these data indicate that Skp2 overexpression is associated with a high-grade phenotype in NE lung tumors. To validate these IHC data, 24 of the 129 tumoral samples were analysed for Skp2 expression by western blotting and a good concordance (88%) was observed between both techniques (data not shown).

Then, to characterize further the role of Skp2, we analysed the relationships between its IHC status and some clinicopathological parameters (Table 2). When all histological subtypes were considered, we observed that Skp2 overexpression was associated with advanced stages III–IV ($P < 0.0001$) and nodal metastasis ($P < 0.0001$). Similar correlations were observed in NE lung tumors ($P < 0.0001$) but not in NSCLCs.

The expression of Skp2 and E2F-1 is directly correlated in NE lung tumors

We previously reported a differential pattern of E2F-1 protein expression in a series of 60 lung tumors (Eymin *et al.*, 2001a). In this study, we have extended these results to a larger series and included atypical and typical carcinoids (Table 3 and Figure 2). Our data confirmed our previous results with E2F-1 protein being

Table 1 Immunohistochemical analysis of Skp2 expression in lung cancer according to histological type

Histological type	Skp2 expression level				P ^a
	NB	Class 0	Class 1	Class 2	
Adenocarcinoma	21	13	7	1	<0.0001 ^b
Squamous carcinoma	29	3	11	15	
Total NSCLC	50	16 (32%)	18 (36%)	16 (32%)	
Atypical carcinoid	10	10	0	0	0.003 ^c
Typical carcinoid	15	15	0	0	
Total carcinoids	25	25 (100%)	0	0	
LCNEC	19	3	4	12	<0.0001 ^d
Small cell carcinoma	35	1	0	34	
Total HGNE carcinoma	54	4 (7%)	4 (7%)	46 (85%)	
Total tumors	129	45 (35%)	22 (17%)	62 (48%)	

Abbreviations: HGNE, high-grade neuroendocrine; LCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma; NB, number of cases in each histological type; NSCLC, non-small cell lung carcinoma. Immunostaining scores were calculated by multiplying the number of labeled cells (0–100%) by the level of intensity (1–3). According to this, tumor samples were grouped into three classes (see 'Materials and methods' section): class 0 (undetectable staining), class 1 (moderate staining) and class 2 (high staining considered as Skp2 overexpression). ^a χ^2 test. ^bP represents the comparison of Skp2 expression level between adenocarcinoma and squamous carcinoma. ^cP represents the comparison of Skp2 protein level between LCNEC and SCLC. ^dP represents the comparison between each class of Skp2 expression level in all tumors tested.

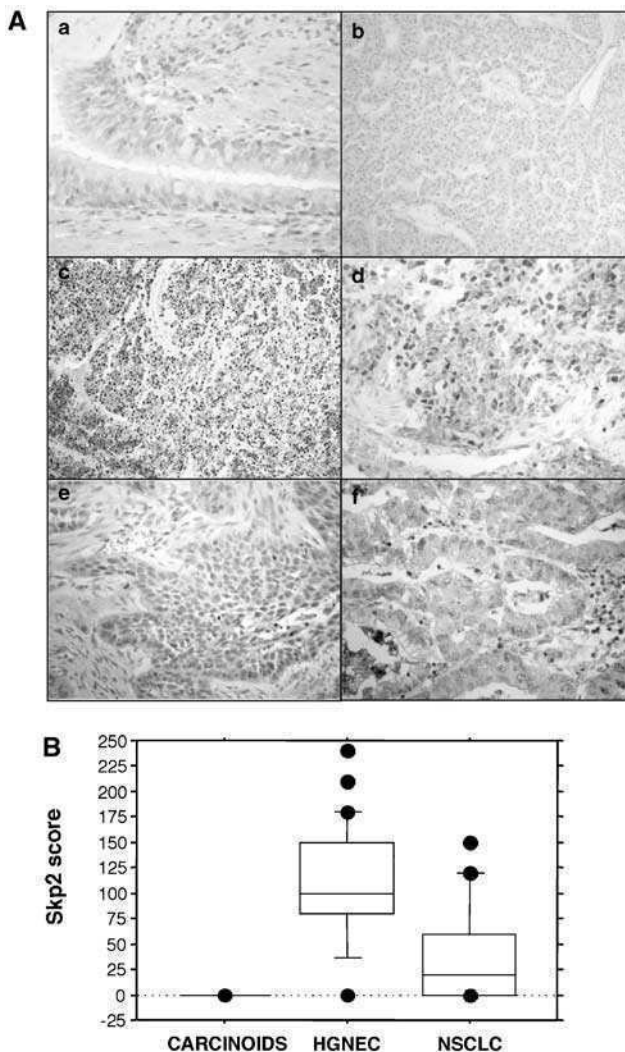


Figure 1 (A) Immunostaining of normal lung parenchyma and lung cancer tissue on paraffin-embedded sections using an anti-Skp2 monoclonal antibody (2C8D9, Zymed). (a) Absence of immunostaining in the columnar epithelium lining a normal bronchial structure (<1% of positive cells). (b) Negative immunostaining (class 0) in a typical carcinoid. (c and d) Strong positive nuclear immunostaining (class 2) on (c) most or (d) 50% of tumor cells in SCLCs. (e) Weak nuclear immunostaining (class 1) in a squamous cell carcinoma. (f) Negative immunostaining (class 0) in an adenocarcinoma. (B) Mean scores $\pm$ standard deviation of Skp2 protein expression according to the histological subtypes.

predominantly overexpressed in HGNE lung tumors (46/54, 86%), whereas it was undetectable or faintly expressed in 90% (45/50) of NSCLCs (Table 3). Importantly, high amounts of E2F-1 protein were associated with a high-grade NE phenotype as compared to carcinoids (Table 3; $P < 0.0001$ and Figure 2b).

When we analysed the status of both Skp2 and E2F-1 proteins, we found an unexpected direct correlation in all tumors tested (Table 4; $P < 0.0001$), as well as in NE lung tumors ($P < 0.0001$). In contrast, E2F-1 and Skp2 status was not linked in NSCLCs, but we noticed that 64% (32/50) of the cases did not express both proteins.

Skp2 is a transcriptional target of E2F-1

To investigate further the functional relationships between Skp2 and E2F-1 proteins, we undertook a series of experiments in cell lines. First, we postulated that Skp2 could be a new downstream target of E2F-1. To answer, we neutralized E2F-1 using siRNA in the small cell lung carcinoma (SCLC) cell line H69 and analysed Skp2 expression by immunoblotting and reverse transcription-PCR (RT-PCR). As shown in Figure 3a, the knockdown of E2F-1 was associated with a significant downregulation of both Skp2 protein (left panel) and mRNA levels (right panel). Furthermore, using a stable E2F-1 tetracycline-inducible clone (H358/Tet-On) that we previously established in the human lung adenocarcinoma cell line H358 (Salon *et al.*, 2006), we observed an increase in Skp2 mRNA (Figure 3b, right panel) and protein (Figure 3b, left panel) expression upon doxycyclin induction. Altogether, these data indicate that Skp2 expression is positively regulated by E2F-1. Then, we investigated whether E2F-1 was able to control *Skp2* promoter activity. A549 cells were transfected with a plasmid encoding the luciferase protein under the control of the human *Skp2* promoter, together with increasing amounts of an E2F-1 expression vector. Because of their low transfection efficiency, H69 cells could not be used here. As reflected by the increase in luciferase activity, E2F-1 was able to activate in a dose-dependent manner the *Skp2* promoter in these cells (Figure 3c, left panel). Similar results were obtained in the H1299 cell line (Figure 3c, right panel). Therefore, these data demonstrate that Skp2 is a transcriptional target of E2F-1. Interestingly, we noticed that the Skp2

Table 2 High levels of Skp2 correlate with advanced stages and nodal metastasis in NE lung carcinomas

	NB	Total tumors			NSCLC			NE carcinoma		
		Classes 0–1 ^a	Class 2 ^b	P ^c	Classes 0–1 ^a	Class 2 ^b	P ^c	Classes 0–1 ^a	Class 2 ^b	P ^c
Stage I–II	61	45	16		19	9		26	7	
Stage III–IV	68	22	46	<0.0001 ^d	15	7	NS ^d	7	39	<0.0001 ^d
N0	56	43	13		19	8		24	5	
N1–N3	73	24	49	<0.0001 ^e	15	8	NS ^e	9	41	<0.0001 ^e

Abbreviations: NB, number of cases; NE, neuroendocrine; NS, nonsignificant; NSCLC, non-small cell lung carcinoma. ^aUndetectable or low level of Skp2 staining. ^bStrong Skp2 staining considered as Skp2-overexpressing cases. ^c χ^2 test. ^dP represents the comparison of Skp2 classes of expression between low stages and high stages in all tumors, NSCLC or NE carcinoma. ^eP represents the comparison of Skp2 protein expression between tumors with (N1–N3) or without (N0) nodal metastasis in all tumors, NSCLC or NE carcinoma.

promoter response to E2F-1 increasing levels was stronger in H1299 cells deriving from a large cell carcinoma with NE features than in A549 adenocarcinoma cells. These data were consistent with our findings of a direct correlation between E2F-1 and Skp2 in NE lung tumors.

Skp2 interacts with and stimulates the transcriptional activity of E2F-1

It was previously demonstrated that Skp2 interacts with and acts as a transcriptional cofactor of c-Myc (Kim *et al.*, 2003; Von der Lehr *et al.*, 2003). These data prompted us to investigate whether Skp2 could also regulate E2F-1 transcriptional activity. First, we tested the possibility that E2F-1 and Skp2 could physiologically interact in our cellular models. As illustrated, E2F-1 was clearly recovered from Skp2 immunoprecipitates obtained from H69 (Figure 4a) or H810 (data not

shown) NE lung carcinoma cell lines. More importantly, an E2F-1/Skp2 complex was also detected in cellular extracts obtained from three SCLCs with high levels of both proteins (Figure 4b). Altogether, these data demonstrate that Skp2 interacts with E2F-1 in HGNE human lung cell lines as well as in primary tumors.

Table 3 Immunohistochemical analysis of E2F-1 expression in lung cancer according to histological type

Histological type	E2F-1 expression level			
	NB	Class 0 ^a	Class 1 ^b	P ^c
Adenocarcinoma	21	19	2	
Squamous carcinoma	29	26	3	
Total NSCLC	50	45 (90%)	5 (10%)	
Atypical carcinoid	10	8	2	
Typical carcinoid	14	12	2	
Total carcinoids	24	20 (83%)	4 (17%)	
LCNEC	19	6	13	$P < 0.0001^d$
Small cell carcinoma	35	2	33	
Total HGNE carcinoma	54	8 (14%)	46 (86%)	
Total tumors	128	73 (57%)	55 (43%)	

Abbreviations: HGNE, high-grade neuroendocrine; LCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma; NB, number of cases in each histological type; NSCLC, non-small cell lung carcinoma. Tumors were grouped into two classes according to their score of E2F-1 staining. ^aTumors with undetectable or low level of E2F-1 staining. ^bTumors with high level of E2F-1 staining, considered as overexpressing cases. ^c χ^2 test. ^d P represents the comparison of E2F-1 expression level between total carcinoids and total HGNE carcinoma.

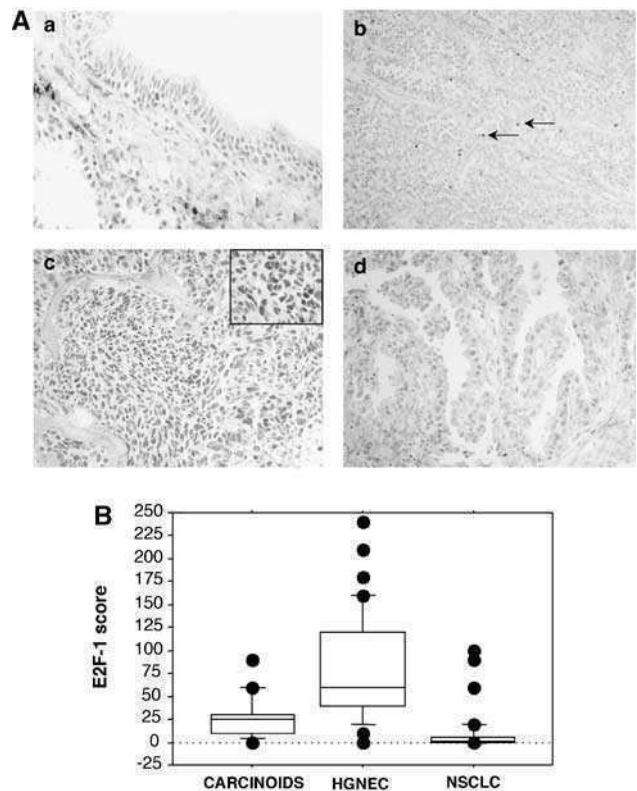


Figure 2 (A) Immunostaining of normal lung parenchyma and lung cancer tissue on paraffin-embedded sections using an anti-E2F-1 monoclonal antibody (KH95, Pharmingen). (a) Absence of immunostaining in hyperplastic bronchiolar cells. (b) Weak positive immunostaining (class 1) in an atypical carcinoid consisting in few scattered positive cells (arrow). (c) Strong positive nuclear staining (class 2) detected on at least 50% of tumor cells in an SCLC. (d) Negative immunostaining (class 0) in an adenocarcinoma. (B) Mean scores $\pm$ standard deviation of E2F-1 protein expression according to the histological subtypes.

Table 4 Skp2 and E2F1 expression is directly correlated in NE lung carcinomas

Histological types	NB	Skp2 expression level				P ^c
		Classes 0–I ^a		Class 2 ^b		
		E2F1 + ^d	E2F1 – ^e	E2F1 + ^d	E2F1 – ^e	
NSCLC	50	2 (4%)	32 (64%)	2 (4%)	14 (28%)	NS
NE carcinoma	78	7 (9%)	25 (32%)	43 (55%)	3 (4%)	<0.0001
Total tumors	128	9 (7%)	57 (45%)	45 (35%)	17 (13%)	<0.0001

Abbreviations: NB, number of tumoral samples; NE, neuroendocrine; NS, nonsignificant; NSCLC, non-small cell lung carcinoma. ^aUndetectable or low level of Skp2 staining. ^bHigh levels of Skp2 staining and considered as Skp2-overexpressing cases. ^c χ^2 test. ^dE2F1 +, tumors overexpressing E2F1. ^eE2F1 –, cases without E2F1 overexpression.

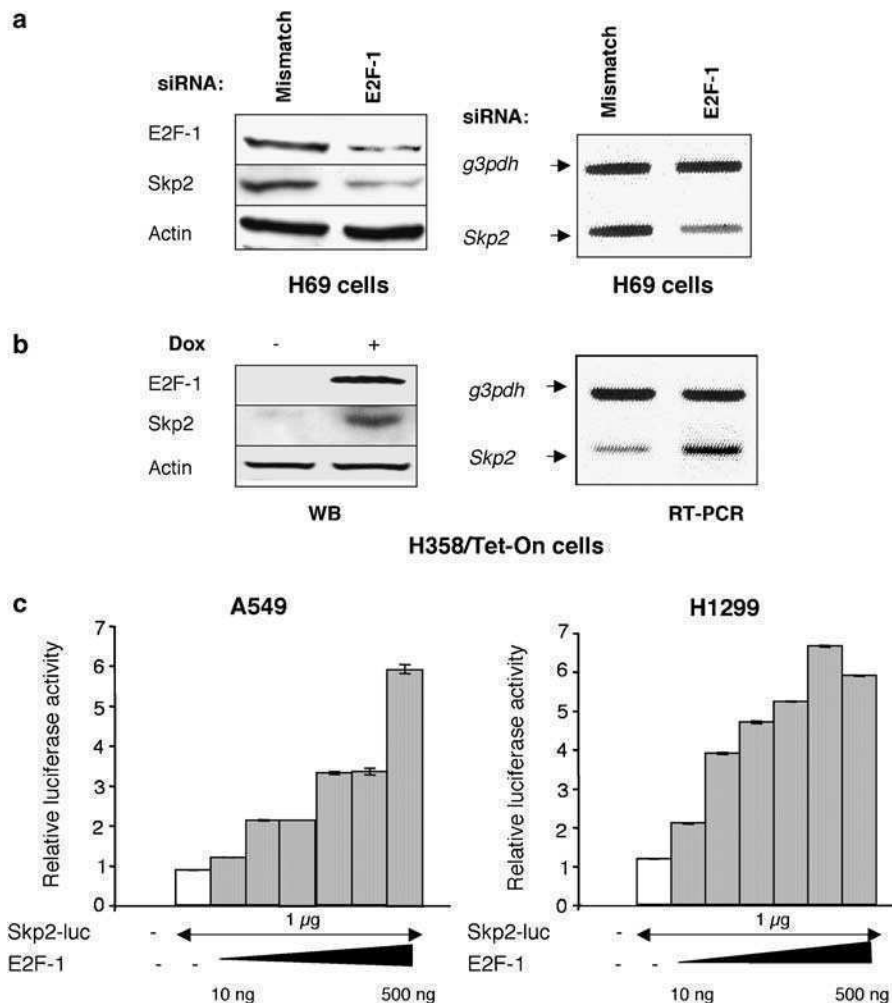


Figure 3 Skp2 is a transcriptional target of E2F-1. (a) The SCLC cell line H69 was transfected with either mismatch or *E2F-1* siRNA as indicated. Skp2 protein and mRNA levels were detected by immunoblotting (left panel) or RT-PCR (right panel), respectively. (b) H358 stable *E2F-1*-inducible clones were incubated in the presence (+) or absence (–) of 1 μ g/ml doxycycline for 72 h as indicated. E2F-1 and Skp2 protein expression were detected by immunoblotting (left panel). Skp2 mRNA level was analysed by RT-PCR (right panel). (c) A549 lung adenocarcinoma and H1299 large cell lung carcinoma cell lines were cotransfected for 48 h with 1 μ g of a Skp2-luc plasmid encoding the luciferase under the control of the Skp2 promoter and increasing amounts of a pCMV-E2F-1 vector. The luciferase activity obtained in cells transfected with Skp2-luc alone was normalized to 1 and a relative luciferase activity was then calculated for each condition.

Then, we asked whether Skp2 could regulate E2F-1 transcriptional activity. To answer, A549 cells were transfected with plasmids encoding the luciferase under the control of cyclin E promoter, a well-known E2F-1 target gene (Soucek *et al.*, 1997), E2F-1 and increasing amounts of Skp2. As reflected by the increase in luciferase levels, the cyclin E promoter was activated upon E2F-1 expression (Figure 4c). Importantly, the addition of Skp2 stimulated in a dose-dependent manner the transcriptional activity of E2F-1 in this setting (Figure 4c). In contrast, Skp2 alone was unable to promote cyclin E activation, nor to stimulate the activity of a control pGLuc vector (Figure 4c). Taken together, these results indicate that Skp2 stimulates the transcriptional activity of E2F-1. Similar results were obtained in H1299 cells as well as in another cellular model, the human osteosarcoma cell line SAOS2 (Figure 3d).

Relationships between Skp2, E2F-1 and cyclin E status in human lung tumors

The above results led us to examine whether Skp2, E2F-1 and cyclin E expression was linked in human lung tumors. First, we analysed the status of the cyclin E protein in our series of lung tumors (Table 5 and Figure 5). As compared to normal lung tissues in which immunostaining was not detectable (Figure 5A,a), we observed a heterogeneous pattern of cyclin E expression with tumors exhibiting either undetectable (class 0), moderate (class 1) or strong (class 2) immunostaining (Table 5, $P < 0.0001$). Interestingly, we noticed that cyclin E was undetectable in 100% of carcinoids, whereas high levels were observed in 21% (4/19) of LCNEC and 71% of SCLC (25/35) (Table 5, $P = 0.001$). In addition, a strong cyclin E immunostaining was associated with advanced stages III–IV ($P < 0.0001$) and

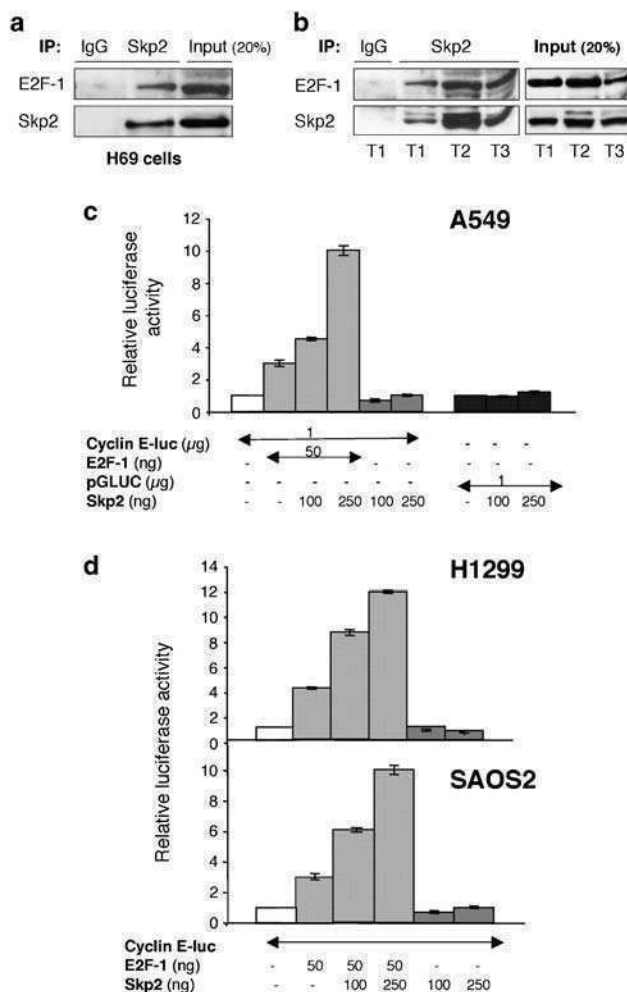


Figure 4 Skp2 interacts with E2F-1 and stimulates its transcriptional function toward the cyclin E promoter. (a and b) Endogenous Skp2 protein was immunoprecipitated from (a) H69 or (b) SCLC extracts (T1, T2 and T3) with an anti-Skp2 antibody. Immunoblotting was carried out with an anti-E2F-1 antibody. An irrelevant IgG was used as a negative control for immunoprecipitation. (c and d) Luciferase experiments were performed in A549, H1299 and SAOS2 cell lines cotransfected for 48 h with 1 μg pGL2-cyclin E encoding the luciferase under the control of the cyclin E promoter or 1 μg pGL2 as a control, in the presence or absence of 50 ng pCMV-E2F-1 and increasing amounts of pcDNA3-Myc-p45^{Skp2} (100 and 250 ng), as indicated. The luciferase activity obtained in cells transfected with pGL2-cyclin E or pGL2 was normalized to 1 and a relative luciferase activity was then calculated for each condition.

nodal metastasis ($P < 0.0001$) in these tumors (data not shown). Thus, as for Skp2 and E2F-1, accumulation of cyclin E appears to be a hallmark of a high-grade phenotype in NE lung tumors.

Then, we studied the relationships linking Skp2, E2F-1 and cyclin E proteins in our series of lung tumors. As shown in Table 6, we found a direct correlation between cyclin E and Skp2 ($P < 0.0001$) or E2F-1 ($P = 0.0001$) expression in NE lung tumors. In contrast, no significant correlation was found in NSCLC. Furthermore, the expression profile of the three proteins was associated (either undetectable or overexpressed) in 56% (71/126)

of all tumors tested, more frequently in NE tumors (66%) as compared to NSCLC (40%) (Supplementary Table 1, $P = 0.006$).

Discussion

The Skp2 protein, one of the F-box protein of the E3-ubiquitin ligase SCF complexes, targets a variety of cell cycle regulators for proteasomal degradation (Nakayama and Nakayama, 2006, for review). In this respect, Skp2 acts as a growth promoter deregulation of which is thought to exert oncogenic functions. The *Skp2* gene is located at 5p13, a region that is commonly amplified in lung cancer. Consequently, *Skp2* amplification and overexpression have been reported in NSCLC cell lines and primary tumors (Yokoi *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004; Takanami, 2005). In contrast, Skp2 status has been poorly investigated in NE lung tumors (Yokoi *et al.*, 2002). In agreement with previous studies, we report that Skp2 is overexpressed in 32% of NSCLC, especially in squamous carcinomas. More importantly, we demonstrate for the first time that HGNE lung tumors display a more frequent Skp2 upregulation (46/54; 86%) than NSCLC ($P < 0.0001$), and that Skp2 protein expression is undetectable in low-grade NE typical and atypical carcinoids. Elevated expression of Skp2 was previously linked to positive lymph node metastasis, advanced stages and poor or moderate differentiation in NSCLC (Yokoi *et al.*, 2004). In addition, a high level of Skp2 protein was also reported as an independent poor prognostic marker (Osoegawa *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004). In this study, we did not find any correlation between Skp2 overexpression and either of these clinicopathological parameters in NSCLC. In contrast, we observe that high levels of Skp2 expression are associated with advanced stages (III–IV) and nodal metastasis in NE lung tumors. Overall, our data support the notion that overexpressed Skp2 acts as an oncogenic protein in HGNE lung tumors.

It is currently thought that the oncogenic properties of Skp2 are related to its ability to induce the ubiquitination and proteasomal degradation of its cell cycle targets (Nakayama and Nakayama, 2006, for review). Therefore, based on our previous demonstration of an altered pattern of E2F-1 expression in human lung cancer (Eymin *et al.*, 2001a), we had hypothesized that the status of E2F-1 and Skp2 proteins could be inversely related in these tumors. In this study, we did not observe any significant correlation between both proteins in NSCLC. In contrast and unexpectedly, Skp2 and E2F-1 status was directly correlated in NE lung tumors, with a predominant upregulation of both proteins in HGNE lung tumors (78% of the cases). In addition, a direct correlation between Skp2 and cyclin E ($P < 0.0001$, this study) or p27^{Kip1} ($P = 0.006$; data not shown), another target of Skp2-mediated proteolysis (Carrano *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 2004), was also observed in these carcinomas. Taken together, these results clearly demonstrate that overexpression of Skp2 does not always correlate with the downregulation of its

Table 5 Immunohistochemical analysis of cyclin E expression in lung cancer according to histological type

Histological type	Cyclin E expression level				P ^b
	NB	Class 0 ^a	Class 1 ^a	Class 2 ^a	
Adenocarcinoma	21	9	4	8	0.07 (NS)
Squamous carcinoma	28	4	6	18	
Total NSCLC	49	13 (27%)	10 (20%)	26 (53%)	
Atypical carcinoid	10	10	0	0	NS
Typical carcinoid	15	15	0	0	
Total carcinoids	25	25 (100%)	0	0	
LCNEC	19	7	8	4	0.001
Small cell carcinoma	35	4	6	25	
Total HGNE carcinoma	54	11 (20%)	14 (26%)	29 (54%)	
Total tumors	128	49 (38%)	24 (19%)	55 (43%)	<0.0001

Abbreviations: HGNE, high-grade neuroendocrine; LCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma; NB, number of cases in each histological type; NS, nonsignificant; NSCLC, non-small cell lung carcinoma. Tumors were grouped in three classes according to their score of cyclin E staining. ^aClass 0 (undetectable staining), class 1 (moderate staining) and class 2 (high staining considered as overexpressing cases). ^b χ^2 test.

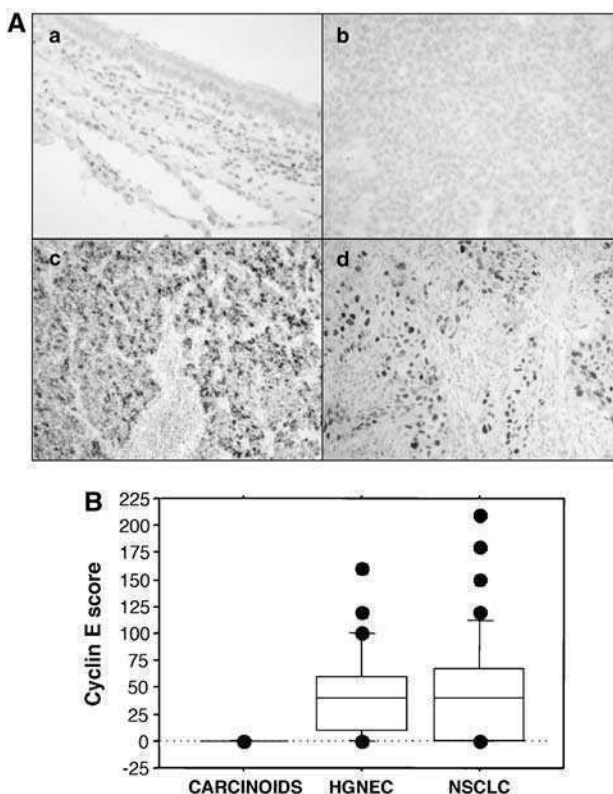


Figure 5 (A) Immunostaining of lung cancer tissues on paraffin-embedded sections using a monoclonal anti-cyclin E antibody. (a) Absence of staining in epithelial cells lining a bronchiolar structure and in pneumonocytes. (b) Negative immunostaining (class 0) in a typical carcinoid. (c) Strong positive nuclear staining (class 2) on a majority of tumor cells in an SCLC. (d) Strong positive nuclear staining (class 2) detected on most tumor cells in a squamous cell carcinoma. (B) Mean scores $\pm$ standard deviation of cyclin E protein expression according to the histological subtypes.

main targets in tumors. What might be the potential explanations for such observation? One plausible hypothesis is that the activity of SCF^{Skp2} complexes is

altered in HGNE lung tumors, maybe due to mutations or loss of expression of either SCF members. This could explain the concomitant expression of Skp2, E2F-1 and cyclin E proteins in these tumors. It remains to determine whether alterations of other SCF components exist in human lung tumors. In addition, our results suggest that Skp2 overexpression might have proteasomal-independent functions. Another but not exclusive explanation is the existence of a positive loop linking E2F-1 and Skp2 protein expression. In agreement with such hypothesis, we provide evidence that Skp2 is a transcriptional target of E2F-1. Interestingly, in a gene expression profiling analysis, Vernell *et al.* (2003) had observed that Skp2 expression is upregulated in response to E2F-1. Furthermore, during the course of our study, it was demonstrated that E2F-1 directly interacts with the human *Skp2* promoter and positively regulates its activity in various cellular models (Zhang and Wang, 2006). Therefore, our demonstration of a direct correlation between E2F-1 and Skp2 in HGNE lung tumors provides a physiological relevance to the observations made in cell lines.

Finally, how could Skp2 and E2F-1 overexpression contribute to the development of HGNE lung tumors? We demonstrate that endogenous Skp2 and E2F-1 proteins interact in HGNE lung carcinoma cell lines and identify for the first time an Skp2/E2F-1 complex in SCLCs. Moreover, using various cellular models, we show that Skp2 stimulates the transcriptional activity of E2F-1 toward the cyclin E promoter and identify a direct relationship linking cyclin E with Skp2 ($P < 0.0001$) and E2F-1 ($P = 0.0001$) proteins in NE lung tumors. Interestingly, 93% (27/29) of the tumors overexpressing the three proteins were HGNE lung tumors, indicating that their concomitant upregulation is highly predictive of a high-grade NE phenotype. Therefore, besides its ability to induce cyclin E proteasomal degradation (Nakayama *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 2001), Skp2 could also induce cyclin E expression, notably through E2F-1 activation. Such differential

Table 6 Direct correlation between cyclin E and Skp2 or E2F1 immunostaining in NE lung carcinomas

<i>Histological type</i>	<i>NB</i>	<i>Skp2 expression level</i>				<i>P</i> ^c
		<i>Classes 0–1^a</i>		<i>Class 2^b</i>		
		<i>Cyclin E</i> + ^d	<i>Cyclin E</i> – ^e	<i>Cyclin E</i> + ^d	<i>Cyclin E</i> – ^e	
NSCLC	49	15	18	11	5	NS
NE carcinoma	79	1	32	28	18	<0.0001
<i>Histological types</i>	<i>NB</i>	<i>E2F-1 expression level</i>				<i>P</i> ^c
		<i>Tumors without E2F-1 overexpression^f</i>		<i>Tumors with E2F-1 overexpression^g</i>		
		<i>Cyclin E</i> + ^d	<i>Cyclin E</i> – ^e	<i>Cyclin E</i> + ^d	<i>Cyclin E</i> – ^e	
NSCLC	49	22	23	4	0	NS
NE carcinoma	78	2	26	27	23	0.0001

Abbreviations: NB, number of tumoral samples; NE, neuroendocrine; NS, nonsignificant; NSCLC, non-small cell lung carcinoma. ^aTumors with an undetectable or moderate Skp2 immunostaining. ^bSkp2-overexpressing tumors. ^c χ^2 test. ^dCyclin E+, tumors overexpressing cyclin E using immunohistochemistry. ^eCyclin E–, cases without cyclin E overexpression. ^fTumors with undetectable or low level of E2F-1 immunostaining. ^gTumors overexpressing E2F-1.

Skp2-mediated cyclin E control could depend on the cellular context (normal versus tumoral tissues) and/or on the coactivated signals (E2F-1 upregulation).

To conclude, our data provide the first evidence of a direct correlation linking the E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins in HGNE lung tumors and suggest that their cooperation might contribute to the tumorigenesis of these highly aggressive lung carcinomas.

Materials and methods

Tissue samples

One hundred and twenty-nine human lung tumors were included in this study. Tissue samples were taken at surgical resection of lung tumors in 103 cases or at mediastinoscopy of node metastases in five cases of LCNECs and 21 cases of SCLCs. Tumor tissues and normal lung parenchyma were immediately frozen and stored at -80°C until use. For histological classification, tumor samples were fixed in formalin and the diagnoses were made on paraffin-embedded material using the current World Health Organization International Histological Classification of Lung Tumors criteria (Travis *et al.*, 1999). They consisted of 29 squamous cell carcinomas, 21 adenocarcinomas, 19 LCNECs and 35 SCLCs, 15 typical carcinoids and 10 atypical carcinoids. Sixty-three patients were suffering from nodal metastasis at the time of diagnosis.

Immunohistochemistry

Skp2 and cyclin E immunohistochemical analyses were carried out on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections. Four-micrometer sections were dehydrated in xylene and rehydrated in graded ethanol solutions. Endogenous peroxidase activity was blocked by immersion in H_2O_2 solution. For Skp2, the antigen immunoreactivity was enhanced by microwave the sections for 3×5 min in ethylenediaminetetraacetic acid buffer, pH 8. Then, a classical three-step immunohistochemical method was applied. The primary antibody (clone 2C8D9) was used at a 1:100 dilution. Cyclin E immunodetection was performed using the Ventana Discovery Autostainer

(Ventana Medical International Inc., Illkirch, France). Cut sections were boiled for 60 min in citrate buffer (pH 6) for heat-induced epitope retrieval. The primary antibody (clone 13A3) was applied at a 1:10 dilution for 1 h. E2F-1 protein expression was detected on frozen sections using the KH95 monoclonal antibody diluted at 1:100, as previously described (Eymin *et al.*, 2001a). Slides incubation with normal rabbit or mouse IgG at the same concentration as the primary antibodies served as negative controls.

Immunohistochemical staining evaluation

Skp2, E2F-1 and cyclin E immunostainings were evaluated by two independent observers (CS and EB) in distinct areas of the slide sections for correlation and confirmation of tissues analysis and scored by taking into account the tumor heterogeneity. A final score (0–300) was established by multiplying the percentage of labeled cells (0–100%) with the intensity of staining (1+, 2+, 3+). According to the final scores, tumoral samples were divided in three classes as follow: (1) class 0, no staining; (2) class 1, score < 60 for Skp2 or < 40 for cyclin E and E2F-1; (3) class 2, score ≥ 60 for Skp2 or ≥ 40 for cyclin E and E2F-1. Samples with a final score ≥ 60 were considered as tumors overexpressing Skp2. Cyclin E and E2F-1 overexpressing cases displayed a final score ≥ 40 . Stromal cells and background normal lung were negative for all the three tested proteins. Correlations between the expression of various factors and clinicopathological parameters were based on the χ^2 test, with a P -value ≤ 0.05 considered significative.

Cell lines, plasmids, siRNA and transfection

The A549 human lung adenocarcinoma, H1299 human large cell lung carcinoma with NE features and SAOS2 human osteosarcoma cell lines were cultured as previously described (Eymin *et al.*, 2001b). The H69 SCLC cell line was cultured in 5% CO_2 at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 2.5 mg/ml glucose, 10 mM HEPES and 1 mM sodium pyruvate. The H358/Tet-On/E2F-1 inducible clones were obtained as previously described (Salon *et al.*, 2006). Plasmids used were pcDNA3.1, pCMV-E2F-1, pGL2-cyclin E encoding the luciferase protein under the control of the cyclin E promoter, pcDNA3-Myc-Skp2 and Skp2-luc encoding the luciferase under the control of the

human *Skp2* promoter region spanning from -272 to +244 residues. Luciferase assays were performed as previously described (Eymin *et al.*, 2001b). The sequences specifically targeting human *e2f-1* RNA were 5'-GUCACGCUAUGAGA CCUCATT-3' and 5'-ACAAGGCCCGAUCGAUGUUT T-3'. The scrambled siRNA oligonucleotides were 5'-AAAG GUGACGCUGACGAAGTT-3' and 5'-CAAGAAAGGCCA GUCCAAGTT-3'. Cells were transiently transfected either with Eugene 6 (Roche Diagnostic, Meylan, France) or JetSI (Polyplus transfection, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France).

Immunoblotting and immunoprecipitation experiments

Immunoblotting and immunoprecipitation experiments were performed as previously described (Eymin *et al.*, 2001a). The antibodies were anti-actin (Sigma, St Louis, MO, USA), anti-E2F-1 (C-20, Santa Cruz, Tebu, Le Perray en Yvelines, France; KH-95, Pharmingen, BD Biosciences, Erenbodegen, Belgium), anti-cyclin E (13A3, Novocastra, Tebu, Le Perray en Yvelines, France) and anti-Skp2 antibodies (Skp2-2B12 and 2C8D9, Zymed, Clinisciences, Montrouge, France; H-435, Santa-Cruz).

References

Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW *et al.* (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**: 263–274.

Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Caron de Fromentel C, Gouyer V, Jacrot M *et al.* (1993). Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinomas. *Am J Pathol* **143**: 199–210.

Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C. (1999). Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol* **188**: 351–360.

Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* **1**: 193–199.

DeGregori J. (2002). The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta* **1602**: 131–150.

Deshaies RJ. (1999). SCF and cullin/ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 435–467.

Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. (2001a). Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene* **20**: 1678–1687.

Eymin B, Karayan L, Seite P, Brambilla C, Brambilla E, Larsen CJ *et al.* (2001b). Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. *Oncogene* **20**: 1033–1041.

Ginsberg D. (2002). E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Lett* **529**: 122–125.

Gouyer V, Gazzeri S, Bolon I, Drevet C, Brambilla C, Brambilla E. (1998). Mechanism of retinoblastoma gene inactivation in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**: 1–9.

Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J *et al.* (2001). Skp2 is oncogenic and over-expressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5043–5048.

Harbour JW, Dean DC. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**: 2393–2409.

RT-PCR analysis of Skp2 mRNA level

PCR was carried out for 30 cycles using the following conditions: 94°C for 30 s; 57°C for 30 s and 72°C for 30 s. The primers used were: Skp2 forward (sense) 5'-TCAACT ACCTCCAACACCTATCAC-3'; Skp2 reverse (antisense) 5'-GACAACTGGGCTTTTGCAGT-3'. Amplification of a fragment of the cDNA of G3PDH (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was performed in the same PCR as an internal control.

Acknowledgements

We thank Kristian Helin for providing us with the plasmid encoding E2F-1, Didier Trouche for the plasmid pGL2-cyclin E, Lars-Gunnar Larsson for the pcDNA3-Myc-Skp2 and Günter Schneider (Technical University of Munich, Munich, Germany) for the plasmid Skp2-luc. We thank Patricia Betton, Pascal Perron, Sylvie Veyrenc and Aurelie Micoud for technical assistance. This work was supported by grants from the Region Rhône Alpes (Thématique Prioritaire Cancer and Canceropole 2003: Oncocell, Epimed and INACancer) and by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée). CS was supported by a 'poste accueil' INSERM.

Kim SY, Herbst A, Tworkowski KA, Salghetti SE, Tansey WP. (2003). Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol Cell* **11**: 1177–1188.

Marti A, Wirbelauer C, Scheffner M, Krek W. (1999). Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat Cell Biol* **1**: 14–19.

Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K *et al.* (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J* **19**: 2069–2081.

Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Miyake S, Ishida N, Hatakeyama S *et al.* (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* **6**: 661–672.

Nakayama KI, Nakayama K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 369–381.

Osoegawa A, Yoshino I, Tanaka S, Sugio K, Kameyama T, Yamaguchi M *et al.* (2004). Regulation of p27 by S-phase kinase-associated protein 2 is associated with aggressiveness in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **22**: 4165–4173.

Salon C, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C *et al.* (2006). E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* **13**: 260–272.

Soucek T, Pusch O, Hengstschrager-Ottner E, Adams PD, Hengstschrager M. (1997). Deregulated expression of E2F-1 induces cyclin A- and E-associated kinase activities independently from cell cycle position. *Oncogene* **14**: 2251–2257.

Takanami I. (2005). The prognostic value of overexpression of Skp2 mRNA in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* **13**: 727–731.

Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E. (1999). *WHO International Histological Classification of Tumours: Histological Typing of Lung and Pleural Tumours*, 3rd edn. Springer: Berlin, Germany.

- Vernell R, Helin K, Muller H. (2003). Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *J Biol Chem* **278**: 46124–46137.
- Von der Lehr N, Johansson S, Wu S, Bahram F, Castell A, Cetinkaya C *et al.* (2003). The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol Cell* **11**: 1189–1200.
- Yeh KH, Kondo T, Zheng J, Tsvetkov LM, Blair J, Zhang H. (2001). The F-box protein SKP2 binds to the phosphorylated threonine 380 in cyclin E and regulates ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 884–890.
- Yokoi S, Yasui K, Mori M, Iizasa T, Fujisawa T, Inazawa J. (2004). Amplification and overexpression of SKP2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancers to lymph nodes. *Am J Pathol* **165**: 175–180.
- Yokoi S, Yasui K, Saito-Ohara F, Koshikawa K, Iizasa T, Fujisawa T *et al.* (2002). A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers. *Am J Pathol* **161**: 207–216.
- Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D. (1995). p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* **82**: 915–925.
- Zhang L, Wang C. (2006). F-box protein Skp2: a novel transcriptional target of E2F. *Oncogene* **25**: 2615–2627.
- Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P *et al.* (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**: 703–709.
- Zhu CQ, Blackhall FH, Pintilie M, Iyengar P, Liu N, Ho J *et al.* (2004). Skp2 gene copy number aberrations are common in non-small cell lung carcinoma, and its overexpression in tumors with ras mutation is a poor prognostic marker. *Clin Cancer Res* **10**: 1984–1991.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>).