



HAL
open science

Fonction des protéines BTG/TOB dans la désadénylation des ARN messagers eucaryotes

Benjamin Stupfler

► **To cite this version:**

Benjamin Stupfler. Fonction des protéines BTG/TOB dans la désadénylation des ARN messagers eucaryotes. Cancer. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ079 . tel-01587756

HAL Id: tel-01587756

<https://theses.hal.science/tel-01587756>

Submitted on 14 Sep 2017

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

THÈSE présentée par :
Benjamin STUPFLER

soutenue le : 21 octobre 2016

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**FONCTION DES PROTÉINES BTG/TOB
DANS LA DÉSADÉNYLATION DES ARN
MESSAGERS EUCARYOTES**

THÈSE dirigée par :

Dr. SERAPHIN Bertrand

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. WEIL Dominique

Directrice de recherche, Université Pierre et Marie Curie

Dr. LEBRETON-MANSUY Alice

Chargée de recherche, École Normale Supérieure

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. GIEGE Philippe

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

Dr. ROUAULT Jean-Pierre

Chargé de recherche, Faculté de Médecine Lyon-Sud

Dr. MAUXION Fabienne

Chargée de recherche, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS :

En premier lieu, j'aimerais remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie le Dr Dominique WEIL et le Dr Alice LEBRETON-MANSUY pour s'être intéressées à mon travail et pour avoir accepté d'être rapporteurs. Je remercie également les Dr Philippe GIEGE et Jean-Pierre ROUAULT d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse afin d'examiner mes travaux.

Mes remerciements vont évidemment à mon directeur de thèse, le Dr Bertrand SERAPHIN, qui m'a permis d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire. Je vous remercie d'avoir su rester disponible lorsque j'avais besoin de votre aide, d'avoir été patient et toujours d'une grande rigueur lors de nos échanges intellectuels. J'ai beaucoup appris à vos côtés.

Je souhaite également remercier le CERBM pour avoir financé mes trois années de thèse, ainsi que Paulo ALVES et Francine DENIER pour s'être occupés des doctorants dans le cadre du *PhD programme*. Merci également à tous les intervenants ayant assuré les cours proposés par le *PhD programme*. Je tiens également à remercier Nicolas LE MAY et Dominique GAGLIARDI pour avoir accepté de faire partie de mon jury de mi-thèse.

Je souhaite tout particulièrement remercier Fabienne MAUXION qui m'a encadré pendant ma thèse. Grâce à vous j'ai le sentiment d'avoir beaucoup progressé et d'avoir énormément appris, tant d'un point de vue intellectuel que pratique. Vous m'avez notamment permis d'aiguiser mon sens critique et d'appréhender d'une manière plus rigoureuse et méthodique les problématiques inhérentes au métier de chercheur. Je vous en suis très reconnaissant et ce fut un réel plaisir de travailler avec vous durant ces trois dernières années.

Je tiens également à remercier les autres membres du laboratoire avec qui j'ai pu travailler durant ma thèse : Hamza AMINE, Claudine GAUDON-PLESSE, Jordane HELLER, Eric HUNTZINGER, Olga KOLAJ-ROBIN, Mélanie MAHE, Mélody MATELOT, Pauline ROUILLARD, Vladimir RUDKO, Jordan SINTEFF, Valerio TAVERNITI et Flora TODESCO. Merci à vous tous pour avoir toujours été disponibles, pour m'avoir aidé et soutenu indéfectiblement, ainsi que pour tous les excellents moments passés ensemble. Ces trois années n'auraient pas été aussi agréables et enrichissantes sans vous.

J'aimerais également remercier les (très) nombreuses personnes que j'ai pu rencontrer et avec lesquelles j'ai pu discuter/débattre/apprendre/rire durant ma thèse. Tout d'abord tous les membres des équipes (plus ou moins) voisines, et plus particulièrement : Fernande FREYERMUTH, Angeline GAUCHEROT, Michel NEY, Chantal SELLIER, David BRUCHLEN, Marie CERCIAT, Muminjon DJUMAGULOV, Yuzuru ITOH, Daniya KASHINSKAYA, Iskander KHUSAINOV, Sergey MELNIKOV, Mélanie MEYER, Simone PELLEGRINO, Irina PROKHOROVA, Alexey ROZOV, Claire BEDEZ, Nicolas LEVY, Benoît MAILLOT, Oyindamola OLADOSU, Aline MEUNIER, Laure NIVLET, Perrine STRASSER, Xavier GAUME, Angélique QUARTIER, Baptiste BIDON, Federico COSTANZO, Tiago FIDALGO BAPTISTA, Marie GOEPP, Gaëtan MAURER, Karima TAZIBT, Samantha CARRILLO-ROSAS, Valentina IGNATOVA, Saurabh TAK et Pierre MARSCHALL. Merci pour votre gentillesse, votre soutien et pour tous les bons moments.

J'aimerais également remercier les membres des différentes plateformes dont j'ai pu bénéficier des services. Merci à Catherine BIRCK et à tous les membres de la plateforme de Biologie et Génomique Structurale pour votre professionnalisme et votre efficacité. Merci à Betty HELLER et à tout le service de culture cellulaire pour la rapidité et la qualité de votre travail. Merci à Claudine EBEL pour m'avoir épaulé lors des expériences de tri cellulaire. Merci à tous les membres du centre d'imagerie pour m'avoir appris à utiliser les différents microscopes dont j'avais besoin. Merci à tous les membres du service informatique pour leur rapidité et leur efficacité. Merci à Denis FUMAGALLI, le grand maître des solutions en tout genre du service Mediaprep, pour ton aide, ton soutien et tous les fous rires qu'on a pu partager.

Merci à Pascal EBERLING, Jean-Marie GARNIER, Bernard JOST, Matthieu JUNG, Muriel PHILIPPS et Serge VICAIRE pour votre soutien et votre bonne humeur. Merci à Dominique BIELLMANN, Gabrielle MENGUS et James STEVENIN pour votre aide et pour toutes nos discussions passionnantes.

Je tiens à remercier tous mes amis en dehors de l'institut, et plus particulièrement : Alexis, Célia, Fabien, Jessica, Gaël, Raphaël, Cyril, Romain, Lionel, les deux Marion, Jean-François, Anthony, Jérémy, les deux Maxime, Arnaud, Florian, Robin, Mathilde, Philippe, Benjamin, Virginie,

Alexandre, Camille, Ianis, Guillaume, Pierre, Fabienne, Jean-Luc et Chantal. Merci infiniment pour votre soutien et pour avoir été là pendant ces trois années.

Un énorme merci à mes parents, à mon frère et à sa compagne, à Claudine, Serge et Johan, à Tante Sœur, à Nikki et Anne-Marie, à Isabelle, Laurent, Guillaume et Romain pour leur soutien sans faille et pour m'encourager à chaque défi que je m'impose. Merci de croire en moi.

Enfin, merci à Carine, qui partage ma vie depuis plus de quatre ans déjà. Merci d'être comme tu es, malicieuse et pleine de vie. Ne change jamais.

À Jacques

ABSTRACT :

TITRE : FONCTION DES PROTÉINES BTG/TOB DANS LA DÉSADÉNYLATION DES ARN MESSAGERS EUCARYOTES

L'expression génique d'un organisme est essentiellement véhiculée par une molécule vectrice de l'information génétique, l'Acide RiboNucléique messenger (ARNm), qui sera déchiffrée et traduite en protéines. Dans de nombreux cas, une détérioration des ARNm ou une altération des mécanismes régulant leur synthèse, leur traduction ou leur dégradation sont responsables de l'apparition de maladies, comme par exemple le cancer qui reste à ce jour l'une des pathologies les plus meurtrières au monde. Ainsi, il est important de comprendre les mécanismes impactant les ARNm et notamment leur dégradation. Pour les ARNm fonctionnels, la première étape conduisant à leur dégradation est généralement une réaction de désadénylation qui consiste en un raccourcissement progressif de leur queue poly(A) située à leur extrémité 3'. Cette réaction est l'étape limitante du processus de dégradation. La désadénylation est principalement assurée par deux complexes ubiquitaires chez les eucaryotes, d'une part le complexe PAN2-PAN3, et d'autre part le complexe CCR4-NOT qui a été plus spécialement étudié lors de cette thèse. Ce dernier présente deux sous-unités possédant une activité désadénylase, nommées de manière générique CAF1 et CCR4. L'analyse des mécanismes de dégradation des ARNm impliquant le complexe CCR4-NOT a conduit à l'étude de la famille des protéines BTG/Tob. En effet, tous les membres de cette famille, présente essentiellement chez les métazoaires, interagissent directement avec CAF1. Les membres de la famille BTG/Tob sont caractérisés par la présence d'un domaine APRO (Anti-PROlifératif) N-terminal présentant deux motifs conservés, boxA et boxB, qui sont la signature de cette famille de protéines. Ce domaine APRO est responsable de leur interaction avec la sous-unité CAF1 du complexe CCR4-NOT. Chez les vertébrés, la famille BTG/Tob est constituée de six membres, BTG1, BTG2, BTG3, BTG4, Tob1 et Tob2. Tob1 et Tob2, en plus de leur domaine APRO, présentent deux motifs PAM2 dans leur domaine C-terminal, qui leur permettent d'interagir avec PABPC1, la protéine qui recouvre les queues poly(A) dans le cytoplasme. La faculté des protéines de cette famille de lier CAF1 a conduit à l'étude de leur lien avec le processus de désadénylation. Diverses études ont aussi montré que les membres de la famille BTG/Tob possèdent de nombreux rôles physiologiques. En particulier, la surexpression de

ces facteurs dans des cellules a été associée à des propriétés antiprolifératives. Ces protéines sont aussi impliquées dans la différenciation cellulaire, l'apoptose ainsi que le développement dans de nombreux organismes. Enfin, leur expression a été très régulièrement retrouvée dérégulée dans des cas de cancers chez l'Homme.

Avant le début de ces travaux de thèse, Tob1 et BTG2 avaient été identifiées comme stimulateurs de la désadénylation. Comme Tob1 lie d'une part CAF1 via son domaine APRO, et d'autre part PABPC1 via ses motifs PAM2, il a été proposé que Tob1 permette de rapprocher la désadénylase CAF1 de son substrat, un ARNm polyadénylé, via son interaction avec PABPC1. Ce modèle a été validé en montrant que lorsque Tob1 est couplé directement à un ARNm, son interaction avec PABPC1 n'est plus requise pour observer une stimulation de la désadénylation. Pour BTG2, l'absence de motifs PAM2 au niveau de sa région C-terminale ne permettait pas d'envisager un modèle similaire à celui de Tob1. Des résultats préliminaires du laboratoire ont permis d'identifier d'une part que le domaine APRO de BTG2 (BTG2(APRO)) était nécessaire et suffisant pour stimuler l'activité désadénylase de CAF1, et d'autre part que BTG2(APRO) était capable d'interagir avec une partie de la protéine PABPC1 située entre les acides aminés 1 et 146 dans un essai double-hybride chez la levure. Partant de ces observations, j'ai essayé de répondre à plusieurs questions : l'interaction entre BTG2, CAF1 et PABPC1 peut-elle être détectée *in cellulo* ? Cette interaction est-elle nécessaire aux propriétés stimulatrices de la désadénylation de BTG2 ? Cette interaction entraîne-t-elle un impact de BTG2 sur la synthèse des protéines ? L'interaction de BTG2 avec CAF1 et PABPC1 est-elle nécessaire pour l'activité antiproliférative de BTG2 ?

Pour répondre à ces questions, différentes approches et techniques ont été utilisées comme des expériences de co-immunoprécipitation et d'amplification des queues poly(A) par RT-PCR après transfection *in cellulo*, l'utilisation du test de *Proximity Ligation Assay*, des essais de désadénylation *in vitro*, des essais de prolifération cellulaire ainsi que des essais de traduction *in vitro*.

Mes analyses ont permis de montrer que le premier domaine de reconnaissance de l'ARNm (RRM1) de PABPC1 était nécessaire et suffisant pour interagir avec BTG2(APRO) *in vitro*. J'ai également pu observer l'interaction de PABPC1 endogène avec BTG2(APRO) après sur-expression *in cellulo*. De plus, j'ai pu montrer que BTG2(APRO), en présence de la protéine complète PABPC1, ou de ses deux premiers domaines RRM1 et RRM2, était capable d'augmenter

l'activité désadénylase de CAF1 dans des essais de désadénylation *in vitro*. J'ai également identifié que l'interaction entre PABPC1 et BTG2 était nécessaire à l'augmentation de l'activité désadénylase de CAF1 *in cellulo*, et que cette interaction est très majoritairement permise par une région de BTG2 nommée boxC et située juste en aval de la région boxB de BTG2. L'interaction de BTG2(APRO) aux premiers domaines RRM de PABPC1 laissait supposer que BTG2 puisse interférer avec le processus de traduction car ces domaines RRM sont connus pour interagir avec des facteurs d'initiation de la traduction, tel que eIF4G. Cependant, je n'ai pas constaté, dans les expériences de traduction *in vitro* mises en œuvre, un quelconque effet de BTG2 sur la traduction d'un rapporteur luciférase. Cependant, j'ai pu montrer que BTG2(APRO) possède des propriétés antiprolifératives, et que ces dernières nécessitent l'interaction avec CAF1 et PABPC1, ce qui suggère fortement que les propriétés antiprolifératives de BTG2 sont liées à sa capacité à augmenter l'activité désadénylase de CAF1.

Etant donné que l'extrémité 3' de la queue poly(A) est liée par le domaine RRM1 de PABPC1, et que la région boxC de BTG2 interagit à proximité du site catalytique de CAF1, le modèle élaboré en prenant en compte les résultats de cette thèse est que BTG2 permette que l'extrémité 3' de la queue poly(A) d'un transcrit liée au domaine RRM1 de PABPC1 soit présentée au site catalytique de CAF1 facilitant ainsi l'activité désadénylase de cette dernière.

Aucune donnée n'était disponible au début de ce projet à propos de l'activité stimulatrice de la désadénylase CAF1 de deux autres membres de la famille BTG/Tob, à savoir BTG3 et BTG4. Un second objectif de cette thèse était d'identifier si ces deux protéines étaient capables d'impacter la désadénylation. Une réponse partielle à cette question a pu être obtenue. De fait, aucun effet stimulateur ou inhibiteur de BTG3 ou BTG4 sur la désadénylation d'un rapporteur n'a été détecté lors d'expériences *in cellulo*.

Parmi les perspectives de ces travaux, étant donné l'absence de cibles ARN spécifiques de BTG2 prédites par le mécanisme de désadénylation impliquant CAF1 et PABPC1, il serait d'intérêt d'étudier les effets de BTG2 sur le transcriptome pour savoir si ce facteur agit sur des transcrits particuliers, ou si sa participation au processus de désadénylation affecte tous les transcrits. Concernant BTG3 et BTG4, il a très récemment été montré que la protéine BTG4 était impliquée avec CAF1 dans la désadénylation des ARNm maternels nécessaire à l'activation du génome du zygote lors de l'embryogénèse chez la souris. Il reste donc à déterminer la fonction de BTG3 dans

la désadénylation des ARNm. Ceci pourra être effectué par l'étude de l'impact de l'expression de BTG3 sur le transcriptome et par l'identification de partenaires. Ces derniers pourront être mis en évidence par des essais double-hybride ou par purification des complexes protéiques contenant BTG3 suivi de l'identification des protéines par spectrométrie de masse. De tels travaux permettront de mieux appréhender le rôle de BTG3 et de son interaction avec CAF1 pour la stabilité des ARNm.

ABSTRACT:

TITLE:
FUNCTION OF BTG/TOB PROTEINS IN
MESSENGER RNA DEADENYLATION IN EUKARYOTES

The genic expression of an organism is essentially mediated by a molecule carrying the genetic information, the messenger RiboNucleic Acid (mRNA), which will be decoded and translated in proteins. In numerous cases, damaging mRNA or altering the mechanisms responsible for their synthesis, their translation or their degradation leads to the apparition of diseases such as cancer which, to this day, is still one of the most lethal diseases in the world. Thus, it is important to understand the mechanisms impacting mRNA, and especially their degradation. Regarding functional mRNA, the first step leading to their degradation is usually a deadenylation reaction which consists in the progressive shortening of the poly(A) tail located at their 3' end. This reaction is the rate-limiting step of the degradation process. It is mostly carried out by two ubiquitous complexes in eukaryotes, on one hand the PAN2-PAN3 complex, and on the other hand the CCR4-NOT complex which has been more specifically studied during this PhD. The latter shows two subunits carrying deadenylase activity, with generic names CAF1 and CCR4. The analysis of mRNA degradation mechanisms involving the CCR4-NOT complex led to the study of the BTG/Tob protein family. In fact, every member of this family, essentially found in metazoans, interacts directly with CAF1. The members of the BTG/Tob family are characterized by the presence of an APRO (Anti-PROliferative) N-terminal domain showing two characteristic motifs, boxA and boxB, which are the signature of this family of proteins. This APRO domain is responsible for the interaction with the CAF1 subunit of the CCR4-NOT complex. In vertebrates, the BTG/Tob family comprises six members, BTG1, BTG2, BTG3, BTG4, Tob1 and Tob2. Tob1 and Tob2, in addition to their APRO domain, show two PAM2 motifs, which allow them to interact with PABPC1, the protein which covers poly(A) tails in the cytoplasm. The ability of this family of proteins to bind CAF1 led to studying their involvement in the deadenylation process. Several studies have shown that the members of the BTG/Tob present many physiological roles. In particular, the overexpression of these factors in cells was linked to antiproliferative properties. These proteins are also involved in cell differentiation, apoptosis and development in numerous organisms. Lastly, their expression has been very frequently found altered in cancers in humans.

Before beginning this thesis, Tob1 and BTG2 were identified as deadenylation enhancers. As Tob1 binds CAF1 with its APRO domain, and PABPC1 with its PAM2 motifs, it was proposed that Tob1 closes the gap between CAF1 deadenylase and its substrate, a polyadenylated mRNA, via its interaction with PABPC1. This model was validated by showing that when Tob1 is directly coupled to an mRNA, its interaction with PABPC1 is not required to observe a stimulation of deadenylation. Regarding BTG2, the absence of PAM2 motifs in its C-terminal region didn't suggest a model similar to that of Tob1. Preliminary results in the laboratory allowed to identify that, on the one hand the APRO domain of BTG2 (BTG2(APRO)) was necessary and sufficient to stimulate CAF1 deadenylase activity, and on the other hand that BTG2(APRO) is able to interact with a portion of PABPC1 containing amino acids 1 to 146 in a yeast two-hybrid assay. On the basis of these observations, I tried to answer several questions: can the interaction between BTG2, CAF1 and PABPC1 be detected *in cellulo*? Is this interaction mandatory for BTG2 to enhance deadenylation? Does this interaction enable BTG2 to impact protein translation? Is the interaction between BTG2, CAF1 and PABPC1 mandatory for BTG2 to exert its antiproliferative activity?

To answer these questions, several approaches and techniques were used such as co-immunoprecipitation and RT-PCR amplification of poly(A) tails after *in cellulo* transfection, Proximity Ligation Assay, *in vitro* deadenylation assays, cell proliferation and *in vitro* translation assays.

With my work I showed that the first RNA Recognition Motif (RRM1) of PABPC1 is necessary and sufficient to interact with BTG2(APRO) *in vitro*. Moreover, I obtained evidence for the interaction between endogenous PABPC1 and BTG2(APRO) after overexpression *in cellulo*. Moreover, I could show that BTG2(APRO), in presence of the complete PABPC1 protein or its first two domains RRM1 and RRM2, was able to enhance CAF1 deadenylase activity by performing *in vitro* deadenylation assays. Furthermore, I identified that the interaction between PABPC1 and BTG2 is necessary to enhance CAF1 deadenylase activity *in cellulo*, and that this interaction is mainly mediated by a region of BTG2 called boxC located immediately downstream of the boxB region of BTG2. The interaction of BTG2(APRO) with the first RRM domains of PABPC1 supposes that BTG2 could interfere with the translation process, as these RRM domains are known to interact with translation initiation factors like eIF4G. However, I did not observe any effect of BTG2 on the translation of a luciferase reporter during *in vitro* translation assays. However

I could show that BTG2(APRO) possess antiproliferative properties and that they require the interaction between CAF1 and PABPC1, which strongly suggests that BTG2 antiproliferative properties are linked to its ability to enhance CAF1 deadenylase activity.

Considering that the poly(A) tail 3' extremity is bound by the RRM1 domain of PABPC1 and that BTG2 boxC region interacts to a region close to the catalytic site of CAF1, the model that was built by taking into account the results of this PhD is that BTG2 allows the 3' extremity of the poly(A) tail of a transcript, bound to the RRM1 domain of PABPC1, to be presented to the catalytic site of CAF1, thus facilitating the deadenylase activity of CAF1.

No data was available at the beginning of the project regarding the ability of two other proteins of the BTG/Tob family to enhance CAF1 deadenylase activity, that is BTG3 and BTG4. The second goal of my thesis was to elucidate if these proteins were able to impact deadenylation. A partial answer to this question could be given. In fact, no stimulatory or inhibitory effect of BTG3 or BTG4 on deadenylation could be detected after *in cellulo* experiments.

Regarding the prospects of my work, and given the absence of predicted specific RNA targets for BTG2 with the mechanism described involving CAF1 and PABPC1, it would be interesting to study the effects of BTG2 on the transcriptome in order to know if this protein acts on specific transcripts, or if its involvement in the deadenylation process affects all transcripts. Regarding BTG3 and BTG4, it was shown very recently that the protein BTG4 is involved with CAF1 in the deadenylation of maternal mRNA needed for the activation of the zygotic genome during embryogenesis in mice. The next objective is to determine the function of BTG3 on mRNA deadenylation. This could be assessed by studying the impact of the expression of BTG3 on the transcriptome and by identifying partners. These partners could be highlighted by yeast two-hybrid assays or by purification of protein complexes comprising BTG3 followed by identification of proteins by mass spectrometry. Such work would give a better grasp on the role of BTG3 and its interaction with CAF1 on mRNA stability.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	19
LISTE DES TABLEAUX.....	23
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	24
1 INTRODUCTION :.....	26
1.1 Synthèse / export / traduction de l'ARN messager : acteur primordial de l'expression génique :	26
1.1.1 Initiation/élongation de la transcription :	27
1.1.2 Maturation co-transcriptionnelle d'un ARNm :	29
1.1.2.1 Ajout d'une coiffe en 5' :.....	29
1.1.2.2 Épissage par le spliceosome :	30
1.1.3 Polyadénylation et terminaison de la transcription :	32
1.1.3.1 Protéines se liant à la queue poly(A) (PAB) :.....	33
1.1.4 Transport nucléo-cytoplasmique :.....	35
1.1.5 Traduction :	35
1.1.5.1 Initiation de la traduction :	36
1.1.5.2 Élongation de la traduction :	37
1.1.5.3 Terminaison de la traduction :	38
1.2 Dégradation cytoplasmique de l'ARNm :.....	39
1.2.1 Voies de dégradation des ARNm fonctionnels :	39
1.2.1.1 Voie de dégradation de 5' en 3' :.....	40
1.2.1.2 Les P-bodyes :.....	42
1.2.1.3 Voie de dégradation de 3' en 5' :.....	42
1.2.1.4 Élimination de la coiffe :.....	44
1.2.2 Voies de contrôle qualité des ARNm :.....	44
1.2.2.1 <i>Non-sense-Mediated mRNA Decay (NMD)</i> :	45

1.2.2.2	<i>Non-Stop Decay (NSD)</i> :	46
1.2.2.3	<i>No-Go Decay (NGD)</i> :	46
1.3	Réaction de désadénylation et protéines impliquées :	47
1.3.1	PARN, NOCTURNIN et PAN :	48
1.3.1.1	PARN :	48
1.3.1.2	NOCTURNIN :	48
1.3.1.3	Le complexe PAN :	49
1.3.2	Le complexe CCR4-NOT :	50
1.3.2.1	CNOT1, clé de voûte du complexe CCR4-NOT :	52
1.3.2.2	Les sous-unités catalytiques :	53
1.3.2.2.1	CCR4 :	53
1.3.2.2.2	CAF1 :	54
1.3.2.2.3	CNOT4 :	55
1.3.2.3	Sous-unités régulatrices :	55
1.3.2.3.1	CNOT2-CNOT3 :	55
1.3.2.3.2	CNOT9 :	56
1.3.2.3.3	CNOT10 et CNOT11 :	57
1.4	Régulation de la désadénylation :	57
1.4.1	Régulation de la désadénylation par des protéines RBP :	58
1.4.2	Régulation de la désadénylation par les micro-ARN et le complexe RISC :	59
1.4.3	La famille BTG/Tob :	60
1.4.3.1	Rôles physiologiques de la famille BTG/Tob :	63
1.4.3.1.1	BTG1 :	63
1.4.3.1.2	BTG2 :	66
1.4.3.1.3	BTG3 :	71

1.4.3.1.4	BTG4 :	73
1.4.3.1.5	Tob1 :	74
1.4.3.1.6	Tob2 :	77
1.4.3.2	La famille BTG/Tob et la désadénylation :	78
1.5	Présentation des projets :	80
2	RÉSULTATS :	83
2.1	Mise en évidence de l'interaction entre BTG2(APRO) et PABPC1 dans des cellules :	83
2.1.1	Expérience de co-immunoprécipitation :	83
2.1.2	Utilisation de la technique PLA (<i>Proximity Ligation Assay</i>) pour détecter une interaction entre le domaine APRO de BTG2 et PABPC1 <i>in cellulo</i> :	85
2.1.3	Co-immunoprécipitation de PABPC1 endogène avec le domaine APRO de BTG2 après réticulation :	87
2.2	Étude <i>in vitro</i> de l'activité stimulatrice de BTG2 dans le processus de désadénylation : ..	89
2.2.1	Préparation des essais de désadénylation <i>in vitro</i> :	89
2.2.1.1	Purification des protéines :	89
2.2.1.2	Synthèse d'un substrat de 75 adénosines marqué à la fluorescéine :	90
2.2.1.3	Mise au point d'un tampon de réaction adapté :	90
2.2.1.4	Mise au point de la quantité de 6His-PABPC1 nécessaire à la liaison totale au substrat :	92
2.2.2	Essais de désadénylation <i>in vitro</i> :	93
2.2.2.1	BTG2 augmente-t-elle l'activité désadénylase de CNOT7 en présence de PABPC1 ?	93
2.2.2.2	La protéine PABPC1 humaine a-t-elle un rôle inhibiteur envers 6His-CNOT7 <i>in vitro</i> ?	97
2.2.2.3	La liaison de PABPC1(1-190) protège-t-elle le substrat d'autres activités RNAses hormis CNOT7 ?	98

2.2.2.4	BTG2 change-t-elle l'activité enzymatique de 6His-CNOT7 ?.....	99
2.2.2.5	Identification de la taille du produit final de dégradation :.....	102
2.2.2.6	Augmentation de l'activité désadénylase de CAF1 : Propriété conservée du domaine APRO ?.....	103
2.2.2.7	La liaison de RRM1+2 au substrat est-elle indispensable à l'augmentation de l'activité de CNOT7 <i>in vitro</i> ?.....	104
2.2.3	Recherche d'un mutant d'interaction de BTG2 liant CNOT7 mais plus PABPC1 :	107
2.3	La liaison de BTG2 à PABPC1 est-elle nécessaire à la stimulation de la désadénylation <i>in cellulo</i> ?.....	113
2.4	L'interaction entre BTG2(APRO) et PABPC1 a-t-elle un impact sur les propriétés antiprolifératives de BTG2 ?.....	115
2.5	Recherche d'un modèle cellulaire d'induction de l'ARNm endogène de BTG2 :.....	117
2.6	BTG2 a-t-elle un rôle dans la traduction ?.....	120
2.6.1	Synthèse des rapporteurs luciférases et obtention d'un extrait cellulaire fonctionnel :	120
2.6.1.1	Synthèse des rapporteurs luciférases :	120
2.6.1.2	Test luciférase pour évaluer l'intégrité des transcrits :	122
2.6.1.3	Obtention d'un extrait fonctionnel de cellules HeLa S3 :.....	123
2.6.2	Mise au point de l'expérience de traduction <i>in vitro</i> :.....	124
2.6.3	Impact de BTG2 sur la stabilité et la traduction d'un transcrit luciférase en présence de l'extrait cytoplasmique de cellules HeLa :	131
2.7	BTG3 et BTG4 ont-elles un impact sur l'activité désadénylase de CAF1 ?.....	135
2.7.1	Clonage de BTG3 et BTG4 :.....	136
2.7.2	Optimisation de l'expression des protéines de fusion dans des cellules HEK293 <i>Tet-Off</i> :	137

2.7.3	Évaluation de la capacité de BTG3 et BTG4 à induire la désadénylation d'un ARNm rapporteur par RACE-PAT :	141
3	DISCUSSION :	143
3.1	BTG2(APRO) et PABPC1 sont capables d'interagir <i>in cellulo</i> , et cette interaction est principalement permise par la région boxC de BTG2 :.....	143
3.2	Le domaine APRO de BTG2 permet d'augmenter l'activité désadénylase de CAF1 <i>in vitro</i> et cette propriété n'est pas une propriété conservée du domaine APRO au sein de la famille BTG/Tob :	145
3.3	PABPC1 permet l'activité désadénylase de CAF1 mais protège un substrat polyadénylé d'autres activités nucléases :	147
3.4	L'expression du domaine APRO de BTG2 est suffisante pour observer une réduction de la prolifération cellulaire :	147
3.5	Expression de la protéine BTG2 endogène :	148
3.6	BTG2 ne semble pas avoir d'effet sur la traduction d'un ARNm luciférase lors d'essais de traduction <i>in vitro</i> :	148
3.7	Implication de BTG3 et BTG4 dans la désadénylation d'ARNm :.....	149
3.8	Fonctions des protéines de la famille BTG/Tob et lien avec la désadénylation :	149
4	MATÉRIEL ET MÉTHODES :	152
4.1	Milieux pour la culture bactérienne :	152
4.2	Souches bactériennes :	152
4.3	Milieux et tampons utilisés pour la culture de levure :	152
4.4	Souche de levure :	152
4.5	Milieux utilisés pour la culture de lignées cellulaires humaines :.....	153
4.6	Clonage par ligation <i>in-gel</i> :	153
4.7	Préparation d'ADN plasmidique :	154
4.8	Analyse de protéines par gel SDS-PAGE et <i>western blot</i> :	154
4.9	Expériences de co-immunoprécipitation après transfection <i>in cellulo</i> :	155

4.9.1	Co-immunoprécipitation de protéines marquées HA :	155
4.9.2	Co-immunoprécipitation de protéines marquées GFP :	156
4.9.3	Co-immunoprécipitation après réticulation :	156
4.10	<i>Proximity ligation assay</i> :	157
4.11	Purifications de protéines :	159
4.11.1	Obtention de culots bactériens après transformation :	159
4.11.2	Expériences de co-précipitation :	159
4.11.3	Purification de protéines recombinantes pour les tests <i>in vitro</i> :	160
4.11.3.1	Purification « à pression atmosphérique » de protéines de fusion GST :	160
4.11.4	Purification de protéines par HPLC :	160
4.12	Expériences de désadénylation <i>in vitro</i> :	161
4.12.1	Synthèse de substrats polyadénosines marqués en 5' par la fluorescéine :	161
4.12.2	Marquage d'oligonucléotides ARN à la fluorescéine :	162
4.12.3	EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>) :	162
4.12.4	Essai de désadénylation <i>in vitro</i> :	162
4.12.5	Essai de dégradation avec Nucléase P1 :	163
4.12.6	Essai de dégradation par RNase If :	163
4.13	Test double-hybride chez la levure :	163
4.13.1	Transformation de levures :	163
4.13.2	Essai enzymatique β -galactosidase :	164
4.14	Analyse par RACE-PAT (<i>Rapid Amplification of CDNA Ends Poly(A) Tail</i>) :	164
4.14.1	Transfections cellulaires :	165
4.14.2	Essai RACE-PAT :	165
4.15	Essai de prolifération cellulaire :	166
4.16	Induction de BTG2 endogène par différents traitements :	166

4.17	Expériences de traduction <i>in vitro</i> :.....	167
4.17.1	Transcription <i>in vitro</i> et ajout de coiffe en 5' des ARN :.....	167
4.17.2	Essai de dégradation d'un substrat luciférase par XRN1 après traitement apyrase :	168
4.17.3	Essai de traduction avec un lysat de réticulocytes de lapin :.....	169
4.17.4	Préparation d'un extrait de cellules HeLa S3 permettant la traduction <i>in vitro</i> :...	169
4.17.5	Essai de traduction avec un extrait de cellules HeLa S3 :.....	170
4.17.6	Essai de dégradation d'un substrat luciférase dans l'extrait de traduction :	170
4.18	Tampons :	170
5	RÉFÉRENCES :.....	177

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la reconnaissance de la région promotrice d'un gène lors de l'initiation de la transcription.	27
Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme d'épissage par le spliceosome.	31
Figure 3 : Représentation schématique de la polyadénylation d'un transcrit.	33
Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation de PABPC1 et de PABPN1.	34
Figure 5 : Représentation schématique de l'étape d'élongation de la traduction.	38
Figure 6 : Voies de dégradation des ARNm fonctionnels.	40
Figure 7 : Composition du complexe CCR4-NOT humain.	51
Figure 8 : Représentation schématique des membres de la famille BTG/Tob chez les vertébrés.	60
Figure 9 : Interactions de BTG2 et Tob1 avec PRMT1 et/ou PABPC1.	62
Figure 10 : Représentation schématique de Tob1 et BTG2 comme stimulateurs de la désadénylation.	81
Figure R1 : Co-immunoprécipitation de PABPC1 et CNOT7 endogènes avec BTG2(APRO).	85
Figure R2 : Essai PLA entre PABPC1 endogène et diverses protéines étiquetées HA.	86
Figure R3 : Co-immunoprécipitation de PABPC1 endogène avec le domaine APRO de BTG2 après réaction de réticulation.	88
Figure R4 : Protéines utilisées pour les premiers essais de désadénylation <i>in vitro</i>	89
Figure R5 : Détermination d'un tampon permettant le recouvrement d'un substrat polyadénosines par 6His-PABPC1(FL) ainsi que sa dégradation par CNOT7 <i>in vitro</i>	91
Figure R6 : Détermination de la quantité optimale de 6His-PABPC1(FL) et de 6His-PABPC1(1-190) pour le recouvrement total d'un substrat d'environ 75 adénosines.	93
Figure R7 : BTG2(APRO) et PABPC1(FL) stimulent l'activité désadénylase de CNOT7 <i>in vitro</i>	94
Figure R8 : Les deux premiers domaines RRM de PABPC1 sont suffisants pour stimuler l'activité désadénylase de CNOT7 en présence de BTG2(APRO) <i>in vitro</i>	96
Figure R9 : L'association de PABPC1 au substrat n'inhibe pas l'activité désadénylase de CNOT7 <i>in vitro</i>	97
Figure R10 : PABPC1(1-190) confère une protection partielle à un substrat polyadénosines contre une activité RNase autre que celle de CNOT7 <i>in vitro</i>	99

Figure R11 : La désadénylation par CNOT7 est également progressive en présence de BTG2(APRO) et des deux premiers domaines RRM de PABPC1.....	100
Figure R12 : Le produit final de la réaction de désadénylation catalysée par CNOT7 présente une taille inférieure à 4 nucléotides.	102
Figure R13 : L'augmentation de l'activité désadénylase de CNOT7 <i>in vitro</i> en présence de PABPC1 n'est pas une propriété conservée du domaine APRO.....	103
Figure R14 : Évaluation de la capacité de PABPC1(1-190) à recouvrir un ARN de composition hétérogène.	105
Figure R15 : La fixation stable de PABPC1(1-190) au substrat n'est pas nécessaire à l'augmentation de sa dégradation en présence de CNOT7 et BTG2(APRO) <i>in vitro</i>	106
Figure R16 : Obtention d'un mutant de BTG2(APRO) pour lequel la liaison à PABPC1 est affaiblie.....	108
Figure R17 : La mutation de la boxC de BTG2 affecte l'interaction avec le premier domaine RRM de PABPC1.	109
Figure R18 : La mutation de la boxC de BTG2 n'affecte pas l'interaction de BTG2(APRO) avec PRMT1.	110
Figure R19 : Protéines de fusion GST utilisées pour des essais de désadénylation <i>in vitro</i>	112
Figure R20 : La mutation du motif boxC de BTG2 affecte la capacité de BTG2 à augmenter l'activité désadénylase de CNOT7 en présence de PABPC1(1-190) <i>in vitro</i>	113
Figure R21 : Évaluation de la capacité de BTG2(APRO) et BTG2(APRO)boxC à affecter la désadénylation d'un rapporteur β -globine <i>in cellulo</i>	114
Figure R22 : Essai de prolifération cellulaire.....	116
Figure R23 : Induction de l'expression endogène de BTG2 par un traitement carence-complémentation en sérum de cellules U2OS.....	117
Figure R24 : Induction de l'expression endogène de l'ARNm de BTG2 en réponse à différents traitements.	119
Figure R25 : Essai de quantification de la proportion d'ARNm présentant une coiffe en 5' après réaction d'ajout de coiffe avec l'enzyme du virus de la Vaccine.....	121
Figure R26 : Vérification de l'efficacité de traduction des transcrits par traduction <i>in vitro</i> avec un lysat de réticulocytes de lapins.....	122

Figure R27 : Efficacité de traduction d'un transcrit luciférase <i>in vitro</i> avec un extrait d'HeLa S3.	123
Figure R28 : Mise au point de la durée optimale de traitement micrococcal nucléase pour l'essai de traduction <i>in vitro</i>	125
Figure R29 : Mesure de l'activité luciférase en fonction de la concentration de transcrit luciférase.	126
Figure R30 : Mesure de l'activité luciférase en fonction de la concentration de transcrit Firefly.	127
Figure R31 : Mise au point de la durée optimale de réaction pour l'essai de traduction <i>in vitro</i> .	127
Figure R32 : Évaluation de l'impact de la queue poly(A) et de la coiffe en 5' sur la traduction <i>in vitro</i> d'un transcrit luciférase dans un extrait de cellules HeLa S3.	128
Figure R33 : Stabilité du transcrit Renilla luciférase dans un extrait de cellules HeLa S3.	129
Figure R34 : Stabilité du transcrit Renilla luciférase ne possédant pas de coiffe en 5' dans un extrait de cellules HeLa S3.	130
Figure R35 : Stabilité du transcrit Renilla luciférase dans un extrait de cellules HeLa S3 en présence de BTG2(APRO) et PABPC1(1-190).	132
Figure R36 : Impact de BTG2(APRO) sur la traduction <i>in vitro</i> d'un transcrit Firefly luciférase.	133
Figure R37 : Impact de BTG2(APRO) sur la traduction <i>in vitro</i> d'un transcrit Firefly luciférase.	134
Figure R38 : Alignements des domaines APRO et des parties C-terminales des membres de la famille BTG/Tob.	136
Figure R39 : Représentation schématique des protéines BTG3 et BTG4.	137
Figure R40 : Vérification de l'expression des constructions BTG3 et BTG4 marquées GFP ou HA.	138
Figure R41 : Vérification de la liaison de BTG3 et BTG4 à CNOT7 endogène.	139
Figure R42 : Optimisation de l'expression de BTG2(A), BTG3 et BTG4 par transfection <i>in cellulo</i>	140
Figure R43 : Évaluation de la capacité de BTG3(V1) et BTG4 à affecter la désadénylation d'un rapporteur β -globine <i>in cellulo</i>	141
Figure D1 : Bilan des interactions de BTG2 et Tob1 avec PRMT1 et/ou PABPC1.	144

Figure D2 : Modèle proposé pour la stimulation de la désadénylation par BTG2.....146

Figure M1 : Représentation schématique du principe du Proximity Ligation Assay.157

Figure M2 : Synthèse d'un substrat polyadénylé marqué en 5' à la fluorescéine.....161

Figure M3 : Transcrits luciférases utilisés pour les essais de traduction *in vitro*.....168

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Analyse des similitudes entre les domaines APRO des membres de la famille BTG/Tob chez l'humain.	61
Tableau 2 : Liste des plasmides utilisés.	173
Tableau 3 : Séquences des oligonucléotides utilisés.	175

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Les termes anglais difficiles à traduire inclus dans le manuscrit ont été signalés en italique.

3' UTR : *3' Untranslated Region*

5' UTR : *5' Untranslated Region*

ADN, ADNc : Acide DésoxyriboNucléique, ADN complémentaire

APRO : *Anti-PROliferative* ou Anti-PROlifératif

ARN, ARNm, ARNr, ARNt, miR, snARN, snoARN : Acide RiboNucléique, ARN messenger, ARN ribosomique, ARN de transfert, micro-ARN, petits ARN nucléaires, petits ARN nucléolaires.

ATP, GMP, GTP, dNTP, rNTP : Adénosine Tri-Phosphate, Guanosine Mono-Phosphate, Guanosine Tri-Phosphate, Désoxyribonucléotides Tri-Phosphates, Ribonucléotides Tri-Phosphates

BET : Bromure d'éthidium

BTG : *B-cell Translocation Gene*

CAF1 : *CCR4p-Associated Factor 1*

CCR4 : *Carbon Catabolite Repressor Protein 4*

CCR4-NOT : *Carbon Catabolite Repression 4 - Negative On TATA-less*

CNOT : *CCR4-NOT transcription complex subunit*

DTT : DiThioThréitol

EDTA : *Ethylenediaminetetraacetic acid* ou Acide éthylène-diamine-tétraacétique

GFP : *Green Fluorescent Protein* ou Protéine Fluorescente Verte

GST : Glutathione-S-Transférase

HA : Hémagglutinine

LB : *Lysogeny Broth*

PABPC1, PABPN : *Poly(A)-Binding-Protein Cytoplasmic 1, Poly(A) Binding Protein Nuclear 1*

PAM2 : *PABP-interacting Motif 2* ou Motif d'interaction à PABP 2

PBS : *Phosphate-Buffered Saline*

PCI : *Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol* ou Phénol:Chloroforme:alcool Isoamylique

PCR, qPCR, RT-PCR : *Polymerase Chain Reaction, quantitative PCR, Reverse-Transcription PCR*

PLA : *Proximity Ligation Assay*

PMSF : *PhenylMethylSulfonyl Fluoride*, Fluorure de PhénylMéthylSulfonyle

PRMT1 : Protéine arginine N-Méthyl Transférase 1

RACE-PAT : *Rapid Amplification of CDNA Ends Poly(A) Tail assay*

RISC : *RNA-Induced Silencing Complex*

RPLP0 : *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*

RRM : *RNA Recognition Motif* ou domaine de reconnaissance de l'ARN

SDS, SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate* ou dodécylsulfate de sodium, SDS polyacrylamide gel

Tob : *Transducer of ErbB-2*

TPA : *TetradecanoylPhorbol Acetate* ou Acétate de Tétradécanoylphorbol

YPDA : *Yeast Peptone Dextrose Adenine*

Unités et formules chimiques :

CaCl₂, Mg²⁺, MgAc, NaAc, NaCl : chlorure de calcium, ions magnésium, acétate de magnésium, acétate de sodium, chlorure de sodium

pH : potentiel hydrogène

mM, μM, nM : milli Molaires, micro Molaires, nano Molaires

g, mg, μg, ng : grammes, milligrammes, microgrammes, nanogrammes

l, ml, μl : litres, millilitres, microlitres

mm, nm : millimètres, nanomètres

h, min, sec : heures, minutes, secondes

°C : degré Celsius

V, W : Volts, Watts

nts, bp, kb : nucléotides, paires de bases, kilobases,

U, U.A., KU : Unités, Unités Arbitraires, Unités Kunitz

kDa, MDa : kilo Dalton, Méga Dalton

g, rpm : force gravitationnelle, rotations par minutes

p/v : poids/volume

1. INTRODUCTION

1 INTRODUCTION :

Le génome humain compte plus de 20 000 gènes dont l'expression diffère selon des conditions aussi variées que le cycle cellulaire, le type de tissu considéré, l'âge de l'organisme, ou encore les divers stress auxquels un individu doit faire face. L'expression génique d'un organisme est généralement véhiculée par un vecteur de l'information génétique, l'ARN messager (ARNm), qui sera traduit en protéines. Des altérations des ARNm ou des mécanismes régulant leur synthèse, leur traduction ou leur dégradation peuvent être responsables de l'apparition de diverses maladies, comme le cancer qui reste à ce jour l'une des pathologies les plus meurtrières au monde. Ainsi, il est important de mieux comprendre les mécanismes impactant l'expression génique chez les eucaryotes. D'autre part, une régulation précise et organisée de l'expression des gènes est essentielle à la vie afin de permettre d'ajuster au mieux la réponse cellulaire lors du développement ou face aux différents stress engendrés par l'environnement. Cette régulation s'effectue aussi bien au niveau des protéines que des ARNm. En ce qui concerne les ARNm, les différentes étapes de leur existence sont la cible de régulations, et notamment lors de leur dégradation qui est la thématique de cette thèse. Après un rappel des différentes étapes de la genèse et du rôle des ARNm, une description plus approfondie des mécanismes conduisant à leur dégradation sera faite.

1.1 Synthèse / export / traduction de l'ARN messager : acteur primordial de l'expression génique :

Chez les organismes eucaryotes, la production d'une molécule d'ARN est effectuée dans le noyau par des polymérases qui utilisent une région spécifique de l'ADN génomique comme matrice de synthèse lors d'un processus appelé transcription. Il existe trois polymérases chez les eucaryotes : l'ARN Polymérase I, responsable de la synthèse des précurseurs d'ARN ribosomiques 18S, 5,8S et 28S ; l'ARN Polymérase III, responsable de la transcription d'ARN non codants comme les précurseurs d'ARN de transfert, l'ARN ribosomique 5S et de petits ARN ; et l'ARN Polymérase II (Pol II), qui assure la transcription des ARNm, de certains petits ARN nucléaires (snARN), de certains petits ARN nucléolaires (snoARN), des micro-ARN et des longs ARN non-codants. Pol II est constituée de 12 sous-unités et sa sous-unité catalytique, RPB1 (*RNA polymerase II subunit B1*), possède un domaine C-terminal (CTD) composé de répétitions d'heptamères en tandem de séquence (Y1-S2-P3-T4-S5-P6-S7). Cette propriété la distingue des autres ARN polymérases. Pol II est l'élément central de la transcription des ARNm, de son initiation à sa terminaison.

1.1.1 Initiation/élongation de la transcription :

La première étape de l'initiation de la transcription nécessite le recrutement de Pol II et d'autres protéines afin de constituer un complexe de pré-initiation (PIC). L'assemblage du PIC s'effectue au niveau de régions ADN spécifiques, les éléments promoteurs centraux (CPE). L'un des CPE majoritaires est la boîte dite TATA, de séquence consensus TATA(A/T)AA(A/G), située 30 à 31 nucléotides en amont du site de départ +1 de la synthèse de nombreux transcrits (Benoist and Chambon, 1981). La boîte TATA est reconnue par TBP (*TATA-binding protein*) qui, en se liant à l'ADN et en interagissant avec les TAF (*TBP Associated Factors*), constitue le complexe TFIID. Hormis les TAF, d'autres facteurs peuvent interagir avec la TBP, à l'instar de TFIIA qui permet de stabiliser l'interaction entre TBP et la boîte TATA.

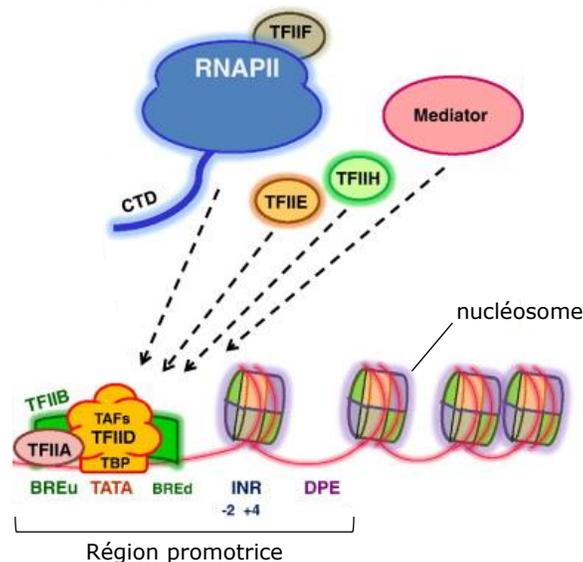


Figure 1 : Représentation schématique de la reconnaissance de la région promotrice d'un gène lors de l'initiation de la transcription.

Les différents CPE constituant la région promotrice, ainsi que leurs partenaires, sont représentés : la boîte TATA associée à TBP elle-même associée aux TAF pour constituer TFIID, BRE^u et BRE^d liés à TFIIIB, l'INR ainsi que le DPE qui pourront lier TFIID. Les autres constituants du PIC, comme TFIIA, TFIIIE, TFIIH, TFIIF, le complexe *mediator* ainsi que l'ARN Polymérase II (RNAPII) sont également représentés (adapté de (Shandilya and Roberts, 2012)).

TFIID peut également lier d'autres séquences promotrices, comme l'INR (*Initiator element*) qui contient le site d'initiation de la transcription +1, ou le DPE (*Downstream Promoter Element*) situé entre 28 et 33 nucléotides en aval du nucléotide de départ +1. La présence de BRE^u (*Upstream TFIIB recognition elements*) ou de BRE^d (*Downstream TFIIB recognition elements*) aux abords de la boîte TATA peut réguler de manière positive ou négative la transcription en permettant le

recrutement de TFIIB qui possède un rôle majeur dans la formation d'un complexe TFIIB-TBP-ADN (Deng et al., 2009). Le recrutement ultérieur de TFIIF et de Pol II entraîne la stabilisation du PIC en formation, qui permet par la suite l'addition du complexe *mediator* ainsi que de TFIIH et TFIIE au PIC. À noter qu'en l'absence de boîte TATA des CPE comme INR ou DPE permettent la formation de TFIID et d'un PIC fonctionnel. Finalement, TFIIH permet l'ouverture du double brin d'ADN matrice en présence d'ATP, formant ainsi une « bulle de transcription » qui marque le début de la synthèse d'un pré-ARNm. Une représentation des facteurs impliqués dans l'initiation de la transcription est fournie en Figure 1. Parallèlement à l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription, des ré-arrangements chromatiniens s'effectuent au niveau des nucléosomes afin de permettre l'initiation de la transcription. Les nucléosomes sont des complexes constitués de huit protéines histones, autour desquels l'ADN s'enroule 1,65 fois. Le cœur d'un nucléosome « standard » est constitué par 4 histones canoniques : H2A, H2B, H3 et H4 chacune présente en deux copies (Kornberg, 1974). Ces histones canoniques peuvent être modifiées de manière post-traductionnelle (PTM), ayant pour conséquence d'altérer ou de renforcer l'interaction des histones avec d'autres protéines et/ou l'organisation de la chromatine, ce qui contribue à la régulation de l'expression génique. En effet les histones sont soumises à diverses PTM, comme l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitylation, ou encore la sumoylation. Par exemple, l'acétylation des lysines des histones est très souvent associée à une transcription active, tandis que la méthylation de résidus arginine ou lysine peut être associée à une transcription activée ou réprimée suivant sa position (Smolle and Workman, 2013). Lors de l'initiation de la transcription, la décompaction de l'ADN nécessite le complexe de remodelage de la structure de la chromatine RSC qui permet l'apparition d'une région appauvrie en nucléosomes (NDR) au niveau de séquences riches en AT quelques dizaines de nucléotides en amont du site de départ de la transcription. Le complexe SWR peut ensuite remplacer l'histone H2A par le variant d'histone H2A.Z au sein des nucléosomes aux abords du NDR. L'acétylation de H2A.Z permet notamment sa stabilisation au niveau du nucléosome (Altaf et al., 2010), engendrant l'instabilité des nucléosomes auxquels il est incorporé, l'inhibition de la méthylation de l'ADN et le recrutement de facteurs de remodelage chromatiniens ainsi que divers facteurs de transcription (Draker et al., 2012; Zilberman et al., 2008).

Une fois l'initiation de la transcription achevée et les zones promotrices décompactées, Pol II débute la transcription puis s'arrête dans la région proximale promotrice 30 à 60 nucléotides en

aval du début de la transcription. Cette étape est limitante dans le processus de transcription et permet notamment de maintenir les gènes sur lesquels est liée Pol II aptes à la transcription en présentant des régions promotrices libres et accessibles à divers facteurs de transcription. Elle est assurée par des facteurs de transcription collaborant avec le NELF (*Negative Elongation Factor*) entraînant la stabilisation de Pol II au niveau du promoteur. Cela permet également un recrutement de complexes Pol II plus efficace et donc une activation de la transcription plus rapide, ainsi que le couplage de la synthèse d'un ARN et de sa maturation, par recrutement de diverses protéines et complexes via le CTD de Pol II. Ensuite, grâce à l'intervention de différents acteurs protéiques, Pol II va quitter l'état de pause, pour entrer dans une phase active d'élongation de la transcription permettant la synthèse d'un pré-ARNm. L'étape d'élongation est couplée à divers mécanismes de maturation présentés ci-après.

1.1.2 Maturation co-transcriptionnelle d'un ARNm :

Le pré-ARNm est modifié tout au long de sa synthèse au sein du noyau. Deux modifications co-transcriptionnelles majeures ont lieu, d'une part l'ajout d'une coiffe 7-méthylguanosine en 5', et d'autre part l'épissage du transcrit par délétion d'un ou plusieurs introns avec jonction concomitante des exons. Le couplage entre synthèse et mécanismes de maturation de l'ARNm permet notamment une coopération entre les différentes machineries cellulaires impliquées pour une plus grande précision et une plus grande efficacité lors de la genèse du transcrit.

1.1.2.1 Ajout d'une coiffe en 5' :

L'ajout de la coiffe intervient peu après le début de la transcription, et consiste en l'addition d'une coiffe 7-méthylguanosine par liaison 5'-5' triphosphate au niveau du premier nucléotide du transcrit en cours de synthèse. Le CTD de l'ARN Pol II, phosphorylé au niveau de la S2 et de la S5 de ses heptamères en tandem, joue un rôle important dans ce processus en permettant le recrutement de la guanine-7-méthyltransférase ainsi que le recrutement et l'activation de l'enzyme responsable de l'ajout de la coiffe (*mRNA-capping enzyme*) (Ho and Shuman, 1999). La réaction consiste, en premier lieu, par la génération d'une extrémité 5' di-phosphate sur le premier nucléotide du transcrit en cours de synthèse par l'action triphosphatase de la *mRNA-capping enzyme*. Cette dernière catalyse ensuite l'ajout de GMP par liaison 5'-5' triphosphate grâce à son activité guanylyl-transférase à l'aide d'un donneur GTP, puis l'enzyme guanine-7-méthyltransférase catalyse le transfert d'un groupement méthyl depuis le substrat S-adénosyl-L-

méthionine (SAM), ainsi converti en S-adenosyl-l-homocysteine (SAH), vers le groupement GMP ajouté précédemment résultant en une coiffe 7-méthylguanosine. Cette coiffe confère notamment à l'ARN une protection contre l'activité d'exonucléases 5'-3', elle facilite aussi l'export des ARNm matures vers le cytoplasme ainsi qu'une meilleure initiation de leur traduction. Ces propriétés sont essentiellement assurées par l'association de la coiffe à deux complexes protéiques : le complexe de liaison à la coiffe (CBC) et le facteur d'initiation eucaryote de la traduction 4F (eIF4F). CBC est un complexe majoritairement nucléaire, constitué de deux polypeptides, Cbp20 et Cbp80, liant la coiffe de manière synergique. CBC facilite l'épissage et permet l'export nucléaire du transcrit à travers les pores nucléaires par un mécanisme décrit plus loin dans ce manuscrit. CBC est également capable d'interagir avec la sous-unité eIF4G d'eIF4F, qui interagit aussi avec la coiffe via une autre de ses sous-unités nommée eIF4E. L'association de ces deux complexes avec la coiffe permet d'augmenter la stabilité du transcrit, en rentrant en compétition avec des agents d'hydrolyse de la coiffe. La liaison à la coiffe d'eIF4F via eIF4E permettra également l'initiation de la traduction avec l'aide de différents acteurs lors d'un processus décrit plus loin dans ce manuscrit.

1.1.2.2 Épissage par le spliceosome :

L'épissage d'un transcrit en cours de synthèse est une étape primordiale, à l'origine de la diversité du protéome en permettant d'obtenir plusieurs protéines à partir d'un même gène. L'épissage consiste en la jonction de portions codantes d'un transcrit, nommées exons, au détriment de portions non codantes, nommées introns. La réaction d'épissage est assurée par un complexe, le spliceosome. Deux formes de spliceosome coexistent chez les mammifères, la forme principale est décrite ci-dessous. Ce complexe se forme et agit de manière séquentielle par recrutement de plusieurs snARN: U1, U2, U4, U5, U6, au niveau de sites d'épissage sur le pré-ARNm. Ces snARN sont associés chacun à plusieurs protéines, dont 7 protéines Sm en commun, formant ainsi des snRNP (*small nuclear RiboNucleoprotein Particles*). Tout d'abord, les snRNP U1 et U2 s'associent au CTD de Pol II et au pré-ARNm, de manière co-transcriptionnelle, au niveau de régions de reconnaissance spécifique : le site d'épissage 5' (5'ss) situé au début d'un intron, le site d'épissage 3' (3'ss) situé à la fin d'un intron, ainsi que le point de branchement (BP) localisée entre 15 et 50 nucléotides en amont du 3'ss.

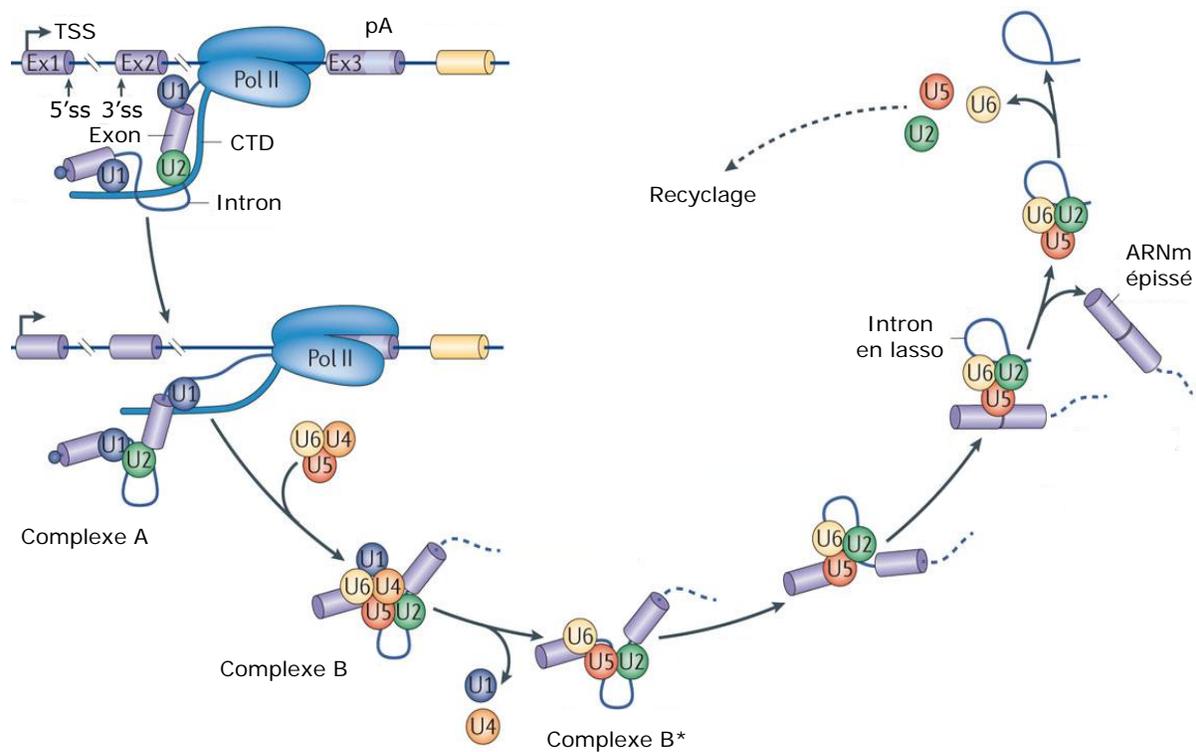


Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme d'épissage par le spliceosome. L'ARNm en cours de transcription, les complexes intermédiaires A, B et B* permettant l'épissage co-transcriptionnel de cet ARNm ainsi que les produits d'épissage sont représentés. Le point de branchement (BP), situé entre les sites d'épissage 5' (5'ss) et 3' (3'ss) n'est pas représenté ici (adapté de (Matera and Wang, 2014)).

L'interaction entre les snRNP U1 et U2 donne naissance à un pré-spliceosome, également nommé complexe A, au sein duquel le 5'ss, le BP et le 3'ss sont fortement rapprochés. Ensuite, la tri-snRNP U4-U6-U5, préalablement assemblée, est recrutée pour constituer le complexe B en s'associant avec les snRNP U1 et U2. Après divers réarrangements et l'activité de plusieurs hélicases, ce complexe devient catalytiquement fonctionnel (complexe alors nommé B*) et dépourvu des snRNP U1 et U4. Le complexe B* procède alors à la première réaction d'épissage donnant naissance à l'exon1 libre et à un intermédiaire nucléique intron « en lasso »-exon2. Après réarrangement, le complexe procède à la deuxième réaction catalytique, et présente alors les 2 exons épissés et l'intron « en lasso » séparés. Les snRNP U2, U5 et U6 sont ensuite libérées et recyclées pour être recrutées dans d'autres réactions d'épissage. Le processus d'épissage est résumé en Figure 2. Finalement, lors de l'épissage, le spliceosome dépose, chez les eucaryotes supérieurs, le complexe de jonction des exons (EJC) 20 à 24 nucléotides en amont du site de fusion des 2 exons (Singh et al., 2013), complexe qui aura toute son importance dans la dégradation et le

contrôle qualité des ARNm qui seront présentés ultérieurement.

1.1.3 Polyadénylation et terminaison de la transcription :

La terminaison de la transcription se caractérise par la dissociation du complexe de transcription, associé à l'ARN en cours de synthèse, de la matrice d'ADN génomique ainsi que par l'addition d'une extrémité polyadénylée au niveau de l'extrémité 3' du transcrit au cours de la réaction de polyadénylation. Ces mécanismes impliquent différents acteurs comme le CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*), le CstF (*Cleavage Stimulatory Factor*) ainsi que les facteurs de clivage CFI-CFII. Le CPSF se lie directement au corps de la polymérase, tandis que le CstF et les facteurs de clivage CFI-CFII se lient au CTD de la polymérase, phosphorylé au niveau de la S2. Des éléments situés en *cis* de l'ARN pré-messager permettent de définir le site de clivage qui est fréquemment immédiatement précédé en 5' par le dinucléotide CA. Ces éléments sont chez les eucaryotes supérieurs: le signal de polyadénylation (PAS) AAUAAA situé 10 à 30 nucléotides en amont du site de clivage, un DSE (*Downstream Sequence Element*) riche en U/GU situé entre 0 et 20 nucléotides en aval du site de clivage et des motifs USE (*Upstream Sequence Element*) riches en U situés entre 0 et 20 nucléotides en amont du PAS. Les facteurs CPSF, CstF et CFI reconnaissent les éléments AAUAAA, DES et USE respectivement pour former un complexe qui va recruter le facteur CFII ainsi que la protéine symplekin et la poly(A) polymérase (PAP), l'ensemble formant le complexe actif de polyadénylation (Proudfoot, 2011; Shi and Manley, 2015). Ce mécanisme, globalement conservé chez tous les eucaryotes, est représenté en Figure 3. L'extrémité 3' du transcrit est alors polyadénylée à hauteur de 250 à 300 adénines chez l'Homme, et entre 70 et 80 nucléotides chez la levure. Parallèlement, le fragment de transcrit en cours de synthèse toujours localisé au niveau de Pol II est dissocié de l'ADN génomique par l'action d'une ATPase, la senataxin (SETX), permettant sa dégradation par l'exoribonucléase XRN2, selon le modèle de terminaison *torpedo*. Un autre modèle de terminaison de la transcription, nommé modèle allostérique, a été proposé, pour lequel la perte de facteurs d'élongation et/ou des changements conformationnels au niveau de Pol II après polyadénylation sont responsables de la déstabilisation du complexe d'élongation, menant à l'arrêt de la transcription.

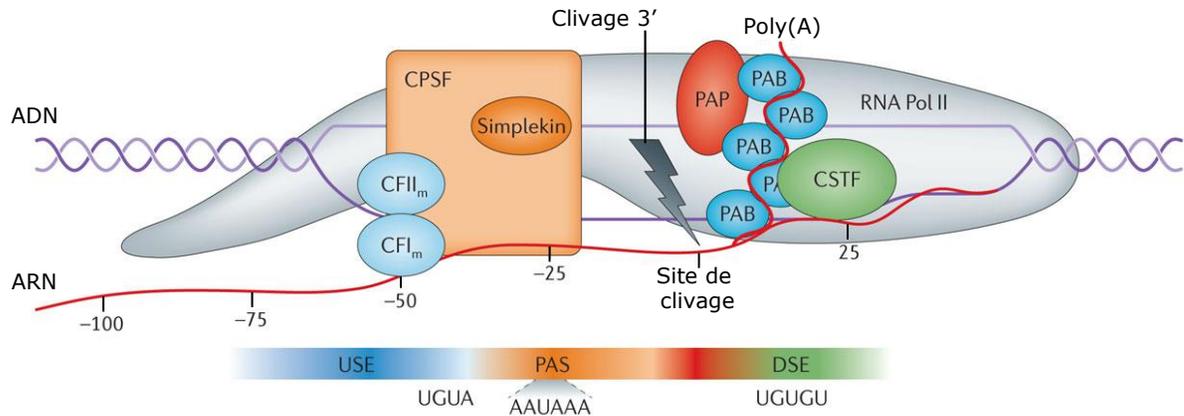


Figure 3 : Représentation schématique de la polyadénylation d'un transcrite. Les différents acteurs permettant le clivage et la polyadénylation d'un ARNm en cours de synthèse sont représentés avec des teintes de couleur concordantes ; à savoir le CPSF, le CstF et les facteurs de clivage CFI et CFI ainsi que les éléments *cis* reconnus par ces derniers, respectivement PAS, DSE et USE. La matrice ADN double-brin, l'ARN en cours de formation ainsi que les protéines Pol II, PAP, Simplekin et *Poly(A)-Binding-Protein* (PAB) sont également représentés (adapté de (Elkon et al., 2013)).

À noter que des événements de polyadénylation alternatifs (APA) peuvent avoir lieu. Les APA contribuent à la complexité du transcriptome en générant des isoformes présentant des extrémités 3' UTR (région 3' non traduite) différentes ou des séquences codantes différentes. Comme des séquences 3' UTR plus longues peuvent contenir des sites cibles de micro-ARN ou de protéines spécifiques, ces différences de séquences peuvent entraîner des changements dans la localisation cellulaire du transcrite, sa stabilité ou l'efficacité de sa traduction. L'utilisation des APA est ainsi impliquée dans différents processus, comme le développement et la différenciation cellulaire, la prolifération ou encore l'activation des neurones. La polyadénylation des transcrits est donc un processus finement régulé.

1.1.3.1 Protéines se liant à la queue poly(A) (PAB) :

La queue poly(A) des ARNm peut s'associer à des protéines nommées *Poly(A)-Binding-Protein* (PAB). Selon les espèces, il existe une ou plusieurs PAB cytoplasmiques (PABPC) mais une unique PAB nucléaire (PABPN). Les PABPC sont caractérisées par la présence de quatre domaines de reconnaissance de l'ARN (RRM) d'une taille de 90 à 100 acides aminés chacun situés en N-terminal. Chaque RRM possède deux séquences consensus RNP-1 et RNP-2 (*RiboNucleoProtein domain-1* et *-2*), localisées au centre de la structure globulaire du RRM formée par ses quatre feuillets β et ses deux hélices α . La partie C-terminale de certaines PABPC présente un domaine

contenant cinq hélices α appelé MLLE en raison de la présence de motifs d'acides aminés répétés et très conservés M-L-L-E. Le dernier domaine RRM et le domaine MLLE des PABPC sont liés par une région intrinsèquement désorganisée riche en prolines et en méthionines. Cette région permet notamment la liaison coopérative des PABPC, leur faisant adopter une conformation qui offre une plus grande stabilité de liaison entre elles et avec la queue poly(A) (Lin et al., 2012a; Melo et al., 2003). La PABPN quant à elle, ne présente qu'un domaine RRM, une extrémité N-terminale riche en acides aminés chargés négativement et une extrémité C-terminal riche en arginines. Les différences de structure entre les PABPC et la PABPN permettent à ces protéines de jouer des rôles bien distincts vis-à-vis des ARNm. Ces différences seront principalement illustrées par les cas des protéines humaines PABPC1 et PABPN1 qui ont été fortement étudiées. L'organisation de ces deux protéines est illustrée en Figure 4.

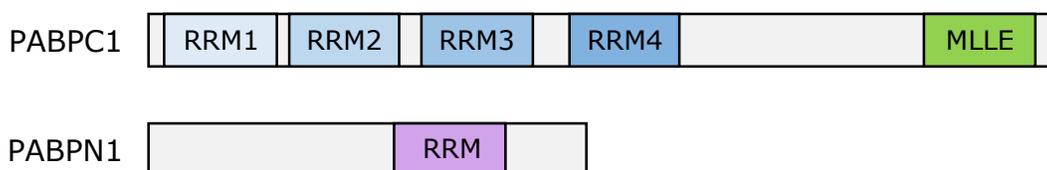


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation de PABPC1 et de PABPN1.

PABPC1 permet notamment la protection de la queue poly(A) contre l'activité de ribonucléases, avec une portée de protection allant jusqu'à 27 nucléotides par molécule PABPC1 dans le cas de longues extensions oligo(A) (Baer and Kornberg, 1983). Une propriété essentielle de PABPC1 est sa capacité à interagir avec de nombreuses protéines via ses domaines RRM et MLLE, et d'être ainsi impliquée dans la traduction ou la dégradation des ARNm au sein de mécanismes dont certains seront décrits plus tard dans ce manuscrit.

PABPN1, quant à elle, stimule la synthèse de la queue poly(A) mentionnée précédemment, en synergie avec CPSF (Eckmann et al., 2011; Kerwitz et al., 2003). PABPN1 a également été suggérée comme protéine régulatrice de la taille de la queue poly(A) en cours de synthèse. Un modèle a été proposé, où la liaison de plusieurs protéines PABPN1 au poly(A) engendre la formation d'une structure circulaire lorsque la queue poly(A) atteint une taille d'environ 250 adénosines, ce qui a pour effet de diminuer ou d'empêcher la stimulation de PAP par CPSF

aboutissant au ralentissement puis l'achèvement de la synthèse de la queue poly(A) (Kuhn et al., 2009). Une autre étude suggère que PABPN1 permettrait, en collaboration avec les PAP α et γ nucléaires, l'hyperadénylation de transcrits nouvellement synthétisés ou dont l'export est impossible, menant à leur dégradation par l'exosome (Bresson and Conrad, 2013). PABPN1 serait également impliquée dans l'épissage d'introns terminaux lors de phénomènes d'épissage post-polyadénylation de certains ARNm (Muniz et al., 2015). Une autre étude a suggéré que PABPN1 était en partie responsable de l'export nucléaire des ARNm par un mécanisme encore inconnu (Apponi et al., 2010).

1.1.4 Transport nucléo-cytoplasmique :

L'ARNm nouvellement synthétisé doit franchir l'enveloppe nucléaire pour pouvoir rejoindre le cytoplasme où il sera traduit en protéine. Pour ce faire, l'ARNm doit transiter à travers des complexes de pores nucléaires (NPC). Les NPC ont une taille d'environ 110 MDa et sont constitués de multiples copies d'une trentaine de nucléoporines. Ces nucléoporines forment dans la membrane nucléaire un anneau central, présentant une symétrie octogonale, qui s'étend par des fibrilles à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Dans le nucléoplasme, les fibrilles s'assemblent pour former un « panier nucléaire ». La première étape de l'export d'un ARNm hors du noyau est le recrutement du complexe de transport-export TREX (*T*Ranscription/*E*Xport complex), par les complexes THO, CBC et CPSF. Le facteur NXF1 (*Nuclear mRNA Export Factor 1*) est ensuite recruté par interaction directe avec des éléments de TREX et de la machinerie d'épissage. Ces interactions multiples assurent que seuls des ARNm matures seront exportés vers le cytoplasme. Des défauts dans ces mécanismes empêcheront le transport de l'ARNm qui sera alors dégradé par la machinerie de surveillance nucléaire. Les ARNm sont ensuite transférés à NXF1 et son co-facteur NXT1 (*NTF2-related export protein 1*). Par interaction avec des répétitions de résidus phénylalanine-glycine de certaines nucléoporines, qui recouvrent la structure centrale du NPC et forment une barrière de perméabilité, NXF1 et NXT1 permettent le transit des ARNm à travers le pore nucléaire. Une fois arrivé dans le cytoplasme, l'ARNm peut être décodé afin de permettre la synthèse de protéines lors de la traduction.

1.1.5 Traduction :

La traduction est un processus complexe constitué de plusieurs étapes mettant en jeu de nombreux acteurs, le principal d'entre eux étant le ribosome. Ce dernier progresse depuis l'extrémité 5' de

l'ARNm jusqu'au codon stop, et permet la synthèse des protéines par liaison consécutive des différents acides aminés qui les constituent. Cet assemblage s'effectue selon le code génétique, qui associe pour chaque triplet de nucléotides de l'ARNm, appelé codon, un acide aminé. Le ribosome est un complexe nucléo-protéique de grande taille : 4,3 MDa chez les eucaryotes supérieurs. Les ribosomes possèdent deux sous-unités nommées selon leur vitesse de sédimentation : les sous-unités 40S et 60S regroupées en un ribosome 80S. La petite sous-unité 40S est constituée de 33 protéines ainsi que de l'ARN ribosomique (ARNr) 18S, tandis que la grande sous-unité est constituée de 47 protéines et de trois ARNr, l'ARNr 5S, l'ARNr 5,8S et l'ARNr 28S. Lors de la traduction, la petite sous-unité du ribosome est responsable de l'association d'un ARN de transfert (ARNt) activé avec un acide aminé, également appelé aminoacyl-ARNt, à l'ARNm par appariement de l'anticodon de l'ARNt avec le codon de l'ARNm correspondant. La petite sous-unité possède trois sites de liaison aux ARNt, les sites A, P et E permettant respectivement le lien avec l' aminoacyl-ARNt à son entrée dans le ribosome, la liaison au peptidyl-ARNt, et enfin la liaison à l'ARNt en voie de sortie. La grande sous-unité catalyse la formation de la liaison peptidique entre les acides aminés constituant la protéine en cours de synthèse. Elle possède également les trois sites de liaison aux ARNt, A, P et E, un tunnel de sortie pour le polypeptide synthétisé, ainsi que le centre peptidyl transférase qui est une région conservée principalement composée d'ARNr et responsable de la formation de la liaison peptidique. La traduction débute au niveau d'un codon initiateur AUG situé en 5' de l'ARNm, et s'achève au niveau d'un codon stop, UAA, UAG ou UGA, situé en 3'. Mais avant cela, le ribosome doit être recruté à l'ARNm durant l'initiation de la traduction, présentée ci-après.

1.1.5.1 Initiation de la traduction :

L'initiation de la traduction est un processus complexe qui monopolise de nombreux acteurs et qui a pour but d'assembler les sous-unités ribosomales 60S et 40S en un ribosome 80S apte à l'élongation. L'initiation commence par la formation d'un complexe ternaire, constitué d'un méthionyl-tRNA ainsi que d'un facteur d'initiation eucaryote (eIF) eIF2 lié à du GTP. Ce complexe ternaire va s'associer à eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 ainsi qu'à la sous-unité ribosomale 40S pour former un complexe de pré-initiation 43S (PIC). Les eIF entraînent l'« ouverture » de la sous-unité 40S permettant l'amarrage et la stabilisation du complexe ternaire au site P de la sous-unité ribosomale 40S (Kolupaeva et al., 2005; Olsen et al., 2003). L'ARNm est lié par PABPC, par le complexe eIF4F, composé de la protéine se liant à la coiffe (eIF4E) ainsi que de l'hélicase eIF4A et de eIF4G.

À l'aide de la coiffe 7-méthylguanosine en 5', si l'on considère une initiation de la traduction canonique coiffe-dépendante, de eIF4B/eIF4H et des différents facteurs cités précédemment, le PIC peut ensuite être recruté au niveau de l'ARNm (Jackson et al., 2010). eIF4A, par son activité hélicase stimulée par eIF4B ou eIF4H, permet le déroulement des structures secondaires de la 5' UTR (région 5' non traduite) de l'ARNm en coopération avec une autre hélicase DHX29 (*DEAH-Box Helicase 29*) (Pisareva et al., 2008; Rogers et al., 2001), facilitant ainsi l'arrivée du PIC. D'autre part eIF4G, en interagissant avec eIF4E et PABPC, permet la circularisation de l'ARNm facilitant ainsi les cycles terminaison-initiation de la traduction du messager (Uchida et al., 2002). Une fois le messager lié au PIC, le balayage de la 5' UTR de l'ARNm commence afin de positionner le PIC au niveau du codon initiateur AUG. Une fois ce codon atteint, eIF1 se dissocie du PIC, permettant ainsi la transition d'eIF2-GTP à eIF2-GDP par libération de phosphate inorganique causant la fermeture du PIC et l'arrêt de la phase de balayage de la 5' UTR. Vient ensuite la dissociation d'eIF2-GDP d'avec eIF5 permettant à eIF5B de recruter la grande sous-unité 60S du ribosome (Pestova et al., 2000). L'hydrolyse de GTP par l'activité GTPase d'eIF5B permet un changement de la conformation du complexe 80S qui, après départ d'eIF1A, permettra le commencement de la traduction. Pour un ARNm donné, un ou plusieurs ribosomes peuvent le traduire simultanément, constituant dans ce dernier cas un polysome.

1.1.5.2 Élongation de la traduction :

L'élongation s'effectue d'abord par le fait qu'un complexe ternaire eEF1A-GTP-aminoacyl-ARNt permet le recrutement de l'aminoacyl-ARNt au ribosome 80S en positionnant la boucle anti-codon de l'ARNt au contact du codon complémentaire de l'ARNm au niveau du site A de la petite sous-unité 40S. L'appariement du codon avec l'anti-codon permet l'hydrolyse du GTP par le facteur d'élongation eucaryote 1A (eEF1A), entraînant la dissociation d'eEF1A-GDP ce qui permet l'accommodation de l'aminoacyl-ARNt au niveau du site A. Vient ensuite la formation de la liaison peptidique entre le nouvel acide aminé, en position A, et le polypeptide en cours de synthèse, en position P, catalysée par le centre peptidyl transférase et aboutissant à un peptidyl-ARNt allongé d'un acide aminé en position A. Simultanément à la formation de la liaison peptidique, les ARNt en position A et P adoptent un état hybride suite au décalage de la sous-unité 60S, durant lequel leurs extrémités amino-acétylées se décalent respectivement au niveau des sites P et E de la grande sous-unité. La petite sous-unité, fortement favorisée par la venue et l'hydrolyse d'eEF2-GTP, peut se déplacer le long de l'ARNm sur une distance de 3 nucléotides, l'équivalent d'un codon,

permettant ainsi à l'ARNt désamino-acétylé ainsi qu'au peptidyl-ARNt de se positionner totalement au niveau des sites E et P, respectivement. Le site A est ainsi de nouveau libre pour un nouveau cycle d'élongation (Figure 5). Ce processus se répète du codon initiateur jusqu'au codon stop au niveau duquel se déclenche la terminaison de la traduction.

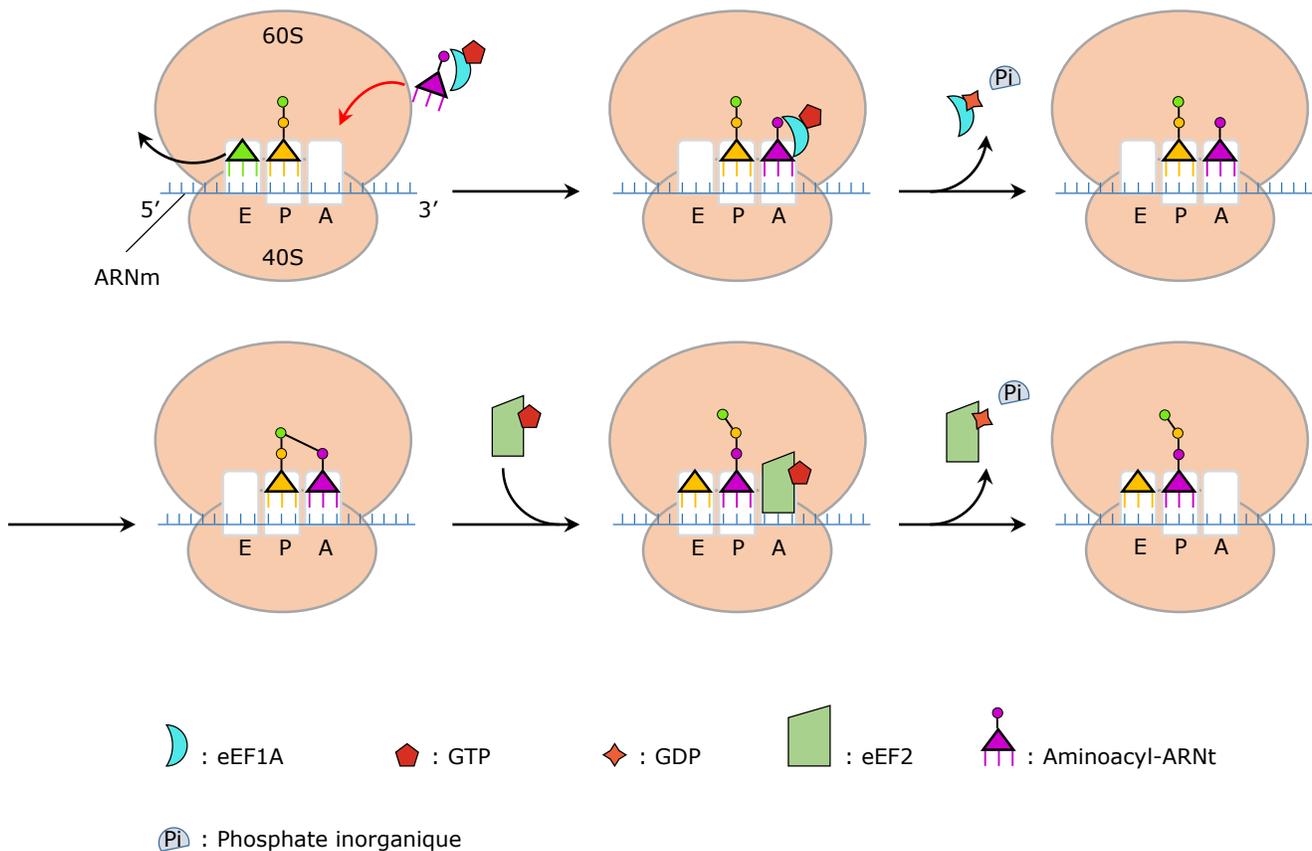


Figure 5 : Représentation schématique de l'étape d'élongation de la traduction. Les différents acteurs de l'élongation de la traduction, à savoir l'ARNm, les sous-unités ribosomales 60S et 40S, eEF1A, eEF2 ainsi que les aminoacyl-ARNt sont représentés.

1.1.5.3 Terminaison de la traduction :

La terminaison va avoir lieu quand l'un des trois codons stop se trouve au niveau du site A du ribosome. La terminaison chez les eucaryotes implique deux facteurs majeurs, les facteurs eucaryotes de terminaison eRF1 et eRF3, qui coopèrent afin de mener à bien ce processus. eRF1 reconnaît les codons stop avec une grande fidélité et permet l'hydrolyse du peptidyl-ARNt au niveau du centre peptidyl transférase, engendrant la libération du peptide synthétisé du ribosome. eRF1 a la forme d'un ARNt et est composée de trois domaines. Son

extrémité N-terminale permet la reconnaissance des codons stop à l'aide d'un motif NIKS, reconnaissance qui est également favorisée par un motif YxCxxxF (Song et al., 2000). Le domaine central (M) contient un motif GGQ permettant l'hydrolyse du peptidyl-ARNt. Quant à l'extrémité C-terminale d'eRF1, elle lui permet d'interagir avec eRF3 (Cheng et al., 2009). Ce facteur est une GTPase qui possède une partie N-terminale variable, permettant notamment son interaction avec PABPC (Ivanov et al., 2008), tandis que son extrémité C-terminale lui permet d'interagir avec les domaines M et C-terminaux d'eRF1. Les protéines eRF1 et eRF3 coopèrent dans la terminaison de la traduction en s'associant préalablement en un complexe eRF1-eRF3-GTP. Ce complexe se lie au site A du ribosome, puis l'hydrolyse du GTP permet le dépôt du domaine M d'eRF1 au niveau du centre peptidyl transférase du ribosome et la libération d'eRF3. L'action d'une ATPase, ABCE1 (*ATP-binding cassette sub-family E member 1*) chez les mammifères ou Rli1 (*RNase L inhibitor 1*) chez la levure, va permettre d'ajuster la position du motif GGQ d'eRF1 au niveau du centre peptidyl transférase, entraînant l'hydrolyse du peptidyl-ARNt et ainsi la libération du peptide synthétisé du ribosome, et la séparation des deux sous-unités du ribosome.

1.2 Dégradation cytoplasmique de l'ARNm :

La dégradation des ARNm dans le cytoplasme est une étape importante de l'expression des gènes car elle permet une régulation fine de l'expression génique comme cela a été révélé par des analyses à grande échelle (Khodursky and Bernstein, 2003; Rabani et al., 2011). Les voies de dégradation cytoplasmique des ARNm peuvent être divisées en deux sous-groupes : les voies de dégradation affectant des ARNm fonctionnels et les voies de dégradation relevant du contrôle qualité des ARNm. Ces différentes voies sont détaillées ci-après.

1.2.1 Voies de dégradation des ARNm fonctionnels :

Comme présenté précédemment un ARNm mature possède à la fois une coiffe 7-méthylguanosine en 5' ainsi qu'une queue poly(A) en 3', structures qui, avec les protéines qui les reconnaissent, protègent l'ARNm de sa dégradation par les exonucléases. La dégradation d'un ARNm ne peut donc s'effectuer que si l'une de ces deux structures est dégradée ou si l'ARNm est attaqué de manière interne par une endonucléase. Pour la plupart des ARNm eucaryotes, il a été observé que leur dégradation est initiée par le raccourcissement de leur queue poly(A), étape dite de désadénylation. Ensuite, le corps de l'ARNm est dégradé de 5' vers 3' ou de 3' vers 5'. Les voies de dégradation générales 5'-3' et 3'-5' des ARNm fonctionnels ont été rassemblées dans un schéma

récapitulatif en Figure 6 et sont décrites ci-dessous, alors que l'étape de désadénylation sera décrite plus largement dans un autre chapitre.

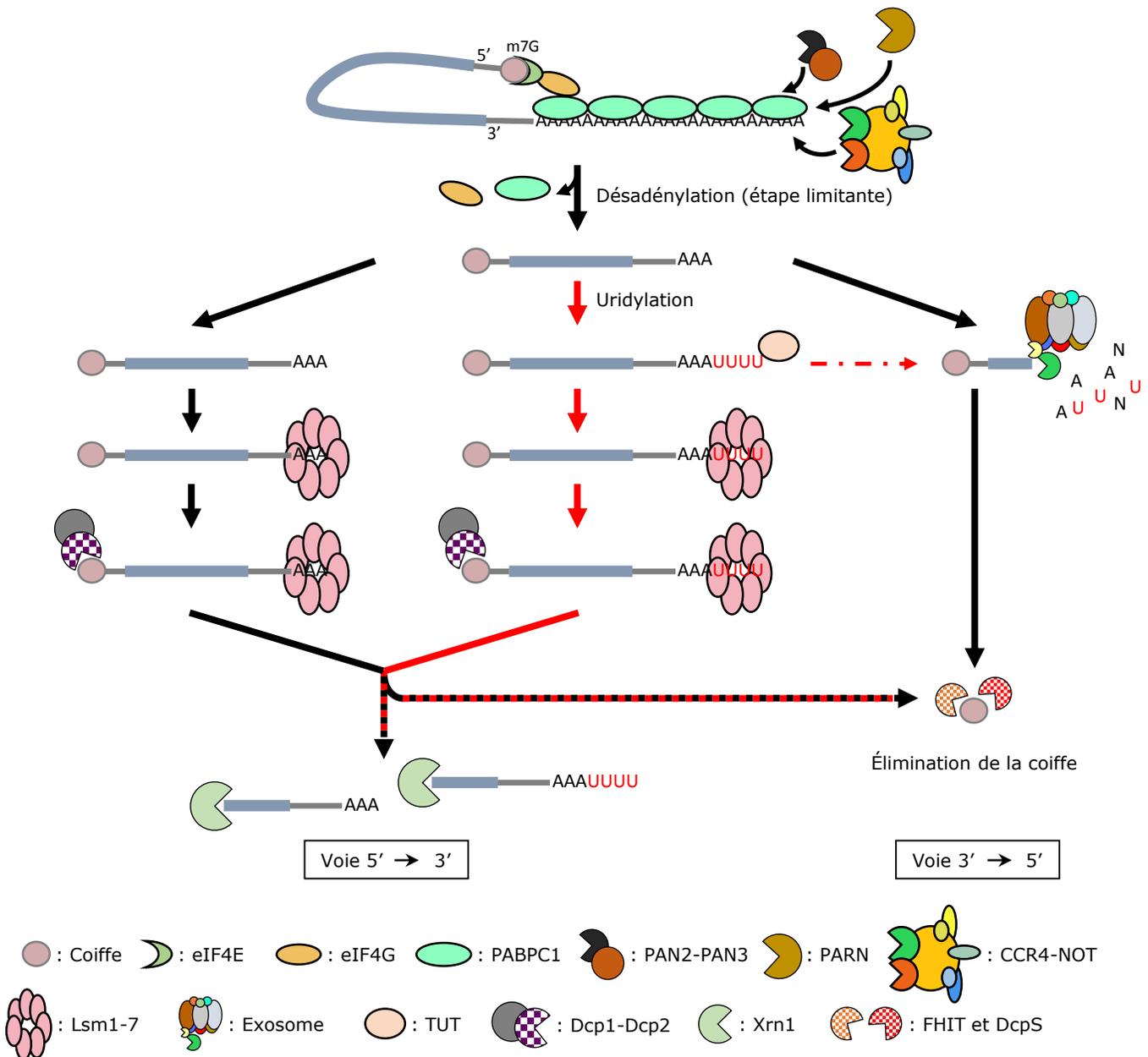


Figure 6 : Voies de dégradation des ARNm fonctionnels.
 Les acteurs principaux des voies de dégradation des ARNm fonctionnels de 5' en 3' et de 3' en 5' sont représentés.

1.2.1.1 Voie de dégradation de 5' en 3' :

Dans cette voie, initiée après le raccourcissement de la queue poly(A), la coiffe de l'ARNm est hydrolysée. Cette réaction est catalysée par un complexe, le complexe DCP1-DCP2 (*mRNA*-

decapping enzyme 1-2). DCP2, qui possède l'activité catalytique, fait partie de la famille de protéines Nudix pyrophosphatase. DCP2 catalyse l'hydrolyse de la coiffe en libérant du m⁷GDP et un ARNm 5'-monophosphate (Wang et al., 2002). Chez la levure, le complexe DCP1-DCP2 se forme sans l'aide de cofacteurs, tandis que chez l'humain, le cofacteur HEDLS/EDC4/GE-1 (*Human enhancer of decapping large subunit/Enhancer of mRNA-decapping protein 4/Autoantigen Ge-1* ; dGe-1 chez *Drosophila melanogaster* ; VARICOSE chez *Arabidopsis thaliana*) permet une interaction stable entre DCP1 et DCP2 (Fenger-Gron et al., 2005). Le complexe DCP1-DCP2 est régulé par diverses protéines inhibitrices et activatrices. Certaines protéines inhibitrices de DCP1-DCP2, à l'image d'eIF4E et de PABPC, sont impliquées dans la traduction étant donné que ces deux processus sont antagonistes (Caponigro and Parker, 1995; Ramirez et al., 2002; Schwartz and Parker, 2000). Pour ce qui est des activateurs, il en existe plusieurs : l'hélicase DDX6 pour *DEAD box protein 6* (appelé Dhh1 pour *DExD/H-box helicase 1* chez la levure), PAT1 (*mRNA turnover protein 1*), le complexe LSM1-7 (*Sm-like protein 1-7*), EDC3, HEDLS mentionné précédemment ainsi que chez la levure Edc1 et Edc2. L'hélicase Dhh1, ainsi que la protéine d'échafaudage PAT1, favorisent l'hydrolyse de la coiffe par inhibition de la traduction (Coller and Parker, 2005). Par ailleurs PAT1 et EDC3 ont été identifiées comme protéines activatrices de la formation du complexe d'hydrolyse de la coiffe en liant LSM1-7, DDX6/Dhh1, DCP1 et DCP2. Le complexe LSM1-7, constitué de 7 protéines *Sm-like* formant une structure heptamérique en forme d'anneau, permet quant à lui une protection des transcrits contre des activités exonucléases 3'-5' de par sa forte affinité pour les ARNm oligoadénylés en 3' mais active l'hydrolyse de la coiffe. Il a notamment été montré *in vitro* en utilisant des extraits de cellules humaines immortalisées que LSM1-7 facilite l'hydrolyse de la coiffe en 5' ainsi que la stabilisation des transcrits en évitant leur dégradation de 3' en 5', permettant de privilégier la dégradation de 5' en 3' (Song and Kiledjian, 2007). De plus, il a été montré chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* que LSM1-7 est essentiel dans la reconnaissance de résidus uridines présents sur des transcrits uridylés en 3' par la terminal uridyl transférase (TUT) CID1 (*Caffeine-Induced Death protein 1*), permettant le recrutement de facteurs d'hydrolyse de la coiffe (Rissland and Norbury, 2009). L'observation chez les mammifères d'une augmentation de l'uridylation de transcrits présentant de courtes queues poly(A) en l'absence de LSM1 suggère très fortement que chez les mammifères aussi les transcrits uridylés sont reconnus par LSM1-7, puis sont dégradés de 5' en 3' après hydrolyse de leur coiffe (Lim et al., 2014). Une fois la coiffe en 5' hydrolysée, la dégradation

de 5' en 3' du corps de l'ARNm s'effectue grâce à la 5'-3' exoribonucléase 1 XRN1, une exoribonucléase processive reconnaissant les extrémités 5' monophosphate des transcrits dont la coiffe a été hydrolysée, et pouvant être directement recrutée sur les transcrits via DCP1 chez l'humain. (Braun et al., 2012; Jinek et al., 2011).

1.2.1.2 Les P-bodies :

Des structures enrichies en particules ribonucléo-protéiques (RNP), nommés P-bodies pour *Processing-bodies*, ont été détectées dans le cytoplasme. Ces P-bodies concentrent de nombreux acteurs permettant la dégradation des ARN de 5' vers 3', comme l'exoribonucléase 5'-3' XRN1, certaines protéines impliquées dans l'hydrolyse de la coiffe comme le complexe DCP1-DCP2, les protéines EDC1, EDC2 et EDC3 ou encore le complexe LSM1-7, ainsi que des protéines responsables de la répression de la traduction comme PAT1 ou Dhh1/DDX6 (Buchan et al., 2008; Cougot et al., 2004; Neef and Thiele, 2009; Sheth and Parker, 2003). Il a été montré que les protéines Dhh1/DDX6, 4E-T et LSM14A sont nécessaires à la formation des P-bodies (Ayache et al., 2015). Des acteurs du contrôle qualité des ARNm, ou de leur dégradation ciblée par micro-ARN, présentés plus loin dans ce manuscrit, comme les protéines UPF1-3 (*ATP-dependent RNA helicase UP Frameshift 1-3*) ou GW182 (*Glycine-tryptophan protein of 182 kDa*) respectivement, peuvent également être localisés au niveau des P-bodies (Durand et al., 2007; Eystathioy et al., 2003; Sheth and Parker, 2006). La formation des P-bodies est augmentée en cas de stress induisant l'inhibition de l'initiation de la traduction et est régulée en fonction de la quantité d'ARNm non engagés dans la traduction (Kedersha et al., 2005; Pillai et al., 2005; Teixeira et al., 2005). L'hypothèse associée est qu'en cas de stress, en plus de leur association dans des granules de stress, les ARNm sont soit dégradés, soit stockés dans les P-bodies avant d'être réinsérés dans le circuit de la traduction une fois l'état de stress passé. Cette hypothèse est étayée par le fait que d'une part, chez la levure, une augmentation de la dégradation des ARNm est constatée en cas de stress par carence en glucose, et que d'autre part la levée d'un tel stress entraîne la disparition des ARNm des P-bodies à condition que l'initiation de la traduction soit possible (Arribere et al., 2011; Brengues et al., 2005).

1.2.1.3 Voie de dégradation de 3' en 5' :

La dégradation d'un ARNm de 3' en 5' après désadénylation peut également avoir lieu et est assurée par l'exosome, un complexe à activités exonucléase et endonucléase, composé de plusieurs

sous-unités. L'exosome est présent à la fois dans le cytoplasme où il permet la dégradation des ARNm, et dans le noyau où il permet la maturation des ARN ribosomiaux, des petits ARN nucléaires (snARN) et des snoARN ainsi que la dégradation des résidus de maturation et des transcrits aberrants. Ici nous ne présenterons que la structure et l'activité de l'exosome cytoplasmique.

La structure de l'exosome est conservée chez tous les eucaryotes. Le cœur de l'exosome est constitué de 3 hétérodimères, RRP41-RRP45 (*Ribosomal RNA-processing protein 41-45*), RRP46-RRP43 et MTR3-RRP42 (*mRNA Transport Regulator 3-RRP42*) qui forment ensemble une structure en anneau ne possédant aucune activité catalytique chez la levure ou l'Homme malgré leur similarité de séquence et de structure avec la RNase PH bactérienne. Par contre, chez les plantes, le cœur de l'exosome a conservé une activité phosphorolytique due à RRP41 (Liu et al., 2006). Cette structure centrale n'est pas stable *in vitro* et requiert trois autres facteurs afin de stabiliser le complexe, RRP4, CSL4 (*CEP1 synthetic lethal protein 4*) ainsi que RRP40 qui forment une « coiffe » possédant des domaines de liaison à l'ARN de type KH (*K-homology domain*) ou S1 (*ribosomal protein S1*). L'activité enzymatique du complexe est quant à elle assurée par RRP44/DIS3 (RRP44/*Chromosomal disjunction protein 3*). RRP44/DIS3 et la RNase II présentent une architecture similaire, avec deux domaines *cold-shock* (CSD), un domaine exonucléase et un domaine C-terminal de liaison à l'ARN de type S1. De plus RRP44/DIS3 présente un domaine N-terminal piIT (PIN), lui conférant une structure particulière qui lui permet de posséder une activité endonucléase en plus d'une activité 3'-5' exonucléase (Lebreton et al., 2008; Lorentzen et al., 2008). Au niveau du cytoplasme, l'exosome peut également s'associer au complexe SKI. Ce complexe est composé de l'hélicase SKI2, de SKI3, et de deux copies de SKI8. Chez la levure, l'exosome s'associe également avec la protéine SKI7, qui fait partie de la même famille de GTPase qu'eRF3 et eEF1A en raison de sa structure C-terminale homologue aux protéines de cette famille. En revanche, le domaine N-terminal de SKI7, non conservé, permet son interaction avec l'exosome et le complexe SKI, et est nécessaire à l'activité de l'exosome.

Outre des acteurs protéiques, des modifications post-transcriptionnelles permettent de recruter l'exosome. En effet, l'uridylation des extrémités 3' des ARNm d'histones, qui ne possèdent pas de queue poly(A) chez les eucaryotes supérieurs, joue un rôle dans le recrutement de l'exosome sur ces messagers (Mullen and Marzluff, 2008). Ce mécanisme est peut-être un moyen plus général de

sélection de cibles pour l'exosome étant donné que RRP44 a une plus grande affinité pour les séquences riches en AU que pour les extensions oligo(A) (Liu et al., 2006).

1.2.1.4 Élimination de la coiffe :

La dernière étape de la dégradation d'un ARNm est de débarrasser la cellule de reliquats de coiffe qui pourraient monopoliser des partenaires de la coiffe et ainsi diminuer leur activité, entraînant une diminution de mécanismes majeurs comme la traduction. Dans la voie de dégradation 3'-5', la dégradation totale du corps de l'ARNm par l'exosome entraîne la libération d'une coiffe dinucléotidique m⁷GpppN. Cette coiffe devient alors le substrat de l'enzyme éliminatrice de la coiffe DCPS (*Decapping scavenger enzyme*), une pyrophosphatase membre de la super-famille histidine triad (HIT), qui permet sa conversion en m⁷Gp et ppN (Liu et al., 2002). DCPS peut également exercer son activité catalytique sur le produit d'hydrolyse de la coiffe m⁷Gpp, généré lors de la dégradation de 5' en 3' d'un ARNm. Dans ce cas précis, le m⁷Gpp est converti en m⁷Gppp qui est hydrolysé en m⁷Gp par DCPS (Taverniti and Seraphin, 2015). DCPS joue un rôle important dans le développement chez l'humain, étant donné qu'une perte d'activité de DCPS a récemment été associée à des défauts neuromusculaires et intellectuels ainsi qu'à des anomalies cranofaciales (Ng et al., 2015). La protéine de levure Aph1 (*AP3A hydrolase*) ainsi que son homologue mammifère FHIT (*Fragile Histidine Triad protein*), un suppresseur de tumeurs, ont également été identifiés *in vivo* et *in vitro* comme enzymes de clivage de la coiffe agissant de concert avec DCPS (Taverniti and Seraphin, 2015). Chez les métazoaires, le m⁷Gp obtenu par dégradation 3'-5' ou 5'-3' est ensuite pris en charge par cNII (*cytosolic Nucleotidase II*), une phosphatase spécifique des N7-méthyl-guanosines, pour permettre la libération d'un phosphate inorganique (Buschmann et al., 2013).

1.2.2 Voies de contrôle qualité des ARNm :

Le contrôle qualité des ARNm est essentiel afin d'assurer une production de protéines fonctionnelles. En effet, la présence d'ARNm dont la synthèse et/ou la maturation ont été défectueuses peut engendrer la production de protéines toxiques dont l'accumulation pourrait être fatale à la cellule. Par ailleurs, la cellule fait face à tout instant à divers stress engendrant des modifications au niveau des acides nucléiques, tels que l'exposition aux rayons Ultra-Violet ou la génération d'ions superoxydes dans l'environnement cellulaire. Des voies de contrôle sont donc nécessaires pour pallier ces événements.

1.2.2.1 *Non-sense-Mediated mRNA Decay (NMD) :*

L'une des voies de contrôle qualité des ARNm que possède la cellule est le *Non-sense-Mediated mRNA Decay* (NMD), qui permet la reconnaissance ainsi que l'élimination de transcrits présentant des codons de terminaison précoces.

Chez les métazoaires, les cibles reconnues par le NMD présentent généralement un codon stop positionné plus de 50 à 55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon, ou une longue région 3' UTR. Les codons responsables du recrutement de la machinerie de NMD sont appelés codon de terminaison prématurés (PTC) (Losson and Lacroute, 1979). Les PTC peuvent apparaître à l'issue de divers mécanismes. L'un d'eux est l'épissage lors de la maturation des ARNm qui peut aboutir soit à un décalage du cadre de lecture dans la région codante, par rétention d'intron ou par délétion d'un exon, soit à l'inclusion d'un exon présentant un PTC (McGlinchy and Smith, 2008). Les PTC peuvent également apparaître à la suite d'erreurs de transcription, d'évènements de recombinaison ou de mutations génétiques. Un des acteurs principaux du NMD est UPF1 (*ATP-dependent RNA helicase UP Frameshift*). En effet, UPF1 se lie de manière non spécifique à l'ARN et peut également interagir avec eRF3, l'un des facteurs de terminaison de la traduction, ce qui permet le recrutement ultérieur de UPF2 et UPF3 par UPF1 (Lykke-Andersen et al., 2000). Chez les eucaryotes supérieurs, ce mécanisme est facilité par la présence d'un complexe EJC lié à la nouvelle 3' UTR engendrée par le PTC (Chamieh et al., 2008). L'assemblage d'un complexe activant le NMD au niveau d'un PTC peut alors s'effectuer. Ce complexe est constitué de SMG1 (*Suppressor of Morphogenetic effect on Genitalia 1*), SMG8, SMG9, du complexe EJC ainsi que de DHX34 (*DEAH box polypeptide 34*) (Hug and Caceres, 2014; Yamashita et al., 2009). L'assemblage de ce complexe fonctionnel permet la terminaison de la traduction par dissociation des ribosomes. UPF1 peut s'associer à PNRC2 (*Pro-rich Nuclear Receptor Co-activator 2*) qui peut à son tour recruter le complexe DCP1-DCP2, permettant ainsi l'hydrolyse de la coiffe de l'ARNm cible (Lai et al., 2012). La dégradation des cibles est également rendue possible après phosphorylation d'UPF1 par SMG1, permettant le recrutement de SMG6 qui assurera le clivage endonucléolytique de l'ARNm (Huntzinger et al., 2008). UPF1 peut également s'associer à l'hétérodimère SMG5-SMG7 qui peut ensuite recruter le complexe CCR4-NOT permettant la désadénylation du transcrit (Loh et al., 2013). L'hydrolyse de la coiffe, combinée à un clivage endonucléolytique ainsi qu'à la désadénylation du transcrit, permet la dégradation complète de l'ARNm par des exonucléases 5'-3', comme XRN1, ou 3'-5', comme l'exosome.

1.2.2.2 Non-Stop Decay (NSD) :

Une autre voie de contrôle qualité des ARNm est le *Non-Stop Decay*. Cette voie de régulation est employée par la cellule lorsqu'un transcrit ne présente aucun codon de terminaison. Des transcrits de ce type peuvent apparaître par erreur de maturation engendrant une polyadénylation prématurée dans une séquence codante. Ce mécanisme de régulation a été amplement étudié chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ces travaux ont permis d'identifier SKI7 comme un acteur requis pour la dégradation des cibles du NSD de manière co-translationnelle. SKI7 est supposée s'associer au site A du ribosome et ainsi recruter l'exosome au niveau d'un ARNm présentant un ribosome bloqué au niveau de son extrémité 3' (van Hoof et al., 2002). Deux autres facteurs sont impliqués dans le NSD : Hbs1, un autre paralogue d'eRF3, ainsi que son partenaire Dom34. Le complexe Hbs1-Dom34, en coopération avec Rli1, une ATPase responsable du recyclage des ribosomes, permet le désassemblage des ribosomes se retrouvant bloqués au niveau de l'extrémité d'un transcrit (Shoemaker and Green, 2011; van den Elzen et al., 2014).

Chez les mammifères, SKI7 n'a pas été définitivement identifié, mais les transcrits *non-stop* sont tout de même dégradés de manière co-translationnelle. Le mécanisme requiert HBS1, PELOTA, l'homologue de Dom34 chez les mammifères, ainsi que des membres du complexe SKI-exosome à savoir SKI2 et DIS3 (Saito et al., 2013). À noter également que, comme ABCE1, l'orthologue de Rli1 chez les mammifères, participe à la dissociation des ribosomes bloqués lors de la traduction, cette protéine est très vraisemblablement aussi impliquée dans le NSD chez l'Homme (Pisareva et al., 2011).

1.2.2.3 No-Go Decay (NGD) :

Une autre voie de contrôle qualité est le *No-Go Decay*. Cette voie permet la dégradation de transcrits présentant des ribosomes bloqués durant le processus d'élongation. Plusieurs éléments caractéristiques de l'ARN peuvent activer le NGD, comme les structures en tige-boucle, la présence de répétition de codons rares, d'extensions poly-lysines dues à la traduction de la queue poly(A), ou encore la dépurination de l'ARNm (Doma and Parker, 2006; Gandhi et al., 2008; Tsuboi et al., 2012). À l'instar du NSD, le NGD peut utiliser l'activité du complexe Hbs1-Dom34 chez la levure (van den Elzen et al., 2010). Cependant, ce complexe ne semble pas indispensable au clivage endonucléolytique des cibles du NGD, mais facilite la dissociation des ribosomes bloqués au niveau de l'ARNm (Passos et al., 2009; Tsuboi et al., 2012; van den Elzen et al., 2014). Il a été constaté *in vitro* que plus l'ARN associé au ribosome est court, plus le complexe Hbs1-

Dom34 stimule la séparation du ribosome, suggérant ainsi que le recyclage des ribosomes par Hbs1-Dom34 s'effectue après le clivage endonucléolytique de la cible (Shoemaker and Green, 2011). Cependant, l'endonucléase impliquée dans le NGD n'a pas encore été identifiée, et très peu de données sont disponibles sur le NGD chez les métazoaires.

1.3 Réaction de désadénylation et protéines impliquées :

Comme présentée ci-dessus, la première étape de la dégradation d'un ARNm fonctionnel est généralement le raccourcissement progressif de sa queue poly(A) en 3'. Ce mécanisme, appelé désadénylation, régule la vitesse de dégradation des messagers, et est assuré par différentes enzymes nommées désadénylases. Ce processus est d'une importance capitale dans l'embryogenèse chez les eucaryotes, en permettant notamment l'inhibition de l'expression des ARNm maternels comme chez *Drosophila melanogaster* (Rouget et al., 2010). Ces exoribonucléases ont pour caractéristique d'être dépendantes d'ions Mg^{2+} et de catalyser la réaction d'hydrolyse de l'ARN de 3' en 5'. En se basant sur une comparaison de leur domaine catalytique, les désadénylases déjà identifiées peuvent être réparties en 2 catégories : les DEDD et les Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase (EEP). Les nucléases de type DEDD ont été nommées ainsi d'après quatre résidus catalytiques conservés D et E qui leur permettent de prendre en charge des ions métalliques (Zuo and Deutscher, 2001). Les membres désadénylases de cette famille sont CAF1 (*CCR4p-Associated Factor 1*), l'une des sous-unités catalytique du complexe CCR4-NOT qui est le complexe de désadénylation majoritaire chez les eucaryotes, CAF1Z, PARN (*Poly(A)-specific RiboNuclease*) et PAN2 (*PAN deadenylation complex catalytic subunit*), sous-unité catalytique du complexe désadénylase PAN (*Poly(A) Nuclease*). Les EEP quant à elles sont caractérisées par des résidus D et H conservés au sein de leur domaine nucléase. Les EEP comptent parmi elles CCR4 (*Carbon Catabolite Repressor Protein 4*), autre sous-unité catalytique du complexe CCR4-NOT, NOCTURNIN, ANGEL et les 2' PhosphoDiEsterase. La conservation de ces différentes désadénylases dans le vivant peut être très variable. Par exemple, les protéines CAF1 et PAN2 sont conservées chez tous les eucaryotes, tandis que CCR4 est absente chez les trypanosomes et que PARN et CAF1Z sont absentes chez les levures et chez *Drosophila melanogaster*. Nous ne détaillerons pas le cas du duo ANGEL/CAF1Z, étant donné que très peu de données sont connues à propos de ces protéines.

1.3.1 PARN, NOCTURNIN et PAN :

1.3.1.1 PARN :

PARN est une enzyme conservée dans de nombreux organismes eucaryotes, comme les trypanosomes, les moustiques, les plantes et les mammifères, mais est cependant absente chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Drosophila melanogaster*. Par ailleurs PARN n'est pas vitale pour *Caenorhabditis elegans* ou *Schizosaccharomyces pombe* (Reverdatto et al., 2004) ce qui suggère la présence de désadénylases redondantes permettant de pallier l'absence ou le défaut d'activité de PARN dans ces organismes. PARN forme un homo-dimère nécessaire à son activité en s'associant au niveau de son domaine exonucléase (Wu et al., 2005), et est capable de reconnaître la queue poly(A) mais également la coiffe 7-méthyl-guanosine présente en 5' des ARNm. L'interaction avec cette dernière permet une augmentation de la processivité de PARN accélérant ainsi la vitesse de dégradation de la queue poly(A). Plusieurs fonctions ont été attribuées à PARN mais certaines restent à confirmer. PARN pourrait être active à la fois au niveau nucléaire, où elle interviendrait dans la maturation de l'extrémité 3' des snoARN (Berndt et al., 2012) et dans la dégradation des transcrits suite à un endommagement de l'ADN (Cevher et al., 2010), et aussi au niveau cytoplasmique où elle participerait au raccourcissement de la queue poly(A) des ARNm dans le contrôle qualité des ARNm par recrutement lors du NMD (Lejeune et al., 2003). PARN est également impliquée dans le développement de certains eucaryotes, en permettant notamment la maturation par désadénylation des ARNm ovocytaires chez le xénope (Korner et al., 1998). Par ailleurs PARN est indispensable à la vie des plantes, étant donné qu'aucune plante mutante homozygote n'a pu être obtenue en utilisant plusieurs allèles mutants de PARN, tandis que les plantes hétérozygotes manifestent un fort retard dans leur développement par rapport aux plantes sauvages (Reverdatto et al., 2004).

1.3.1.2 NOCTURNIN :

Présente chez les métazoaires seulement, NOCTURNIN/NOC est une enzyme régulée par le cycle circadien, ce qui la différencie des autres désadénylases. En effet, le gène *NOC* peut être directement activé par le facteur de transcription hétérodimérique CLOCK/BMAL1 (*Circadian locomotor output cycles protein kaput/Brain and Muscle ARNt-like 1*), un élément central du cycle circadien responsable de la transcription circadienne d'un grand nombre de gènes (Li et al., 2008). Une autre caractéristique unique de *NOC* est que ce gène fait partie de la famille de gènes de réponse immédiate IEG (*Immediate Early Gene*) caractérisés par une réponse intense à divers

stimuli qui dans le cas de *NOC* peuvent être un choc en sérum, la présence de phorbol ester ou de lipopolysaccharides (LPS). Par exemple, l'expression de l'ARNm de *NOC* est augmentée dans l'intestin grêle de souris seulement 2 heures après gavage avec un liquide riche en lipides durant la journée (Douris et al., 2011). Il a notamment été constaté que des souris mutantes *NOC*^{-/-}, après administration d'un régime riche en graisse (HFD), ne deviennent pas obèses contrairement aux souris contrôles à activité physique et apport nutritif égal. Ceci est dû à un défaut de transit des lipides dans les entérocytes intestinaux, ce qui aboutit à une absorption inefficace dans le sang (Douris et al., 2011; Green et al., 2007). De plus, il a été récemment constaté que *NOC* joue un rôle dans la stabilité de transcrits liés à l'activité mitochondriale chez la souris, ce qui pourrait justifier en partie le phénotype métabolique des souris *Knock-Out* (KO) *NOC*^{-/-} (Kojima et al., 2015). Enfin, *NOC* a été impliqué en particulier dans la morphogénèse des ailes lors du stade de nymphe de *Drosophila melanogaster* (Gronke et al., 2009).

1.3.1.3 Le complexe PAN :

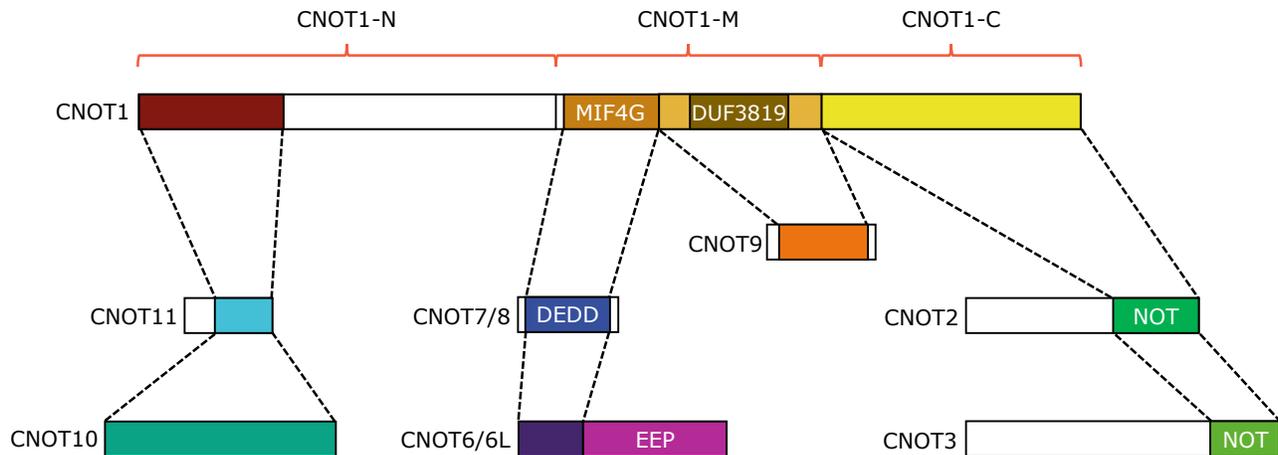
Le complexe PAN a été l'une des premières désadénylases découvertes. Comme CAF1 (voir ci-dessous), il est présent chez tous les eucaryotes. Ce complexe est constitué de deux sous-unités, PAN2 et PAN3 (Sachs and Deardorff, 1992; Uchida et al., 2004). La sous-unité catalytique est PAN2 et l'activité du complexe est liée à la présence de PABPC. En effet, par l'intermédiaire de PAN3 et de son motif PAM2 (*PABP-interacting Motif 2*) N-terminal, PAN s'associe au domaine C-terminal MLLE de PABPC (Siddiqui et al., 2007). Il a été observé *in vitro* que le complexe PAN de levure dégrade des substrats poly(A) jusqu'à une taille comprise entre 10 et 25 nucléotides (Lowell et al., 1992). Il a été constaté ultérieurement que des souches de levure mutantes, pour lesquelles l'expression de CCR4 ou de CAF1 était invalidée, présentaient des queues polyadénylées de taille similaire (Tucker et al., 2001), taille qui correspond approximativement au nombre de résidus protégés par la fixation d'une protéine PABPC sur la queue poly(A). Ceci suggère que le complexe PAN digère efficacement la queue poly(A) jusqu'au départ de la dernière molécule de PABPC. Outre le recrutement du complexe PAN par interaction avec PABPC, un autre moyen de recrutement de PAN à l'ARNm se fait via la machinerie des micro-ARN et le complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), décrits un peu plus loin dans ce manuscrit, qui peut dans ce cas précis aboutir à une désadénylation ciblée.

1.3.2 Le complexe CCR4-NOT :

Le complexe CCR4-NOT (*Carbon Catabolite Repression 4 - Negative On TATA-less*) est un complexe multiprotéique d'une taille approximative de 1 MDa, dont les différents membres ont d'abord été caractérisés chez la levure. Le gène *CCR4* a été identifié comme étant requis pour la régulation d'une enzyme réprimée par le glucose, l'alcool déshydrogénase 2 (*Adh2*) chez *Saccharomyces cerevisiae* (Denis, 1984). Le gène *CAF1* a quant à lui été identifié comme nécessaire à la levée de la répression induite par le glucose chez *Saccharomyces cerevisiae* (Sakai et al., 1992). Les protéines codées par ces deux gènes forment un complexe avec des protéines Not, identifiées par leur implication dans la régulation de la transcription du gène *HIS3* dénué de séquence TATA dans son promoteur (Collart and Struhl, 1994). Chez la levure, le cœur du complexe est constitué de CCR4, CAF1, Not1, Not2, Not3, Not4, Not5, CAF40 (40 kDa CCR4-Associated Factor) et CAF130 (130 kDa CCR4-Associated Factor), protéines conservées chez les eucaryotes supérieurs à l'exception de CAF130 et Not3/5 (voir ci-dessous). CNOT1 (*CCR4-NOT transcription complex subunit 1*), CNOT2, CNOT4 et CNOT9 sont les orthologues chez les mammifères des protéines Not1, Not2, Not4 et CAF40 respectivement. À noter que CNOT4, qui possède une activité E3 ubiquitine-ligase, n'est pas associée de manière stable au complexe chez les mammifères (Lau et al., 2009; Mauxion et al., 2013), chez *Drosophila melanogaster* (Temme et al., 2010) ou chez les trypanosomes (Schwede et al., 2008). Chez les mammifères, il existe deux orthologues mutuellement exclusifs de CCR4 : CNOT6/CCR4a et CNOT6L/CCR4b, et deux orthologues mutuellement exclusifs de CAF1 : CNOT7/CAF1a/CAF1 et CNOT8/CAF1b/CALIF/POP2 (Lau et al., 2009). Par souci de simplification, les termes génériques CAF1 et CCR4 seront utilisés dans la suite de ce manuscrit pour désigner l'un ou l'autre de ces paralogues, et d'une façon générale les désadénylases associées au complexe CCR4-NOT des familles DEDD et EEP respectivement de tous les eucaryotes, tandis que les termes CNOT6, CNOT6L, CNOT7 et CNOT8, correspondants à la nomenclature officielle dans l'espèce humaine, seront utilisés pour désigner spécifiquement un des paralogues. À l'inverse, la protéine CNOT3 des mammifères possède deux orthologues chez la levure, Not3 et Not5 (Albert et al., 2000). En outre, il a été démontré récemment que deux protéines, CNOT10 et CNOT11, étaient associées au complexe CCR4-NOT chez tous les eucaryotes à l'exception des champignons (Bawankar et al., 2013; Mauxion et al., 2013). Les différentes sous-unités du complexe CCR4-NOT ainsi que leurs domaines d'interaction sont schématisés en Figure 7. Les complexes de désadénylation eucaryotes

CCR4-NOT et PAN2-PAN3 sont ubiquitaires et coopèrent, dans toutes les cellules eucaryotes testées jusqu'à présent, à l'étape de raccourcissement de la queue poly(A) des ARNm en agissant de manière séquentielle. PAN2-PAN3 intervient en premier, tandis que CCR4-NOT permet d'achever le processus de désadénylation (Boeck et al., 1996; Yamashita et al., 2005).

A)



B)



Figure 7 : Composition du complexe CCR4-NOT humain.

A- Architecture du complexe CCR4-NOT chez l'humain

Les différentes sous-unités du complexe CCR4-NOT sont représentées et annotées. Les régions N-terminale (CNOT1-N), médiane (CNOT1-M) et C-terminale (CNOT1-C) de CNOT1 sont annotées. Les domaines permettant l'interaction des différentes sous-unités ainsi que les domaines MIF4G et DUF3819, pour CNOT1, DEDD, pour CNOT7/8, EEP, pour CNOT6/CNOT6L, et NOT-box, pour CNOT2 et CNOT3, sont également présentés en couleur et annotés (adapté de (Xu et al., 2014)).

B- Représentation schématique de CNOT4

Les deux domaines de liaison au zinc, RING et CCH, ainsi que le domaine de liaison à l'ARN RRM de CNOT4 sont présentés à l'échelle, en couleur et annotés. CNOT4 est représentée à part des autres sous-unités du complexe CCR4-NOT étant donné qu'elle n'interagit pas de façon stable avec le complexe.

Dans la suite de ce manuscrit, les différentes sous-unités du complexe CCR4-NOT seront décrites ainsi que leurs implications dans différentes pathologies si elles existent, en utilisant généralement la nomenclature officielle dans l'espèce humaine. Mais, avant d'aller plus en détails dans le rôle des diverses sous-unités du complexe, il est à noter que le complexe CCR4-NOT a été impliqué

dans plusieurs mécanismes cellulaires en plus de l'étape de désadénylation. En effet, chez la levure, différentes équipes ont suggéré l'implication du complexe dans des mécanismes aussi variés que la réparation de l'ADN (Mulder et al., 2005), la croissance cellulaire (Sakai et al., 1992), la méthylation des histones (Mulder et al., 2007), l'export des ARNm (Kerr et al., 2011) ainsi que le contrôle qualité des protéines (Halter et al., 2014). Le complexe a également été impliqué, chez les champignons pathogènes, dans l'intégrité de leur paroi ainsi que dans la susceptibilité aux drogues (Dagley et al., 2011).

1.3.2.1 CNOT1, clé de voûte du complexe CCR4-NOT :

CNOT1 est la sous-unité la plus imposante et une protéine d'échafaudage indispensable à la formation du complexe CCR4-NOT. Cette protéine est nécessaire à la vie de certains organismes comme *Saccharomyces cerevisiae* pour lequel l'absence de Not1 est létale (Maillet et al., 2000). Chez l'Homme, certains polymorphismes mono-nucléotidiques (SNP) de *CNOT1* ont été associés à une susceptibilité à la leucémie lymphoblastique aigüe chez l'enfant (ALL) (Gutierrez-Camino et al., 2014) ainsi qu'à une faible réponse à un traitement contre le virus d'immunodéficience humaine (VIH) (Moura et al., 2014). L'étude des interactions de CNOT1 avec les différentes sous-unités de CCR4-NOT ainsi que la résolution de la structure d'une grande partie de cette protéine ont permis de mieux comprendre l'assemblage du complexe CCR4-NOT. La protéine CNOT1 est constituée dans sa grande majorité de répétitions HEAT, qui sont des modules impliqués généralement dans des interactions protéine-protéine. CNOT1 interagit avec CNOT11 via sa région N-terminale, puis CNOT11 interagit avec CNOT10 (Bawankar et al., 2013; Mauxion et al., 2013). La région médiane de CNOT1 adopte un repliement similaire à un domaine d'eIF4G et a donc été nommée MIF4G pour *Middle domain of eukaryotic Initiation Factor 4G*. Cette région de CNOT1 permet l'interaction avec la désadénylase CAF1 (Basquin et al., 2012; Petit et al., 2012). La résolution de la structure de l'interaction Not1-CAF1-CCR4 chez la levure a permis de montrer que l'interaction entre ces trois protéines est essentielle à la croissance des levures et à la dégradation des ARNm (Basquin et al., 2012). Cette région de CNOT1 permet aussi l'interaction avec l'ARN hélicase DDX6, qui joue un rôle dans la répression de la traduction et dans l'activation de l'hydrolyse de la coiffe des ARNm, notamment lors de la répression médiée par les micro-ARN (voir ci-dessous). La protéine CNOT9 interagit avec le domaine DUF3819 (pour *Domain Of Unknown Function 3819* renommé ultérieurement CN9BD pour *CAF40/NOT9-Binding Domain*) de CNOT1 en aval de MIF4G (Bawankar et al., 2013; Chen et al., 2014; Mathys et al., 2014). La

région C-terminale de CNOT1 permet quant à elle l'interaction avec le complexe CNOT2-CNOT3 (Bhaskar et al., 2013; Boland et al., 2013). La fonction de protéine structurante de CNOT1 est révélée par le fait qu'une déplétion de CNOT1 dans des cellules HeLa aboutit à une forte diminution du niveau protéique de CNOT2, CNOT6L, CNOT7 ainsi que de CNOT9 suite à la déstabilisation du complexe et de ses sous-unités. Par ailleurs, les cellules appauvries en CNOT1 présentent moins de P-bodies que les contrôles, ainsi qu'une diminution de l'activité désadénylase du complexe CCR4-NOT, induisant finalement le mécanisme d'apoptose à la suite d'un stress du réticulum endoplasmique en raison d'une sur-production protéique (Ito et al., 2011). CNOT1 est également le site d'interactions directes avec des régulateurs de la désadénylation comme les protéines Nanos et Tristetraprolin (TTP) (Bhandari et al., 2014; Fabian et al., 2013).

1.3.2.2 Les sous-unités catalytiques :

1.3.2.2.1 CCR4 :

CCR4 est caractérisée dans sa structure par un domaine désadénylase C-terminal et un domaine N-terminal LRR (*Leucin Rich Repeat*). Ce dernier est essentiel pour la liaison à CAF1 et l'incorporation dans le complexe CCR4-NOT (Basquin et al., 2012). La structure du domaine catalytique de CNOT6L ainsi que des essais de dégradation *in vitro* ont permis d'identifier que CNOT6L a une plus grande affinité pour les extensions poly(A) ARN qu'ADN, confirmant son rôle préférentiellement désadénylase (Wang et al., 2010). À noter que CCR4 chez *Saccharomyces cerevisiae* présente un domaine d'activation de la transcription régulé par le glucose en N-terminal en amont du domaine LRR, qui est absent de ses orthologues chez d'autres espèces eucaryotes, comme *Mus Musculus*, *Drosophila melanogaster* ou *Homo sapiens* (Morita et al., 2007). L'implication de CCR4 dans le développement a été étudiée chez divers organismes. CCR4 joue un rôle important dans le développement ou le renouvellement des lignées germinales. En effet, chez *Drosophila melanogaster*, la mutation du gène *twin*, codant CCR4, entraîne une diminution des capacités reproductives des femelles ainsi qu'un défaut dans l'auto-renouvellement des cellules souches des lignées germinales (Morris et al., 2005). En particulier, CCR4 est recrutée au niveau de l'ARNm codant pour MEI-P26 (*Meiotic-P26*), un facteur de différenciation des cellules souches de la lignée germinale, à l'aide de deux répresseurs de la traduction, NANOS (Nos) et PUMILIO (Pum). Le recrutement de CCR4 permet la désadénylation de l'ARNm de MEI-P26 ainsi que l'inhibition de sa traduction, et *in fine* le renouvellement des cellules souches de la lignée germinale (Joly et al., 2013). CCR4 contribue aussi à la prolifération cellulaire chez l'humain, la liaison avec

CAF1 étant indispensable dans ce contexte (Mittal et al., 2011). Par ailleurs, des pertes de copies de *CNOT6L* ont été constatées dans des échantillons d'adénocarcinomes du colon (Tay et al., 2011), et l'expression de *CNOT6L* se trouve diminuée chez des patients souffrant d'ALL (Maragozidis et al., 2012). Cependant, l'expression de *CNOT6* se trouvait légèrement augmentée chez ces mêmes patients (Maragozidis et al., 2012), tandis que divers SNP du gène *CNOT6* ont été associés à une susceptibilité de développement de cette maladie (Gutierrez-Camino et al., 2014), suggérant que, malgré leur activité enzymatique et leur structure commune, *CNOT6* et *CNOT6L* peuvent jouer des rôles différents au sein de l'organisme. Cette hypothèse se trouve renforcée par le fait que *CNOT6* et *CNOT6L* sont exprimés de manière différente chez la souris, où *CNOT6L* est exprimé de façon ubiquitaire tandis que *CNOT6* est plus fortement exprimé dans les testicules, les ovaires, le thymus et la rate (Chen et al., 2011). La désadénylase CCR4 joue donc un rôle majeur dans le développement et la vie des organismes.

1.3.2.2.2 CAF1 :

Les deux orthologues de CAF1 chez l'humain, *CNOT7* et *CNOT8*, présentent une différence de sélectivité de substrats *in vitro*. En effet, tandis que *CNOT7* dégrade spécifiquement les queues poly(A), *CNOT8* peut dégrader efficacement un substrat ne présentant pas d'extension oligo(A) en 3' (Bianchin et al., 2005). Cependant, il a été observé par analyse de profil d'expression pangénomique (*genome-wide expression profiling*) que *CNOT7* et *CNOT8* régulent, à quelques exceptions près, le même lot de gènes, et ce malgré leurs différences de spécificité (Aslam et al., 2009). L'une des voies régulées par *CNOT7* semble être celle de la réponse immunitaire. En effet, il semblerait que *CNOT7* soit en partie responsable du contrôle des voies liées aux interférons (IFN) de classe I et II. *CNOT7* assurerait aussi la régulation du trafic intracellulaire de STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) en interagissant avec sa forme latente, tout en activant la dégradation des ARNm régulés par STAT1 à l'aide de son activité désadénylase (Chapat et al., 2013). L'expression de *CNOT7* et *CNOT8* est ubiquitaire chez des souris adultes, avec une expression plus forte dans le thymus, la rate, les ovaires et les testicules (Chen et al., 2011). Ainsi *CNOT7* est essentielle pour la fertilité chez les souris étant donné que des mâles *CNOT7* KO sont grandement impactés au niveau de la spermatogénèse, engendrant une infertilité sévère (Berthet et al., 2004). Une autre équipe a également montré que des souris mâles *CNOT7* KO étaient atteintes d'oligo-astheno-teratozoospermie, c'est-à-dire présentant une faible présence totale de spermatozoïdes, ces derniers ayant une morphologie et une motilité anormales (Nakamura

et al., 2004). Par ailleurs, les souris *CNOT7* KO présentent une masse osseuse plus importante, étant donné que *CNOT7* est un suppresseur de la voie de signalisation induite par la BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) (Washio-Oikawa et al., 2007). En plus d'être impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques, *CNOT7* et *CNOT8* semblent également jouer un rôle dans certains cancers. En effet, l'expression de *CNOT7* est diminuée chez des patients atteints de leucémies lymphoblastiques et de leucémies myéloïdes aiguës (AML) (Maragozidis et al., 2012), tandis que l'expression de *CNOT8* est augmentée dans des carcinomes colorectaux primaires ainsi que dans des tumeurs métastatiques (Seiden-Long et al., 2006).

1.3.2.2.3 CNOT4 :

CNOT4 a été identifiée comme une E3 ligase de type RING (Hanzawa et al., 2001). Cette protéine, représentée en Figure 7B, possède un domaine de liaison à l'ARN, un domaine *coiled-coil* ainsi que deux domaines de liaison au zinc, dont le domaine RING en N-terminal qui lui permet de catalyser l'ubiquitination des protéines (Albert et al., 2002). Chez la levure, Not4 est responsable de l'ubiquitination de la protéine ribosomale RPS7A (*40S ribosomal protein S7-A*) ainsi que du NAC (*Nascent polypeptide Associated Complex*), une chaperone associée au ribosome, non pas pour entraîner leur dégradation, mais plus vraisemblablement pour favoriser leur fonction (Panasenکو and Collart, 2012; Panasenکو et al., 2009). De plus, Not4 est impliquée dans l'assemblage du protéasome en interagissant avec diverses sous-unités de ce dernier ainsi qu'avec des protéines chaperones (Panasenکو and Collart, 2011). Très peu de données existent quant à l'activité de *CNOT4*, l'orthologue de Not4 chez les mammifères. Cependant, il a été montré très récemment que cette protéine régule la poly-ubiquitination de PAF1, sous-unité du complexe PAF impliqué dans diverses étapes de la transcription, et sa dégradation par le protéasome 26S dans le noyau (Sun et al., 2015b). Malgré tout, aucune donnée sur l'implication directe de *CNOT4* dans la désadénylation n'a été fournie à ce jour, ce qui est en accord avec une séparation spatiale de *CNOT4* d'avec les sous-unités désadénylases du complexe CCR4-NOT chez tous les eucaryotes à l'exception des champignons (Lau et al., 2009; Schwede et al., 2008; Temme et al., 2010)

1.3.2.3 Sous-unités régulatrices :

1.3.2.3.1 CNOT2-CNOT3 :

CNOT2 et *CNOT3* présentent des structures similaires, avec un domaine conservé appelé *NOT-box* en C-terminal qui leur permet d'interagir ensemble. Leur accrochage à la partie C-terminale

de CNOT1 est dû à des extensions non structurées qui s'enroulent autour de cette dernière (Bhaskar et al., 2013; Boland et al., 2013). Ensemble, ce module pourrait constituer une plateforme d'interaction pour d'autres protéines et/ou des ARNm. En effet, ce module lie des ARN poly-uridyliés *in vitro* (Bhaskar et al., 2013). CNOT2 a été impliquée dans la répression de Pol II via l'histone déacétylase HDAC3 (Jayne et al., 2006). Par ailleurs CNOT3 a été identifiée dans une étude pangénomique comme l'une des molécules essentielles pour le renouvellement des cellules ES chez la souris (Hu et al., 2009). Même si CNOT2 et CNOT3 ne possèdent pas de domaines catalytiques, elles sont tout de même impliquées dans la régulation de la dégradation des ARN, et ont ainsi des répercussions sur la physiologie des organismes. En effet, la délétion totale de *CNOT3* est létale à un stade embryonnaire chez les souris, tandis que les hétérozygotes *CNOT3*^{+/-} présentent une résistance à l'obésité engendrée par un régime riche en graisse, due à l'augmentation du niveau de certains ARNm impliqués dans le catabolisme par diminution de leur désadénylation. Ces mutants présentent également une diminution de la densité des os et une ostéoporose accrue lors du vieillissement à cause d'une diminution de la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm de RANK (*Receptor Activator of NF-κB*). (Morita et al., 2011; Watanabe et al., 2014). De plus, chez *Drosophila melanogaster*, des défauts dans la contractilité cardiaque ont été identifiés chez des mutants *CNOT3*^{+/-} (Neely et al., 2010). Dans des cellules HeLa, une diminution de l'expression de CNOT3 entraîne un arrêt mitotique par augmentation de la protéine MAD1 (*Mitotic Arrest Deficient 1*) due à la stabilisation de son ARNm (Takahashi et al., 2012a), tandis que la déplétion de CNOT2 entraîne une mort apoptotique de la cellule après déstabilisation du complexe CCR4-NOT, une diminution de la formation des P-bodies, et un stress du réticulum endoplasmique d'une manière similaire aux cellules exprimant faiblement CNOT1 mentionnées précédemment (Ito et al., 2011). Le complexe CCR4-NOT est notamment capable d'être recruté de manière ciblée au niveau de certains ARNm nécessaires à la polarité des ovocytes et l'organisation dorso-ventrale des embryons, par la protéine Bicaudal chez *Drosophila melanogaster*. Bicaudal, dans le cas de l'autorégulation de son ARNm, se lie au niveau de la 5' UTR puis recrute CNOT3 et ainsi le complexe CCR4-NOT, engendrant la désadénylation puis la dégradation de son propre ARNm (Chicoine et al., 2007).

1.3.2.3.2 CNOT9 :

CNOT9 (appelé aussi RCD1 pour *Required for Cell Differentiation 1*) a tout d'abord été identifiée comme un facteur essentiel pour la différenciation sexuelle induite par privation en azote chez

Schizosaccharomyces pombe (Okazaki et al., 1998). Peu de temps plus tard, son homologue chez *Saccharomyces cerevisiae*, nommé CAF40, a été identifié comme membre du complexe CCR4-NOT (Chen et al., 2001). Divers rôles ont été attribués à l'orthologue de mammifères CNOT9. En effet, CNOT9 agirait comme co-facteur transcriptionnel dans la différenciation de cellules embryonnaires F9 de tératocarcinome induite par l'acide rétinoïque (Hiroi et al., 2002), et serait impliqué dans la réponse hormonale ainsi que dans la différenciation cellulaire (Garapaty et al., 2008; Haas et al., 2004). En outre, il a été constaté que l'expression de *CNOT9* est augmentée dans diverses lignées de cellules de cancer du sein ainsi que divers échantillons de patients, et que la suppression de CNOT9 permet une forte diminution de la prolifération des cellules de ce type de cancer (Ajiro et al., 2009). La résolution de la structure de CNOT9 a montré que CNOT9 comprend 6 domaines *armadillo* (*ARM repeat domain*) (Garces et al., 2007) lui permettant de former un homo-dimère ou d'interagir avec CNOT1. Cette interaction entre un domaine ARM de CNOT9 et le domaine CN9BD de CNOT1 permet la création d'un site de liaison aux protéines GW182/TNRC6 (*TriNucleotide Repeat-Containing gene 6A protein*) du complexe RISC impliqué dans l'interférence par ARN, et ainsi un recrutement spécifique de CCR4-NOT sur les cibles des micro-ARN (Chen et al., 2014).

1.3.2.3.3 CNOT10 et CNOT11 :

CNOT10 et CNOT11 possèdent des orthologues chez tous les eucaryotes à l'exception des champignons. Elles sont associées de manière stable au complexe CCR4-NOT (Bawankar et al., 2013; Lau et al., 2009; Mauxion et al., 2013) et interagissent avec celui-ci via la partie N-terminale de CNOT1 (Bawankar et al., 2013; Mauxion et al., 2013). CNOT10 et CNOT11 présentent des fonctions différentes vis-à-vis de la désadénylation suivant les organismes considérés. En effet, la déplétion de ces protéines n'affecte pas la désadénylation d'un rapporteur β -globine dans des cellules mammifères HEK293 (Mauxion et al., 2013). De même, leur couplage à un ARN cible par la technique de *tethering* n'induit pas la dégradation ni la répression de cette cible chez la drosophile (Bawankar et al., 2013). À l'inverse, la diminution du niveau de l'ARNm codant CNOT10 chez les trypanosomes entraîne une diminution de l'expression de CNOT1, affecte la désadénylation de plusieurs ARNm et inhibe la prolifération des trypanosomes (Farber et al., 2013).

1.4 Régulation de la désadénylation :

L'étape de désadénylation étant limitante pour le processus de dégradation des ARNm, elle est une

cible préférentielle des mécanismes de régulation. Ceux-ci permettent de réguler la demi-vie des ARNm en fonction de diverses conditions. Ces régulations sont dues à la présence de séquences spécifiques en cis des ARNm, généralement situées dans la région 3' UTR, reconnues par des protéines RBP (*RNA-Binding-Protein*) spécifiques ou des micro-ARN.

1.4.1 Régulation de la désadénylation par des protéines RBP :

Chez les mammifères, il a été détecté des séquences riches en adénosines et en uridines, nommées ARE pour *AU-Rich Elements*, dans les régions 3' UTR d'ARNm ayant généralement une demi-vie courte. Les ARE sont des séquences de taille comprise entre 50 et 150 nucléotides présentant le plus souvent des pentamères AUUUA ou des nonamères UUAUUUA(U/A)(U/A), que l'on trouve chez un peu moins de 10% des ARNm totaux. Les ARE peuvent recruter des ARE-BP (*ARE-Binding Proteins*), des protéines permettant d'altérer la stabilité des transcrits, soit en les stabilisant, soit en favorisant leur dégradation. L'une de ces protéines, KSRP (*K homology Splicing Regulatory Protein*) engendre la dégradation d'ARNm présentant des ARE *in vivo*, et a été montrée capable de lier *in vivo* et/ou *in vitro* différents facteurs de dégradation des ARN, comme la sous-unité catalytique DCP2 du complexe d'hydrolyse de la coiffe, la sous-unité RRP4 de l'exosome et également la désadénylase PARN (Chou et al., 2006; Gherzi et al., 2004). Un autre facteur, la TTP, est capable d'augmenter la désadénylation d'un transcrit en se fixant aux ARE présents à son extrémité 3' UTR (Lai et al., 2005). Le rôle de TTP dans la désadénylation des transcrits a notamment été remarqué dans le cas de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), où TTP interagit directement avec CNOT1, permettant ainsi le recrutement des désadénylases CAF1-CCR4 et la désadénylation spécifique de TNF- α (Sandler et al., 2011). La détermination de la structure de la surface d'interaction entre TTP et CNOT1 a permis de montrer que cette interaction était essentielle pour le rôle de TTP dans la dégradation des transcrits (Fabian et al., 2013)

Il est à noter que le recrutement du complexe CCR4-NOT par les protéines se fixant spécifiquement dans la région 3' UTR de transcrits cibles et entraînant la répression de leur traduction puis éventuellement leur dégradation est un mécanisme très largement répandu. Il en est ainsi des protéines NANOS, PUF (*Poly(U)-binding-splicing Factor*), SMAUG, CUP, BICAUDAL-C, ROQUIN ou encore MEX3-C. Dans le cas des protéines NANOS, l'interaction directe de ces protéines avec le complexe CCR4-NOT a été démontrée par la résolution de la structure de leur surface d'interaction (Bhandari et al., 2014; Raisch et al., 2016). Les protéines NANOS sont

impliquées dans différents aspects du développement embryonnaire des métazoaires comme la définition du plan d'organisation embryonnaire, le développement et le maintien des lignées germinales ainsi que le développement neuronal. Il en résulte que CNOT1 est ainsi impliquée dans le développement des cellules germinales mâles chez la souris en régulant la stabilité de divers ARNm de gènes impliqués dans la méiose (Suzuki et al., 2012). La liaison de CNOT1 au motif NIM (*CNOT1-Interacting Motif*) de l'une des trois protéines NANOS permet l'inhibition de la traduction du transcrite auquel s'est liée la protéine Nanos, ainsi que l'hydrolyse de sa coiffe en plus de sa désadénylation, qui mènera finalement à sa dégradation.

1.4.2 Régulation de la désadénylation par les micro-ARN et le complexe RISC :

L'un des moyens de régulation de la désadénylation et de la dégradation des ARNm est l'intervention du complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) par l'intermédiaire des micro-ARN. Chez l'Homme, ils pourraient cibler 50% des gènes codants. Les micro-ARN sont des petits ARN d'une taille comprise entre 20 et 24 nucléotides, et sont produits à partir de structures tiges-boucles présentes au niveau de pri-miARN, transcrits par Pol II et maturés dans le noyau après reconnaissance par DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region 8*) qui recrute l'activité RNase III de DROSHA. Ces structures tiges-boucles sont ensuite prises en charge dans le cytoplasme par l'enzyme DICER, qui permet la production d'un ARN double brin d'environ 20 à 24 nucléotides par son activité RNase III. Ce double brin d'ARN interagit ensuite avec une protéine de la famille ArGOnaute (AGO) pour former le cœur du complexe RISC, qui ne contiendra au final après changement de conformation qu'un micro-ARN simple brin d'environ 20 à 24 nucléotides. Les protéines AGO vont ensuite pouvoir disposer le micro-ARN, généralement au niveau de la région 3' UTR d'un transcrite, par complémentarité. La *seed sequence* du micro-ARN, allant du deuxième au huitième nucléotide, est indispensable à l'activité du complexe RISC et est strictement appariée à la région 3' UTR du transcrite cible, tandis que le reste du micro-ARN est lié à la cible par complémentarité partielle, sauf chez les plantes où l'appariement total du micro-ARN est requis. La conséquence directe de la reconnaissance d'un transcrite cible est, soit le clivage de l'ARNm par l'activité endonucléase de la protéine AGO2 dans le cas d'un appariement total avec le transcrite cible, soit la répression de la traduction du transcrite cible suivie dans la plupart des cas de sa dégradation (Liu et al., 2004). Les protéines AGO se lient chez les animaux à des protéines GW182/TNRC6, qui à l'aide de leurs motifs riches en tryptophane en N-terminal et C-terminal vont permettre le recrutement des complexes désadénylase PAN2-PAN3 et CCR4-NOT favorisant

ainsi la désadénylation et la dégradation du transcrit cible. Ce mécanisme de recrutement est conservé chez de nombreux organismes comme *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans* (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011; Kuzuoglu-Ozturk et al., 2012). En outre, GW182/TNRC6 possède deux autres régions, l'une ayant les mêmes propriétés qu'un motif PAM2, et l'autre agissant comme un motif PAM1. Ces deux régions vont permettre de lier PABPC1, inhibant la traduction du transcrit cible du complexe RISC par déstabilisation de l'interaction PABPC1-eIF4G et donc de la structure circulaire de l'ARNm qui facilite habituellement sa traduction. À noter que GW182/TNRC6 recrute le complexe CCR4-NOT en se liant principalement à CNOT9 par ses motifs riches en tryptophanes. La résolution de la structure de CNOT1 a permis d'établir le rôle clé de cette protéine. En effet, CNOT1 peut favoriser la répression de messagers pris pour cible par RISC en permettant l'inhibition de leur traduction par recrutement, via son domaine MIF4G, de l'ARN hélicase DDX6 qui est un répresseur de la traduction et facteur de libération de la coiffe (Chen et al., 2014; Mathys et al., 2014).

1.4.3 La famille BTG/Tob :

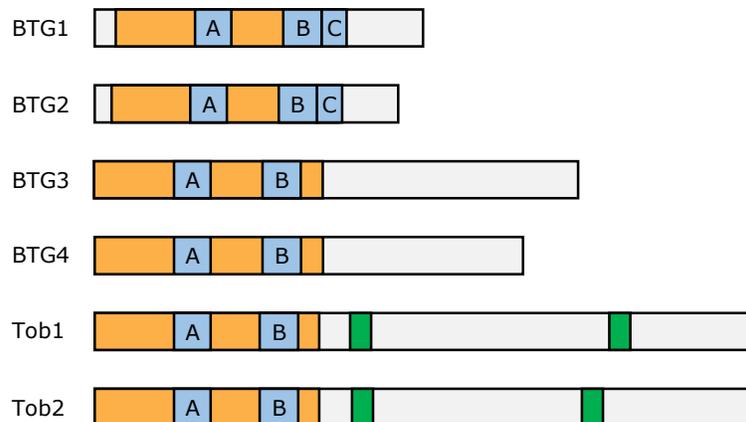


Figure 8 : Représentation schématique des membres de la famille BTG/Tob chez les vertébrés.

Le domaine APRO est représenté en orange. Les motifs conservés boxA (A) et boxB (B), signatures de la famille BTG/Tob, sont indiqués et représentés en bleu, de même que le motif boxC (C), spécifique de BTG1 et BTG2. Les motifs PAM2 spécifiques de Tob1 et Tob2 sont représentés en vert.

Nous avons vu qu'un mécanisme fréquent pour réprimer la traduction d'ARNm cibles et pour induire leur dégradation était le recrutement du complexe CCR4-NOT. Nous nous sommes intéressés à l'étude des facteurs BTG/Tob car tous les membres de cette famille, présente

essentiellement chez les métazoaires, interagissent directement avec la désadénylase CAF1. La famille BTG/Tob est constituée de 6 membres chez les vertébrés, BTG1, BTG2, BTG3, BTG4, Tob1 et Tob2, représentés sur la Figure 8 et qui se caractérisent par la présence d'un domaine APRO (*Anti-PROliferative*) N-terminal présentant deux motifs conservés, boxA et boxB, qui ont été identifiés comme la signature de cette famille de protéines (Guehenneux et al., 1997; Matsuda et al., 2001). À l'exception de BTG4, toutes les protéines BTG/Tob ont été montrées interagir avec CAF1 dans des essais double-hybride ou par co-précipitation en utilisant soit des protéines BTG/Tob sauvages, soit des protéines tronquées ou mutées (Bogdan et al., 1998; Ikematsu et al., 1999; Morel et al., 2003; Rouault et al., 1998; Yoshida et al., 2001). De plus, ces expériences, ainsi que la résolution de la structure du domaine APRO de Tob1 en complexe avec CAF1, ont montré que ce sont les motifs boxA et boxB conservés du domaine APRO qui étaient responsables de l'interaction à CAF1 (Horiuchi et al., 2009; Prevot et al., 2001; Rouault et al., 1998).

Tableau 1 : Analyse des similitudes entre les domaines APRO des membres de la famille BTG/Tob chez l'humain.

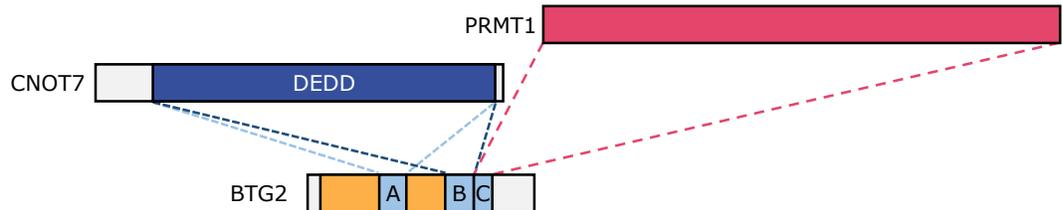
Les domaines APRO des protéines BTG/Tob humaines ont été comparés deux à deux. Le pourcentage d'identité, ainsi que le pourcentage de similitude (entre parenthèses), sont présentés. Les extrémités C-terminales n'ont pas été prises en compte en raison d'une grande divergence de leurs séquences au sein de la famille. Les couples de valeurs supérieures à 50%, permettant de distinguer des sous-familles, sont présentés en rouge. La comparaison des séquences C-terminales pour les sous-familles aboutit à des ratios identité/similitude de 34,9%/51,2% pour hBTG1 et hBTG2, 19,7%/31,8% pour hBTG3 et hBTG4 et 39,7%/50,4% pour hTob1 et hTob2.

	hBTG1	hBTG2	hBTG3	hBTG4	hTob1	hTob2
hBTG1	X	68.0 (79.7)	33.1 (44.6)	28.5 (46.2)	41.9 (60.5)	40.3 (61.2)
hBTG2		X	36.7 (47.7)	34.6 (50.0)	38.6 (58.3)	37.0 (57.5)
hBTG3			X	60.8 (77.5)	32.5 (51.7)	36.9 (56.6)
hBTG4				X	34.4 (54.9)	27.5 (47.5)
hTob1					X	82.1 (93.2)
hTob2						X

En se basant sur une comparaison deux-à-deux, d'une part des séquences protéiques des domaines APRO, et d'autre part des extrémités C-terminales des protéines de cette famille, trois sous-groupes se distinguent : BTG1-BTG2, BTG3-BTG4 et Tob1-Tob2 (Tableau 1). BTG1 et BTG2 présentent en aval de boxB une courte région nommée boxC qui permettrait l'interaction avec la protéine

arginine N-méthyl transférase 1 (PRMT1) (Berthet et al., 2002), tandis que Tob1 et Tob2, en plus de leur domaine APRO, présentent deux motifs PAM2 en C-terminal (Albrecht and Lengauer, 2004), qui leur permettent d'interagir avec le domaine MLLE C-terminal de PABPC1 (Okochi et al., 2005). Les interactions mentionnées dans ce paragraphe sont illustrées en Figure 9.

A)



B)

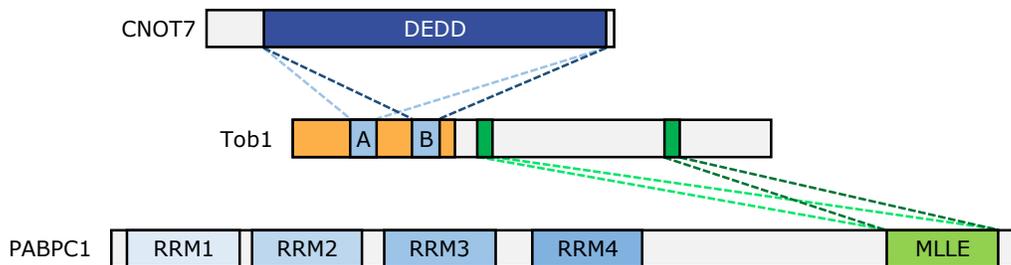


Figure 9 : Interactions de BTG2 et Tob1 avec PRMT1 et/ou PABPC1.
A- Interactions entre BTG2, CNOT7 et PRMT1
Les différentes protéines CNOT7, PRMT1 et BTG2 sont représentées. Le domaine DEDD de CNOT7, ainsi que les régions boxA (A), boxB (B) et boxC (C) de BTG2 sont annotés. Les régions d'interaction entre les différentes protéines sont reliées par des pointillés.
B- Interactions entre Tob1, CNOT7 et PABPC1
Les différentes protéines CNOT7, Tob1 et PABPC1 sont représentées. Le domaine DEDD de CNOT7, les régions boxA (A) et boxB (B) de Tob1, ainsi que les domaines RRM1, RRM2, RRM3, RRM4 et MLLE de PABPC1 sont annotés. Les motifs PAM2 de Tob1 sont représentés en vert. Les régions d'interaction entre les différentes protéines sont reliées par des pointillés.

Étant donné la faculté des protéines de cette famille de pouvoir lier CAF1, il était d'intérêt d'étudier leur lien avec le processus de désadénylation. Les propriétés physiologiques ainsi que les pathologies associées aux divers membres de la famille BTG/Tob seront d'abord présentées, puis nous verrons l'impact de ces différentes protéines sur la désadénylation à partir des données existantes.

1.4.3.1 Rôles physiologiques de la famille BTG/Tob :

1.4.3.1.1 BTG1 :

Le gène *BTG1* pour *B-cell Translocation Gene 1*, a tout d'abord été impliqué dans un phénomène de translocation chromosomique, observé dans des cellules B de patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique (Rimokh et al., 1991). *BTG1* possède divers orthologues chez la souris, le rat, ou encore le poulet, à qui on a attribué initialement d'autres noms, mais qui seront appelés collectivement *BTG1* dans la suite de ce manuscrit. Le niveau de l'ARNm codant *BTG1* a été constatée comme maximal lors de la phase G0/G1 du cycle cellulaire, avec une diminution progressive tout au long de la phase G1 pour des cellules de souris NIH3T3 (Rouault et al., 1992). Diverses études de l'expression tissulaire de *BTG1* ont été menées, l'une d'entre elles ayant révélé que l'ARNm codant *BTG1* était exprimé à des endroits précis dans des embryons de poulet, comme la notochorde, le mésoderme cardiaque, le myotome ainsi que dans les somites et les bourgeons des membres (Kamaid and Giraldez, 2008). Lors d'une autre étude, il a été constaté chez la souris adulte que l'ARNm codant *BTG1* était fortement exprimé au niveau du cerveau dans le gyrus denté et la zone subventriculaire (Farioli-Vecchioli et al., 2012b).

L'expression du gène *BTG1* est régulée par de nombreux facteurs. Une induction de l'expression de *BTG1* a notamment été constatée à la suite de stress génotoxiques (Cortes et al., 2000). Il a également été suggéré que la transcription de *BTG1* pourrait être stimulée par des glucocorticoïdes ou p19^{Arf}, un facteur suppresseur de tumeurs permettant l'arrêt du cycle cellulaire (Kuo et al., 2003; Yoshida et al., 2002). Le niveau de l'ARNm codant *BTG1* serait également rapidement augmenté après traitement avec le facteur de croissance IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-1*) dans des cellules de cancer du sein (Vadgama et al., 2006). L'expression de *BTG1* serait également augmentée après stimulation par l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) dans les cellules de la granulosa chez la souris (Carletti and Christenson, 2009). Une autre étude suggère que BCL-2 (*B-Cell Lymphoma-2*), une protéine anti-apoptotique très fréquemment sur-exprimée chez les patientes atteintes de cancer du sein, régulerait négativement l'expression de *BTG1* (Nahta et al., 2006). *BTG1* serait également une cible directe du facteur de transcription FoxO3a (*Forkhead box protein O3a*), une protéine impliquée dans la progression tumorale (Bakker et al., 2004). Par ailleurs, il a été proposé que HLX (*H2.0-like homeobox protein*), un facteur de transcription sur-exprimé dans la très grande majorité des cas de leucémie myéloïde aigüe, puisse inhiber l'expression de *BTG1* (Kawahara et al., 2012).

De plus, la régulation de l'expression de BTG1 est assurée par de nombreux micro-ARN. L'expression de BTG1 est par exemple réprimée après activation de la transcription du cluster miR-17-92 sous le contrôle de MYC, un oncogène surexprimé dans de très nombreux cancers (Li et al., 2014b). L'expression de BTG1 est également diminuée par miR-454-3p, un micro-ARN dont l'expression diminue après traitement aux rayons X de cellules cancéreuses rénales (Wu et al., 2014). BTG1 est également la cible de miR-19a, un micro-ARN fortement exprimé dans les cancers de la prostate persistant après castration (Lu et al., 2015). miR-22, un micro-ARN connu pour sensibiliser les cellules cancéreuses colorectales à un traitement au 5-fluorouracil, a également pour cible l'ARNm de BTG1 (Zhang et al., 2015). Une autre étude suggère que miR-596 ou encore miR-1231 cibleraient également l'ARNm codant BTG1 (Alanazi et al., 2015). Par ailleurs, il a été proposé que la traduction de l'ARNm codant BTG1 est inhibée d'une manière coiffe-dépendante par liaison d'eIF3 au niveau de sa 5' UTR (Lee et al., 2015a). Enfin, il a été constaté que le niveau de la protéine BTG1 est diminué après ubiquitination de sa partie C-terminale et redirection vers le protéasome (Sasajima et al., 2012; Sasajima et al., 2002).

Concernant l'activité de BTG1, cette dernière possède des propriétés antiprolifératives, qui ont été révélées après transfection dans des cellules NIH3T3 (Rouault et al., 1992). BTG1 est également capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose (Zhu et al., 2013). De plus, BTG1 joue divers rôles physiologiques et est notamment impliquée dans le développement de diverses espèces. En effet il a été constaté que la sur-expression de BTG1 dans des blastomères d'embryons de xénope perturbe la gastrulation et entraîne des défauts dans la formation des tissus issus du mésoderme, comme la notochorde et les muscles (Saka et al., 2000). D'autres études ont également révélé que BTG1 est impliquée dans la différenciation des myoblastes aviaires (Busson et al., 2005; Rodier et al., 1999). De plus, il a été proposé que BTG1 soit impliquée dans l'angiogénèse (Iwai et al., 2004). Par ailleurs, une autre étude émet l'hypothèse que BTG1 soit nécessaire au maintien en quiescence ainsi qu'au renouvellement de certaines cellules souches neuronales. En effet, des souris n'exprimant plus BTG1 présentent une diminution du nombre de cellules neuronales dans le gyrus denté et la zone subventriculaire, contenant notamment des cellules souches, des neuroblastes et des neurones, et ce résultat serait principalement dû à l'entrée en apoptose de certaines populations neuronales (Farioli-Vecchioli et al., 2012b). Il a aussi été proposé que BTG1 soit impliquée dans la différenciation de cellules progénitrices érythropoïétiques (Bakker et al., 2004) et dans le développement des doigts (Lorda-Diez et al., 2016). Au niveau cellulaire, BTG1

serait impliquée dans l'inhibition de prolifération des macrophages engendrée par les prostaglandines PG1 et PG2 (Suk et al., 1997) et permettrait d'augmenter la sensibilité à l'insuline des hépatocytes *in vitro* et *in vivo* (Xiao et al., 2016).

L'implication de BTG1 dans les cancers a été rapportée dans de nombreuses études. Ainsi, une diminution de l'expression de *BTG1* a été significativement corrélée à une progression métastatique plus importante et à un moins bon pronostic de survie dans le cas du cancer de la thyroïde (Lu et al., 2014). L'étude de l'expression de *BTG1* dans le cas du cancer gastrique a permis de constater qu'elle était réduite dans la grande majorité des lignées cellulaires et des échantillons cliniques testés. De plus, la diminution de la quantité de l'ARNm de BTG1 a été significativement corrélée à une espérance de vie plus courte des malades (Kanda et al., 2015a). Une autre étude a également mis en lumière que l'expression de *BTG1* est réduite dans de très nombreuses lignées cellulaires de cancer du foie ainsi que chez la grande majorité des patients étudiés (Kanda et al., 2015b). Par ailleurs, il a été remarqué que la protéine BTG1 était moins exprimée dans des échantillons tissulaires de cancer du rein. Les patients qui exprimaient BTG1 présentaient un meilleur taux de survie que ceux pour lesquels l'expression de BTG1 était diminuée (Sun et al., 2015a). De plus, la délétion de *BTG1* a été constatée dans environ 9% des cas de leucémie lymphoblastique aigüe chez l'enfant (Waanders et al., 2012). Une diminution de la quantité de l'ARNm codant BTG1 a été également observée dans des carcinomes d'ovaires en comparaison de tissus sains ou de tumeurs bénignes. De plus, cette diminution semble progressive durant le développement de la maladie, avec une expression plus faible dans les tumeurs de stades III/IV en comparaison de tumeurs de stades I/II (Zhao et al., 2013). Dans le cas du cancer du sein, il a été suggéré que le niveau d'ARNm codant BTG1 soit plus faible dans des métastases au niveau des ganglions lymphatiques que dans des tumeurs bénignes ou des tissus de sein normaux (Li et al., 2014a).

Différents modes d'action ont été démontrés ou proposés pour BTG1. Concernant les propriétés anti-tumorales de BTG1, il a été constaté que la surexpression de BTG1 dans des cellules de cancer du sein permet de limiter l'adhésion cellulaire, la migration et la capacité d'invasion de ces cellules cancéreuses (Li et al., 2014a). BTG1 serait capable de lier, via sa séquence boxC située directement en aval de boxB, et ainsi de moduler l'activité de PRMT1, une protéine impliquée dans la réponse aux dégâts infligés à l'ADN et la prolifération cellulaire (Berthet et al., 2002; Lin et al., 1996). Ainsi, l'interaction de BTG1 avec PRMT1 permettrait d'inhiber la croissance cellulaire et de

stimuler l'apoptose dans le cas du cancer rénal (Liu et al., 2015). Il a également été suggéré que cette interaction serait impliquée dans la maturation des érythrocytes (Bakker et al., 2004). Par ailleurs, la liaison de BTG1 à HOXB9 (*Homeobox protein Hox-B9*), un facteur de transcription impliqué dans le développement des glandes mammaires et du sternum ainsi que dans l'angiogénèse, favoriserait la transcription de ses gènes cibles (Prevot et al., 2000). En outre, il a été suggéré que l'interaction entre BTG1 et CAF1 jouerait un rôle dans la régulation de la transcription impliquant le récepteur alpha aux oestrogènes (Prevot et al., 2001).

1.4.3.1.2 BTG2 :

Les orthologues de BTG2 ont été appelés notamment TIS21 chez la souris et PC3 chez le rat. Pour plus de simplicité, ces différents orthologues seront simplement appelés BTG2 dans la suite de ce manuscrit. BTG2 a d'abord été identifiée chez la souris où le gène *BTG2* a été cloné comme un gène de réponse primaire dont l'expression est stimulée par la présence de TPA (*TetradecanoylPhorbol Acetate*), de forskolin, de facteur de croissance épidermique (EGF) et de sérum (Fletcher et al., 1991). Chez le rat, *BTG2* a été cloné comme un gène de réponse primaire stimulé par le Facteur de Croissance Neuronale (NGF), l'EGF et la dépolarisation membranaire (Bradbury et al., 1991). En outre, l'expression de *BTG2* peut être stimulée par une carence en sérum, la présence d'acide rétinoïque, de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) générés à la suite de stress oxydatifs ou de l'activité mitochondriale, ainsi que par des dommages au niveau de l'ADN pouvant résulter d'une exposition à la doxorubicine ou à des radiations ionisantes (Cho et al., 2008; Elmore et al., 2005; Imran and Lim, 2013; Passeri et al., 2006; Tsai et al., 2006). Par ailleurs, le gène *BTG2* a été identifié comme gène de réponse primaire induit par le facteur de transcription et suppresseur de tumeurs p53, un élément de réponse à p53 ayant été identifié en amont de son promoteur (Duriez et al., 2002; Rouault et al., 1996). La transcription de *BTG2* pourrait également être activée par p19^{Arf} (Kuo et al., 2003). À noter que chez la souris *BTG2* est exprimée dans de nombreux tissus, après induction au TPA et à la cycloheximide, comme le muscle lisse, le tissu lymphoïde, des tissus embryonnaires, des tissus rénaux, testiculaires, ou dans des lignées de macrophages, tandis que chez le rat, *BTG2* est exprimé dans des fibroblastes, des ostéoblastes et des lignées issues de la glande surrénale à la suite du même traitement (Fletcher et al., 1991). Une autre étude chez la souris a mis en évidence l'expression de *BTG2* dans le système nerveux central, l'hypophyse, le foie, l'estomac, le thymus, la rate, la peau, ainsi que dans les glandes salivaires et surrénales, mettant en lumière l'expression ubiquitaire de BTG2 (Terra et al., 2008). L'expression

de *BTG2* serait également induite par l'hCG dans les cellules de la granulosa chez la souris (Carletti and Christenson, 2009).

L'expression de *BTG2* est aussi régulée au niveau de la protéine. En effet, la protéine *BTG2*, localisée majoritairement dans le cytoplasme, est extrêmement labile. Chez la souris, la demi-vie de *BTG2* a été mesurée comme étant inférieure à 15 min, suggérant une activité ciblée de cette protéine durant un laps de temps très court après expression (Varnum et al., 1994). Cette instabilité est en partie due à l'ubiquitination de sa région C-terminale, entraînant la redirection de *BTG2* vers le protéasome (Sasajima et al., 2002).

La stabilité de l'ARNm de *BTG2* est également régulée, entre autres par divers micro-ARN. Ainsi, chez la souris, *BTG2* est la cible de miR-132, un micro-ARN impliqué dans le cycle circadien (Alvarez-Saavedra et al., 2011). Chez l'Homme, l'ARNm codant *BTG2* est la cible de miR-32, ce dernier étant associé à de mauvais pronostics vitaux pour le cancer de la prostate, de miR-25 dont l'expression est augmentée dans le cas du cancer du poumon, de miR-27a qui est impliqué dans la progression du glioblastome, ou encore de miR-21, un micro-ARN oncogène surexprimé dans des tumeurs du larynx et impliqué dans la progression du cancer de la prostate. (Coppola et al., 2013; He et al., 2015; Jalava et al., 2012; Li et al., 2015b; Liu et al., 2009).

Des capacités antiprolifératives ont été attribuées à *BTG2*. Ces dernières ont été remarquées en sur-exprimant *BTG2* dans des lignées cellulaires, ce qui a pour effet d'engendrer une diminution de la prolifération cellulaire, résultant en partie d'un défaut dans la transition de la phase G1 à la phase S ou de la phase G2 à la phase M du cycle cellulaire (Montagnoli et al., 1996; Rouault et al., 1996; Ryu et al., 2004). *BTG2* joue également un rôle vis-à-vis de l'apoptose. En effet, il a été constaté que l'inhibition de l'expression de *BTG2* entraîne une augmentation de la mort cellulaire dans des cellules présentant des dégâts au niveau de l'ADN, mais également dans des cellules neuronales traitées au NGF, suggérant que *BTG2* permettrait d'empêcher l'entrée des cellules en apoptose (el-Ghissassi et al., 2002; Rouault et al., 1996). Cependant, d'autres études suggèrent un rôle pro-apoptotique de *BTG2*, notamment dans le cas de cancer gastrique et de cancer du poumon (Hong et al., 2005; Zhang et al., 2010). Ainsi, il semble clair que *BTG2* possède un rôle dans le processus d'apoptose mais qui semble varier selon le type cellulaire et les stimuli considérés.

Par ailleurs, *BTG2* possède des effets variés sur le développement de l'organisme. Des souris exprimant un transgène *BTG2* tout au long de leur développement présentent des défauts dans la

neurogénèse, une plus forte mortalité, et une taille réduite en comparaison des souris sauvages (Canzoniere et al., 2004). De plus, une surexpression ciblée de BTG2 lors de la neurogénèse au niveau des cellules progénitrices du gyrus denté entraîne une différenciation neuronale accélérée, une diminution du nombre de dendrites et une réduction de la plasticité synaptique entraînant un défaut d'apprentissage et de mémorisation (Farioli-Vecchioli et al., 2008). À l'inverse, l'absence de BTG2 dans ces cellules entraîne l'augmentation de la prolifération et un arrêt de la différenciation neuronale, ayant pour conséquence directe l'accumulation de neurones post-mitose non différenciés au niveau de l'hippocampe menant à un défaut de la mémoire contextuelle de ces souris (Farioli-Vecchioli et al., 2009). BTG2 serait également exprimée de manière synergique avec le NGF, permettant la neuro-différenciation en facilitant l'expression de différents marqueurs neuronaux (Corrente et al., 2002). Par ailleurs, il a été constaté chez *Xenopus laevis* que l'expression de BTG2 était nécessaire au développement de la notochorde et essentielle au développement vertébral ainsi qu'à l'établissement du plan d'organisation de l'animal (Sugimoto et al., 2005). Plus précisément, BTG2 est nécessaire au développement des yeux et de la partie antérieure du système nerveux lors de l'embryogenèse du xénope (Sugimoto et al., 2007). L'expression de BTG2 lors du développement du système nerveux est également retrouvée chez le poulet où elle est exprimée lors de la neurulation (Kamaid and Giraldez, 2008). Outre son implication dans le développement du système nerveux, BTG2 possède d'autres rôles physiologiques. Ainsi, l'ARNm codant BTG2 est beaucoup plus fortement exprimé dans les ostéoclastes différenciés que dans les macrophages non différenciés de la moelle osseuse, tandis qu'une hausse significative de son expression a été observée lors de la différenciation des précurseurs de moelle osseuse en ostéoclastes (Lee et al., 2002). Son expression culminerait également au douzième jour de différenciation des ostéoblastes (Raouf and Seth, 2002). Ceci suggère que BTG2 joue aussi un rôle dans la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse. BTG2 est également impliquée dans le maintien des lymphocytes en quiescence lors de la maturation des thymocytes. En effet, il a été observé que BTG2 était exprimée dans les progéniteurs de thymocytes avant leur sélection, tandis que son expression diminuait après sélection par les facteurs mitogènes (Konrad and Zuniga-Pflucker, 2005). Il a également été constaté que l'absence de BTG2 aboutit à un défaut de l'organisation vertébrale chez la souris, où cette dernière présente plusieurs substitutions vertébrales : vertèbre cervicale C7 substituée en vertèbre thoracique T1 et vertèbre thoracique T13 substituée en vertèbre lombaire L1 (Park et al., 2004). Par ailleurs, BTG2

serait également impliquée dans l'homéostasie du fer chez la souris en stimulant la production hépatique d'hepcidine, une hormone sécrétée majoritairement par les hépatocytes et qui induit une diminution de la concentration en fer extracellulaire (Lee et al., 2015b).

De façon non surprenante étant donné la diversité de ses rôles physiologiques, BTG2 a également été impliquée dans diverses pathologies. Par exemple, chez les rats, une forte augmentation de l'expression de l'ARNm codant BTG2 est constatée dans le pancréas, le rein et le foie durant la phase aiguë de la pancréatite, ainsi qu'après une ischémie rénale (Fiedler et al., 1998). Un phénomène similaire a été constaté chez l'humain dans le cas d'ischémie spinale (Carmel et al., 2004). Étant donné que ces pathologies sont associées à une apoptose des tissus concernés, l'hypothèse est que BTG2 serait exprimée pour réguler l'apoptose pendant et à la suite d'ischémies par arrêt du cycle cellulaire. Par ailleurs, l'ARNm codant BTG2 et/ou la protéine BTG2 est sous-exprimé dans le cadre de nombreux cancers, comme le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer rénal ainsi que dans le cas de tumeurs osseuses, à l'exception du cancer de la vessie pour lequel une forte expression de BTG2 est corrélée à un mauvais pronostic vital (Ficazzola et al., 2001; Kawakubo et al., 2004; Li et al., 2015d; Struckmann et al., 2004; Takahashi et al., 2011; Wagener et al., 2013). De plus, il a été remarqué que des patientes atteintes de cancer du sein présentant une plus forte expression de BTG2 avaient une plus grande probabilité de survie (Mollerstrom et al., 2010). L'absence de BTG2 est également responsable de l'apparition de médulloblastome, ce qui est vraisemblablement lié à la fonction de BTG2 dans la différenciation et la migration de Précurseurs neuronaux de Cellules Granulaires (GCP) au niveau du cerebellum (Farioli-Vecchioli et al., 2012a).

L'activité de BTG2 serait due à ses interactions avec divers partenaires. Comme BTG1, BTG2 interagirait via sa région boxC avec PRMT1 et régulerait son activité (Lin et al., 1996). Cette interaction jouerait un rôle dans la différenciation neuronale et la différenciation de cellules hématopoïétiques, ainsi que dans la réparation de cassures double-brin au niveau de l'ADN (Berthet et al., 2002; Choi et al., 2012; Miyata et al., 2008; Passeri et al., 2006). HOXB9 serait également un partenaire de BTG2. La liaison de BTG2 à HOXB9 favoriserait la transcription des cibles génomiques de cette dernière (Prevot et al., 2000). BTG2 interagirait également avec NFE2L2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), un facteur de transcription gouvernant l'expression de plusieurs gènes antioxydants, afin d'augmenter l'activation de gènes cibles en

réponse à des agents oxydatifs dans des cellules humaines (Karve and Rosen, 2012). Une autre étude suggère que BTG2, à l'aide de son extrémité C-terminale, lierait l'Adénine Nucléotide Translocase 2 (ANT2), une protéine de la membrane interne mitochondriale régulant la phosphorylation oxydative en catalysant l'échange de l'ADP mitochondriale avec l'ATP cytoplasmique, ce qui permettrait à BTG2 de réguler la génération de ROS (Park et al., 2013). Plusieurs études suggèrent que la diminution de la génération mitochondriale de ROS par BTG2 aurait comme conséquence de réduire la migration de cellules cancéreuses (Choi and Lim, 2013; Lim et al., 2012; Quy et al., 2013). BTG2 interagirait également avec les protéines SMAD (*Mothers against decapentaplegic homolog*), SMAD1 et SMAD8, activées par la BMP, augmentant ainsi l'activité transcriptionnelle induite par la voie de transduction BMP nécessaire à l'établissement du plan d'organisation vertébral au niveau embryonnaire (Park et al., 2004). En outre, BTG2 pourrait interagir avec la cycline B1 et/ou la Cycline-Dépendante Kinase 1 (CDK1), ce qui permettrait de limiter le développement du cancer du foie. D'une part, ces interactions inhiberaient l'activité de CDK1 normalement associée à la cycline B1, empêchant ainsi la phosphorylation de FOXM1 (*Forkhead box M1*), un facteur de transcription qui est un régulateur majeur de la prolifération cellulaire, ce qui entraînerait l'inhibition de l'activation de la transcription de ses cibles, et d'autre part induiraient une inhibition de la transition G2/M du cycle cellulaire (Park et al., 2008; Ryu et al., 2004). Par ailleurs, un traitement à l'EGF de cellules humaines entraîne la phosphorylation d'une BTG2 recombinante par ERK1/2 (*Extracellular signal-reduced kinase 1/2*) et son interaction avec PIN-1 (*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1*), une protéine nucléaire essentielle à la mitose. BTG2 provoquerait ainsi l'export de PIN-1 vers le cytoplasme, ce qui inhiberait sa fonction, favoriserait la sénescence des cellules et entraînerait une dépoliarisation des mitochondries et ainsi une augmentation de la mort cellulaire (Hong et al., 2005; Wheaton et al., 2010). Il a également été suggéré que l'inhibition de la transition de G1 à S lors du cycle cellulaire par BTG2 serait due à une diminution de la transcription de l'ARNm codant la cycline D1 (Guardavaccaro et al., 2000). La baisse d'expression de la cycline D1 entraînerait une diminution de l'activité de la Cycline-Dépendante Kinase 4 (CDK4) qui serait à l'origine de l'hypo-phosphorylation de la protéine de RétinoBlastome (pRB), un régulateur majeur du cycle cellulaire, aboutissant ainsi à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. La réduction de la transcription de l'ARNm codant la cycline D1 serait due à la fixation de BTG2 sur son promoteur et à un recrutement des histones déacétylases (Farioli-Vecchioli et al., 2007).

1.4.3.1.3 BTG3:

BTG3 possède différents orthologues, notamment chez la souris, le rat, le poisson-zèbre, et le xénope, que nous appellerons collectivement BTG3. BTG3 a été caractérisée chez l'homme et nommée ANA, pour *Abundant in Neuroepithelium Area*, en raison de la forte expression de l'ARNm codant son orthologue au niveau de la zone ventriculaire du système nerveux central durant le développement embryonnaire des souris. L'ARNm codant BTG3 est également fortement exprimé dans les ovaires, les testicules, la prostate, le thymus ou encore le poumon (Yoshida et al., 1998). Par ailleurs, il a été détecté que, chez le rat, l'ARNm codant BTG3 est présent au niveau du cerveau, mais pas au niveau des autres tissus (Seo et al., 1999). Par contre, *BTG3* est exprimé de manière prédominante dans les ovocytes chez le poisson-zèbre (Bobe et al., 2008). En outre, il a été constaté que l'expression de *BTG3* était dépendante du cycle cellulaire et qu'elle était maximale en fin de phase G1 chez des lymphocytes matures stimulés avec l'agent mitogène phytohémagglutinine (Guehenneux et al., 1997). L'expression de *BTG3* peut être induite par un traitement au TPA, à la cycloheximide ou en réponse à un traitement avec un agent oxydant (Seo et al., 1999). Par ailleurs, *BTG3* est également un gène de réponse primaire à p53, et pourrait également être induit par p19^{Arf} (Kuo et al., 2003; Ou et al., 2007).

BTG3, à l'instar de BTG1 et BTG2, présente des propriétés antiprolifératives qui ont été constatées par l'arrêt de la progression du cycle cellulaire de la phase G₀/G₁ à S après sur-expression dans des cellules primaires de cancer du foie ou dans des cellules NIH3T3 dont la prolifération a été induite avec du sérum (Lv et al., 2013; Ou et al., 2007; Yoshida et al., 1998). D'autre part BTG3 a été impliquée dans le maintien de l'arrêt G₂/M induit par des stress génotoxiques dans des cellules de cancer de la prostate (Ou et al., 2007). L'étude de BTG3 a révélé son implication dans le développement et la différenciation de divers organes et tissus. En effet, l'orthologue de BTG3 chez *Xenopus laevis* est impliqué dans le développement et l'organogenèse, en étant exprimé dans le mésoderme dorsal au niveau du tissu organisateur de Spemann, essentiel à la détermination de l'axe dorso-ventral lors de l'embryogenèse des amphibiens. De plus, l'injection d'un ARNm codant pour BTG3 dans des embryons au niveau du blastomère ventral entraîne la formation d'un deuxième axe dorsal, avec dans la plupart des cas une deuxième tête à son extrémité (Wessely et al., 2005). La surexpression de BTG3 dans des cellules neuronales de rat entraîne l'inhibition de la croissance des neurites, ce qui ferait de BTG3 un acteur du développement neuronal (Rahmani, 2006). Par ailleurs, il a également été suggéré que l'expression de BTG3 serait modulée par

l'erythropoïétine (EPO) et jouerait un rôle dans la formation des proérythroblastes (Singh et al., 2012).

L'impact de BTG3 sur diverses maladies, et plus particulièrement sur les cancers, a été étudié. BTG3 a ainsi été impliquée dans le développement de cancers buccaux (Yamamoto et al., 2001) : l'ARNm codant BTG3 était absent ou faiblement détecté dans la majorité des tumeurs et lignées cellulaires testées lors de cette étude, avec une plus forte proportion de suppression de l'ARNm codant BTG3 à des stades tumoraux avancés par rapport aux stades précoces. En outre, l'expression de *BTG3* a pu être restaurée après traitement avec un agent déméthylant dans plusieurs lignées cellulaires, indiquant que la méthylation du promoteur de *BTG3* est très vraisemblablement la cause de son absence dans ce type de cancer. Il a également été constaté que le gène *BTG3* était rendu silencieux par hyper-méthylation de son promoteur dans le cas du cancer du rein, de la prostate, du sein, des ovaires ou du foie (Deng et al., 2013; Lv et al., 2013; Majid et al., 2009; Majid et al., 2010; Putnik et al., 2012). Une diminution de l'expression de l'ARNm codant BTG3 et/ou de la protéine BTG3 a également été remarquée dans la très grande majorité des lignées cellulaires de cancer gastrique, du poumon ou de l'œsophage ainsi que dans une large majorité d'échantillons de patients. De plus, il a été constaté que l'expression de BTG3 corrèle avec un meilleur pronostic de survie (Chen et al., 2013; Du et al., 2015; Gou et al., 2015; Ren et al., 2015). Dans le cas du cancer des ovaires, il a été récemment découvert qu'un transcrite anti-sens de BTG3, nommé ASBEL pour *AntiSense ncRNA in the ANA/BTG3(three) Locus*, était responsable de la diminution du niveau de la protéine BTG3, mais pas de son ARNm. La formation de duplexes ARN ASBEL-BTG3 aboutirait à une rétention dans le noyau de l'ARNm de BTG3 (Yanagida et al., 2013).

Concernant le mode d'action de BTG3, il a été suggéré que les propriétés antiprolifératives de BTG3 seraient liées à l'inhibition de la liaison à l'ADN d'E2F1, un facteur de transcription ayant pour cibles des gènes permettant la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à S. Cette inhibition se ferait par interaction entre BTG3 et E2F1 (Ou et al., 2007). Il a également été proposé que BTG3 serait capable, via son domaine C-terminal riche en prolines, de s'associer à la tyrosine kinase Src, diminuant ainsi son activité kinase au sein de la voie Ras/MAP kinase (*Ras/Mitogen-Activated Protein kinase*) impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Rahmani, 2006). Il a également été proposé que BTG3 régule négativement la prolifération cellulaire en se liant à la sérine/thréonine kinase AKT (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*) à l'aide de

l'extrémité de sa partie C-terminale. La liaison de BTG3 à AKT aurait pour effet de prévenir la localisation d'AKT au niveau de la membrane plasmique et ainsi son activation, empêchant son activité kinase et la stimulation de la prolifération cellulaire par la β -caténine (Cheng et al., 2015). En outre, un partenaire nucléaire de BTG3 a été identifié par double-hybride chez la souris, et nommé BANP, pour Protéine Nucléaire Associée à BTG3. Chez l'Homme, BANP a été localisée au niveau d'une région chromosomique pour laquelle la perte d'hétérozygotie a été observée dans différents cancers, comme le cancer du sein, de la prostate ou de l'estomac. Il a également été proposé que BANP serait capable d'induire la répression de l'expression de la cycline D1 par recrutement d'histones déacétylases, inhibant ainsi la progression tumorale, suggérant que le rôle antiprolifératif de BTG3 pourrait être lié en partie à BANP (Biro et al., 2000; Rampalli et al., 2005). Par ailleurs, il a été constaté que la sur-expression de BTG3 exogène dans des cellules de cancer du poumon aboutissait à la diminution du niveau des ARNm de MMP-2 (*Matrix Metalloproteinase-2*) et PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*), deux facteurs impliqués dans l'invasion tumorale, l'angiogenèse et la formation de métastases (Yoneda et al., 2009). De plus, BTG3 serait impliquée, avec d'autres protéines, dans l'ubiquitination de CHK1 (*Checkpoint Kinase 1*), une protéine notamment impliquée dans la survie des cellules à la suite de stress génotoxiques. L'ubiquitination permettrait l'association de CHK1 à la chromatine, ce qui est nécessaire à son activité. L'absence de BTG3 ou de CHK1 entraîne les mêmes conséquences dans des cellules humaines, à savoir une augmentation de la mort cellulaire ainsi que des défauts dans l'alignement et la ségrégation chromosomique lors du cycle cellulaire, suggérant un rôle de BTG3 dans la stabilité du génome (Cheng et al., 2013). Il semblerait également que l'absence de BTG3 dans des fibroblastes sains entraîne leur sénescence en raison d'une levée de répression de p16^{Ink4a}, un inhibiteur de kinases dépendantes de cycline D essentielles à la progression du cycle cellulaire (Lin et al., 2012b). Cela supposerait que BTG3 possède des propriétés antiprolifératives, qu'elle soit exprimée ou réprimée.

1.4.3.1.4 BTG4:

BTG4 a une expression précise au cours du développement. En effet, il a été observé chez plusieurs espèces que l'expression de l'ARNm de BTG4 est forte dans les ovocytes, mais diminue progressivement au cours de l'embryogénèse jusqu'au stade blastocyste (Buanne et al., 2000; Burns et al., 2003; Pannetier et al., 2005; Vallee et al., 2005). De plus, il a été constaté par RT-PCR que l'ARNm codant BTG4 est présent préférentiellement lors de la maturation folliculaire au

niveau du disque germinale des ovocytes chez le poulet, mais que son expression diminue continuellement après ovulation pour devenir presque indétectable 36h après fertilisation (Elis et al., 2008). L'expression de l'ARNm de BTG4 serait également stimulée après traitement à la FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) d'ovocytes de bovins (Chu et al., 2012). Chez ces derniers, une forte abondance de l'ARNm codant BTG4 a également été observée au niveau des testicules et des poumons (Pennetier et al., 2005). Une présence exclusive de l'ARNm codant BTG4 au niveau des ovaires et des testicules a également été constatée chez la souris (Liu et al., 2016) de même qu'une forte abondance de cet ARNm dans les ovocytes chez l'humain et la souris (Yu et al., 2016). Par ailleurs, il a été constaté que le niveau de l'ARNm de BTG4 est élevé au niveau de l'épithélium de la cavité nasale à partir du stade embryonnaire E16.5 (Buanne et al., 2000). De plus, l'expression de *BTG4* serait également induite par p53 (Dong et al., 2009).

Concernant les propriétés moléculaires de BTG4, des effets antiprolifératifs de BTG4 ont été observés chez la souris après sur-expression dans des cellules NIH3T3 (Buanne et al., 2000). Ces facultés antiprolifératives permettraient notamment à BTG4 d'avoir des propriétés anti-tumorales. Après analyse de l'abondance de l'ARNm codant BTG4 par RT-PCR dans différentes lignées cellulaires humaines de cancer gastrique, il a été découvert que dans la majorité de ces lignées, le niveau de l'ARNm de BTG4 était réduit de manière significative en comparaison d'une lignée saine. De plus, cette diminution d'expression serait due, au moins en partie, à une hyperméthylation du promoteur de *BTG4*. En effet, après traitement avec un inhibiteur de méthylase, l'ARNm codant BTG4 a été induit dans plusieurs lignées de cancer gastrique (Dong et al., 2009). De plus, cette même étude suggère que BTG4 permet, dans une certaine mesure, l'augmentation du mécanisme apoptotique chez des cellules cancéreuses traitées à la doxorubicine, ainsi que la réduction de la croissance tumorale chez les souris (Dong et al., 2009). L'hyperméthylation du promoteur de *BTG4* serait également impliquée dans le développement du cancer colorectal, ainsi que dans le développement de leucémies lymphoïdes chroniques (Deneberg et al., 2014; Toyota et al., 2008).

1.4.3.1.5 Tob1:

La protéine Tob, ou Tob1, pour *Transducer of ErbB-2*, a d'abord été identifiée chez l'Homme comme un partenaire d'ErbB-2 (ou HER2 pour *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), une oncoprotéine de la famille des récepteurs tyrosine kinase. Tob1, d'une taille de 45 kDa, est paralogue aux protéines de la famille BTG mais possède une partie C-terminale riche en prolines

et en glutamines non conservée (Matsuda et al., 1996). Tob1 possède divers orthologues chez la souris, le rat, *Xenopus laevis* ou encore *Danio rerio*, que l'on nommera Tob1 par souci de simplicité. L'expression de *Tob1* est ubiquitaire, et stimulée par l'acide rétinoïque (Kennedy et al., 2009). Elle serait également stimulée par p19^{Arf}, une protéine dont le locus est régulièrement muté, supprimé ou rendu silencieux dans différents cancers (Kuo et al., 2003). L'expression de la protéine Tob1 est également régulée par sa déstabilisation. Ainsi la région C-terminale de Tob1 permet sa redirection vers le protéasome après poly-ubiquitination (Hiramatsu et al., 2006; Sasajima et al., 2002). Il a également été découvert que l'ARNm codant Tob1 était une cible du micro-ARN miR-25, un micro-ARN dont l'expression est corrélée avec la progression métastatique dans le cas du cancer gastrique (Li et al., 2015a). Par ailleurs, chez la souris, l'ARNm codant Tob1 est la cible de miR-26a, un micro-ARN qui permet de promouvoir la régénération osseuse et d'inhiber la progression de l'ostéoporose (Li et al., 2015c).

Comme les protéines BTG, Tob1 présente des propriétés antiprolifératives qui ont été identifiées après expression dans des cellules NIH3T3 (Matsuda et al., 1996). La surexpression de Tob1 entraîne notamment un arrêt du cycle cellulaire par annulation de la transition de la phase G1 à S dans des cellules de cancer du sein MCF7 (O'Malley et al., 2009). Il a également été remarqué que les propriétés antiprolifératives de Tob1 étaient inhibées après phosphorylation de sa région C-terminale par ERK2, ainsi que par liaison à ErbB-2 (Maekawa et al., 2002; Matsuda et al., 1996).

Tob1 est impliquée dans l'organogénèse et le développement tissulaire. Chez la souris, Tob1 permet notamment la régulation de la masse osseuse, l'absence de son expression chez des souris ayant été associée à une augmentation de leur masse osseuse (Yoshida et al., 2000). Tob1 est également impliquée dans le maintien de l'état de quiescence de cellules immunitaires, un exemple précis étant celui des cellules Th17, facteurs primordiaux de la réponse aux infections bactériennes et fongiques également impliqués dans certaines maladies auto-immunes (Santarasci et al., 2014; Schulze-Toppoff et al., 2013; Tzachanis et al., 2001). Tob1 a également été identifiée comme un répresseur de la régénération hépatique (Ho et al., 2010) ainsi que comme un régulateur de la prolifération des cellules embryonnaires (Chen et al., 2015). Par ailleurs, il a été constaté que Tob1 est un facteur important de l'apprentissage et de la mémorisation dans le cas de la mémoire contextuelle et spatiale ainsi que dans l'acquisition de capacités motrices, de par son expression ciblée dans le cerveau chez le rat, notamment au niveau du cerebellum ou de l'hippocampe (Jin et

al., 2005; Wang et al., 2006). Tob1a, un des orthologues de Tob1 chez *Danio rerio*, a été identifié comme requis pour l'organisation dorso-ventrale lors de l'embryogénèse, tandis que l'autre orthologue, Tob1b, est exprimé à différents stades et au niveau de tissus bien précis, comme la notochorde, suggérant également un rôle de Tob1b dans l'embryogénèse (Shi et al., 2004; Xiong et al., 2006).

Les possibles rôles que pourrait avoir Tob1 dans certaines pathologies ont également été étudiés. Tob1 a notamment été impliquée dans le développement de cancers, en atteste le fait que des souris n'exprimant plus Tob1 développent spontanément divers types de tumeurs (Yoshida et al., 2003a). En effet, son expression est très fréquemment diminuée dans le cas du cancer du poumon ou de tumeurs gastriques (Iwanaga et al., 2003; Yu et al., 2011). Cependant, l'accumulation d'une forme phosphorylée de Tob1 est corrélée à un mauvais pronostic vital chez des patientes atteintes de cancer du sein exemptes d'atteinte ganglionnaire, ainsi que chez des patients atteints de cancer de la thyroïde (Helms et al., 2009; Ito et al., 2005). Par ailleurs, il a été constaté que l'expression de Tob1 permet la survie des cellules cancéreuses dans certains cas de cancer du sein indépendant des oestrogènes, tandis qu'elle limite la prolifération de cellules oestrogènes-dépendantes, mettant d'avantage en relief la complexité des effets de Tob1 dans le cas de cette pathologie (Zhang et al., 2016). En outre, il a été suggéré que Tob1 soit impliquée dans le développement de la sclérose en plaques. En effet, une forte diminution des quantités de l'ARNm et de la protéine Tob1 a été constatée chez des patients à un stade précoce de la maladie (Corvol et al., 2008).

Les mécanismes d'action de Tob1 ont également été étudiés. Ses propriétés antiprolifératives seraient liées à une diminution de l'expression de la cycline D1. En effet, il a été constaté qu'une forme native non phosphorylée de Tob1 engendre l'arrêt de la croissance cellulaire en supprimant l'expression de la cycline D1, tandis qu'une version de Tob1 phosphorylée par ERK1 et ERK2 ne peut pas entraîner cette répression (Suzuki et al., 2002). Une autre étude suggère que la diminution du niveau de l'ARNm de la cycline D1 serait due au recrutement d'une histone déacétylase par Tob1 au niveau de la région promotrice du gène codant la cycline D1 (Yoshida et al., 2003a). De plus, il a été montré que la surexpression de Tob1 dans des cellules du cancer du sein MCF7 entraîne une diminution de l'expression de diverses protéines impliquées dans la croissance tumorale, comme AKT ou SMAD4 (O'Malley et al., 2009). Il a également été proposé que Tob1 régule négativement la prolifération et la différenciation des ostéoblastes en réprimant la

transcription dépendante des protéines SMAD, affectant la voie de signalisation BMP/SMAD (Yoshida et al., 2000; Yoshida et al., 2003b). De plus, l'interaction de Tob1 et des protéines SMAD serait directement impliquée dans le maintien en quiescence des cellules T. Une étude a mis en évidence que la sur-expression de Tob1 dans des cellules T entraîne l'inhibition de la production de diverses cytokines et cyclines. Les auteurs de cette étude ont également proposé que Tob1 inhibe la transcription de l'interleukine 2 (IL-2) en favorisant la liaison de protéines SMAD au niveau d'un élément régulateur de son promoteur (Tzachanis et al., 2001). Par ailleurs chez le poisson-zèbre, Tob1a interagirait directement avec la β -caténine, empêchant ainsi sa liaison au facteur de transcription LEF1 (*Lymphoid Enhancer-binding Factor 1*), limitant ainsi le développement de la partie dorsale lors de l'embryogénèse (Xiong et al., 2006). Cette même étude suggère également que la protéine Tob1 permettrait la réduction de la transcription de gènes cibles par interaction avec SMAD3 ou la β -caténine chez la souris (Xiong et al., 2006).

1.4.3.1.6 Tob2 :

Tob2 et ses divers orthologues de diverses espèces seront réunis ici sous l'appellation Tob2. Chez la souris, *Tob2* est exprimé de manière ubiquitaire lors de l'embryogénèse, tandis qu'à l'âge adulte l'ARNm codant Tob2 est plus particulièrement exprimé dans les muscles squelettiques, les reins, le cœur, les poumons ainsi que dans les ovaires et les ovocytes (Ajima et al., 2000; Ikematsu et al., 1999). Chez l'Homme, l'expression de *Tob2* a également été constatée comme ubiquitaire, mais plus forte dans le muscle squelettique, le thymus, et les ovaires (Ikematsu et al., 1999). Il a été constaté chez le xénope que lors de l'embryogénèse l'ARNm codant Tob2 est exprimé de manière ubiquitaire du stade gastrula jusqu'au stade d'apparition du bourgeon caudal (Yoshida et al., 2003b).

La stabilité de Tob2, aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine, peut être régulée par différents facteurs. La dégradation de la protéine Tob2 peut être stimulée par relocalisation au niveau du protéasome après ubiquitination de sa partie C-terminale (Sasajima et al., 2002). L'ARNm codant Tob2 peut quant à lui être la cible de micro-ARN. Le messenger de Tob2 peut notamment être réprimé par miR-378, sous le contrôle de l'oncogène MYC (Feng et al., 2011). L'ARNm codant Tob2 semble également être la cible du cluster miR-302/367 codant pour le transcrit micro-ARN le plus abondant dans les cellules souches embryonnaires humaines (Lipchina et al., 2011). L'ARNm codant Tob2 serait également la cible de miR-322, un micro-ARN réprimé

par BMP-2, ainsi que de miR-378, un micro-ARN dont l'expression est augmentée dans le cas du cancer nasopharyngé (Gamez et al., 2013; Yu et al., 2014).

L'une des propriétés de Tob2 est d'inhiber la progression du cycle cellulaire lors du passage de la phase G0/G1 à la phase S (Ikematsu et al., 1999). De plus, Tob2 présente divers rôles physiologiques. Une étude a montré que des souris n'exprimant plus Tob2 présentaient une masse osseuse moins importante et un plus grand nombre d'ostéoclastes différenciés par rapport aux souris contrôles, ce qui ferait de Tob2 un régulateur de la masse osseuse (Ajima et al., 2008). Tob2 serait également responsable de l'inhibition de l'adipogénèse, ainsi que de la régulation de la prolifération des cellules embryonnaires chez la souris (Chen et al., 2015; Takahashi et al., 2012b). Concernant l'activité moléculaire de Tob2, il a été suggéré que Tob2 inhiberait la progression cellulaire par répression de la transcription de la cycline D1 (Feng et al., 2011). Par ailleurs, Tob2 est capable d'interagir avec CAF1 et inhiberait le cycle cellulaire par dégradation de l'ARNm d'ID3 (*Inhibitor of DNA binding 3*), un inhibiteur de facteurs de transcription (Chen et al., 2015; Ikematsu et al., 1999). Chez le xénope, Tob2 interagirait avec la protéine inhibitrice SMAD6. Leurs sur-expressions chez des embryons de xénope entraîneraient l'induction d'axes dorsaux secondaires à la suite de l'inhibition de la voie BMP (Yoshida et al., 2003b). De plus, l'interaction de Tob2 avec SMAD6 empêcherait l'expression de PPAR γ 2 (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ 2*) et résulterait en une inhibition de l'adipogénèse (Takahashi et al., 2012b). Il a également été suggéré que, chez la souris, Tob2 serait capable de diminuer la transcription de gènes cibles par interaction avec SMAD3 ou la β -caténine (Xiong et al., 2006). Tob2 serait également capable de supprimer l'activation de la transcription engendrée par des récepteurs aux androgènes chez des précurseurs d'ostéoblastes (Kawate et al., 2005). De plus, il a été suggéré que Tob2 régulerait la voie de transcription stimulée par la vitamine D₃ en interagissant avec son récepteur, empêchant la différenciation des ostéoclastes. (Ajima et al., 2008).

1.4.3.2 La famille BTG/Tob et la désadénylation :

Du fait de l'interaction directe de tous les facteurs BTG/Tob avec la désadénylase CAF1, une fonction de ces protéines dans la désadénylation/dégradation des ARNm a été envisagée.

La protéine Tob1 a notamment été identifiée comme activateur cytoplasmique de la désadénylation des ARNm. Tob1 est capable d'interagir avec CAF1 et PABPC1 de manière simultanée et est localisée au niveau des P-bodies dans des cellules de souris NIH3T3. La même étude a déterminé

que l'interaction de Tob1 avec PABPC1 s'effectue par le biais des motifs PAM2 de Tob1 et est indispensable à l'activation de la désadénylation par Tob1 *in vitro* (Ezzeddine et al., 2007). La structure du complexe hTob1(1-138)-hCAF1 a notamment pu être résolue, mettant en lumière l'interaction de hCAF1 et de hTob1 via les régions boxA et boxB du domaine APRO de hTob1 (Horiuchi et al., 2009). Trois acides aminés de hTob1 ont été identifiés comme nécessaires à l'interaction avec CNOT7 et CNOT8, la phénylalanine en position 55 (F55), l'aspartate en position 65 (D65), ainsi que le tryptophane en position 93 (W93). L'absence de propriétés antiprolifératives d'un mutant W93A, pour lequel le résidu tryptophane en position 93 est remplacé par une alanine, a montré que la liaison à CAF1 est nécessaire aux propriétés antiprolifératives de Tob1 (Doidge et al., 2012). L'analyse de la structure de Tob1 par résonance magnétique nucléaire (RMN) ainsi que l'utilisation de *western blot* ont permis la proposition d'un modèle où Tob1 lie d'une part CAF1 via son domaine APRO, et d'autre part le domaine MLE de PABPC1 via ses motifs PAM2, permettant de rapprocher la désadénylase CAF1 de son substrat ARN polyadénylé (Ruan et al., 2010) (Figure 10). Ce modèle de recrutement a été notamment renforcé par le fait que le couplage de Tob1 ou de Tob2 à un ARNm par la technique de *tethering* entraîne sa désadénylation et sa dégradation indépendamment de la présence de PABPC1, mais en nécessitant la présence de CAF1 (Ezzeddine et al., 2012). De plus, Tob1 est capable d'induire la désadénylation, et donc la dégradation d'un lot d'ARNm précis. En effet, la partie C-terminale de Tob1 est capable de se lier à la partie C-terminale d'une protéine nommée CPEB3 (*Cytoplasmic Polyadenylation Element-Binding Protein 3*). CPEB3 est capable de se lier à des structures secondaires formées par des séquences ARN spécifiques en 3' UTR de certains ARNm. On connaît pour l'instant deux cibles de Tob1 régulées de cette manière, d'une part le récepteur AMPA GLUR2 (*AMPA-selective GLUtamate Receptor 2*) impliqué dans la plasticité synaptique, et d'autre part le proto-oncogène MYC (Hosoda et al., 2011; Ogami et al., 2014). Tob1 est donc un acteur important de la désadénylation, qui permet de rapprocher le complexe CCR4-NOT, et plus particulièrement CAF1, de son substrat.

BTG2 a également été impliquée dans le mécanisme de désadénylation. En effet, BTG2 a été identifiée comme un activateur de la désadénylation, nécessitant l'activité des deux sous-unités désadénylase de CCR4-NOT, CAF1 et CCR4, pour stimuler la dégradation de la queue poly(A). Cette activité a été observée sur tous les transcrits testés (Mauxion et al., 2008) et à ce jour aucune cible spécifique de BTG2 n'a été identifiée. La structure de BTG2 a également été résolue (Yang

et al., 2008). La comparaison par superposition de la structure de BTG2 avec celle de Tob1 en complexe avec CAF1 montre que le domaine APRO adopte un repliement qui lui est propre et que l'interaction avec CAF1 n'entraîne pas de changement conformationnel du domaine APRO. Cette observation permet d'identifier trois résidus de BTG2 : Y65, D75 ainsi que W103 comme important pour l'interaction de BTG2 avec CAF1. Leur mutation montre que l'absence de ce dernier a l'effet le plus délétère sur l'interaction. De plus, le mutant BTG2 W103A, pour lequel le résidu tryptophane en position 103 de BTG2 a été substitué par une alanine, ne présente aucune activité antiproliférative après transfection dans des cellules MCF7 ainsi qu'aucune réduction du pourcentage de cellules en phase S ou enrichissement du nombre de cellules en phase G1 en comparaison de BTG2 sauvage. Ceci signifie que l'interaction avec CAF1 est nécessaire aux propriétés antiprolifératives de BTG2. De plus, la fixation de la protéine BTG2 sauvage en 3' UTR d'un transcrit luciférase résulte en la diminution du niveau de ce transcrit ainsi que de sa traduction, ce qui n'est pas observé dans le cas de BTG2 W103A, indiquant que le recrutement de BTG2 en 3' UTR induit la diminution de la traduction ainsi que la dégradation d'un transcrit d'une façon CAF1-dépendante. De façon surprenante, ces effets sont indépendants de CCR4 ou des sous-unités CNOT1 ou CNOT3 (Doidge et al., 2012).

Au début de ma thèse, aucune donnée n'était disponible sur le rôle de BTG1, BTG3 ou BTG4 dans la désadénylation des ARN messagers.

1.5 Présentation des projets :

L'importance des processus de dégradation des ARNm impliquant le complexe CCR4-NOT pour la régulation de l'expression des gènes nous a amené à étudier les protéines de la famille BTG/Tob et leur impact sur l'activité désadénylase de ce complexe. Deux membres de la famille BTG/Tob, Tob1 et BTG2, avaient déjà été identifiés comme activateurs de la désadénylation des messagers. Le mécanisme d'action proposé pour Tob1 consiste en un recrutement de CAF1, associée à Tob1 par son domaine APRO, au niveau d'un ARNm sur lequel sont fixées plusieurs protéines PABP par l'intermédiaire de l'interaction de Tob1 à PABPC1 via ses motifs PAM2, ce qui permet ainsi d'amener la désadénylase sur son substrat (Figure 10). Il n'était pas possible de proposer un modèle similaire pour BTG2, du fait de l'absence d'identification de motifs PAM2 dans la séquence de BTG2.

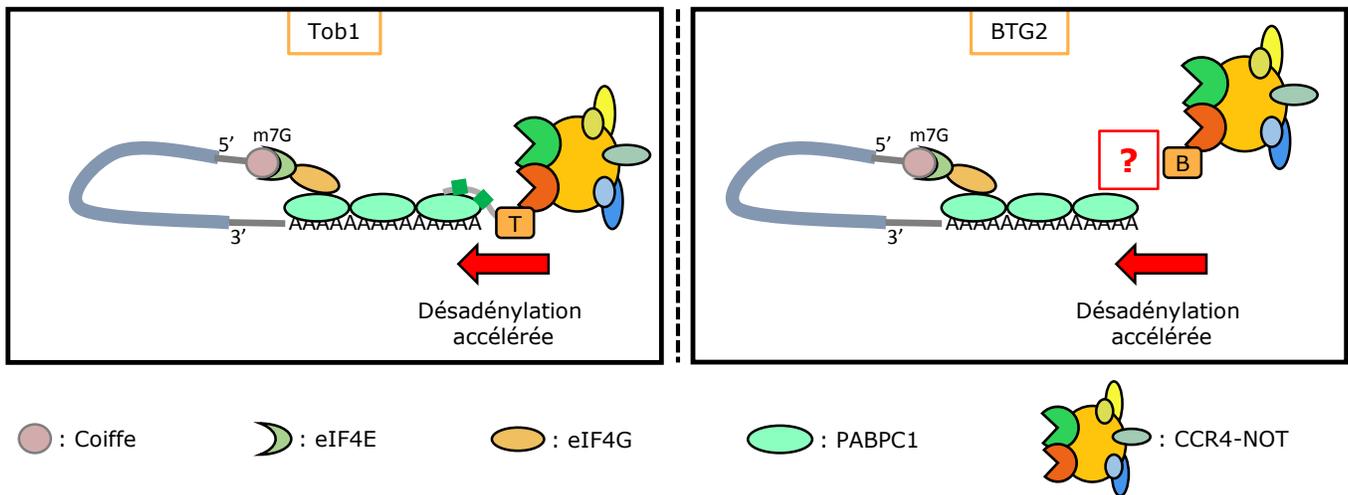


Figure 10 : Représentation schématique de Tob1 et BTG2 comme stimulateurs de la désadénylation.
 Le modèle de recrutement de CAF1 à son substrat par le biais de Tob1 (T) est représenté dans le panneau de gauche. Ce modèle ne peut pas être proposé pour BTG2 (B) étant donné l'absence de motifs PAM2 chez ce dernier.

L'un des objectifs de cette thèse était donc d'élucider le mécanisme par lequel BTG2 stimule la désadénylation des ARNm. Des résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire ont montré que, d'une part le domaine APRO de BTG2 était suffisant pour stimuler l'activité désadénylase de CAF1, et que d'autre part le domaine APRO de BTG2 était capable d'interagir avec une partie de la protéine PABPC1, de l'acide aminé 1 à 146, dans un essai double-hybride chez la levure.

Partant de cela, j'ai essayé de répondre à plusieurs questions :

- L'interaction entre BTG2, CAF1 et PABPC1 peut-elle être détectée *in cellulo* ?
- Cette interaction est-elle nécessaire pour la stimulation de la désadénylation par BTG2 ?
- Cette interaction entraîne-t-elle un impact de BTG2 sur la traduction des protéines ?
- Le domaine APRO de BTG2 est-il suffisant pour les propriétés antiprolifératives de BTG2 ? Les interactions de BTG2 avec CAF1 et PABPC1 sont-elles nécessaires pour l'activité antiproliférative de BTG2 ?

Afin de répondre à ces questions, différentes approches et techniques ont été utilisées. Notamment, des expériences de co-immunoprécipitation, d'amplification par RT-PCR des queues poly(A) d'ARN rapporteurs, l'utilisation du test de *Proximity Ligation Assay* et des essais de prolifération

cellulaire ont été effectués après transfection dans des cellules en culture. Aussi, des essais de désadénylation et de traduction *in vitro* ont été réalisés.

Par ailleurs, aucune donnée n'était disponible concernant l'implication de deux autres membres de la famille BTG/Tob, à savoir BTG3 et BTG4, dans la désadénylation et la dégradation des ARNm. L'autre objectif de cette thèse était donc d'identifier si ces deux protéines étaient capables d'impacter la désadénylation. Une réponse partielle à cette question a pu être fournie dans le temps imparti de la thèse.

Une partie des résultats obtenus lors de cette thèse a été rassemblée dans un article publié dans la revue *Nature Communications* en début d'année 2016.

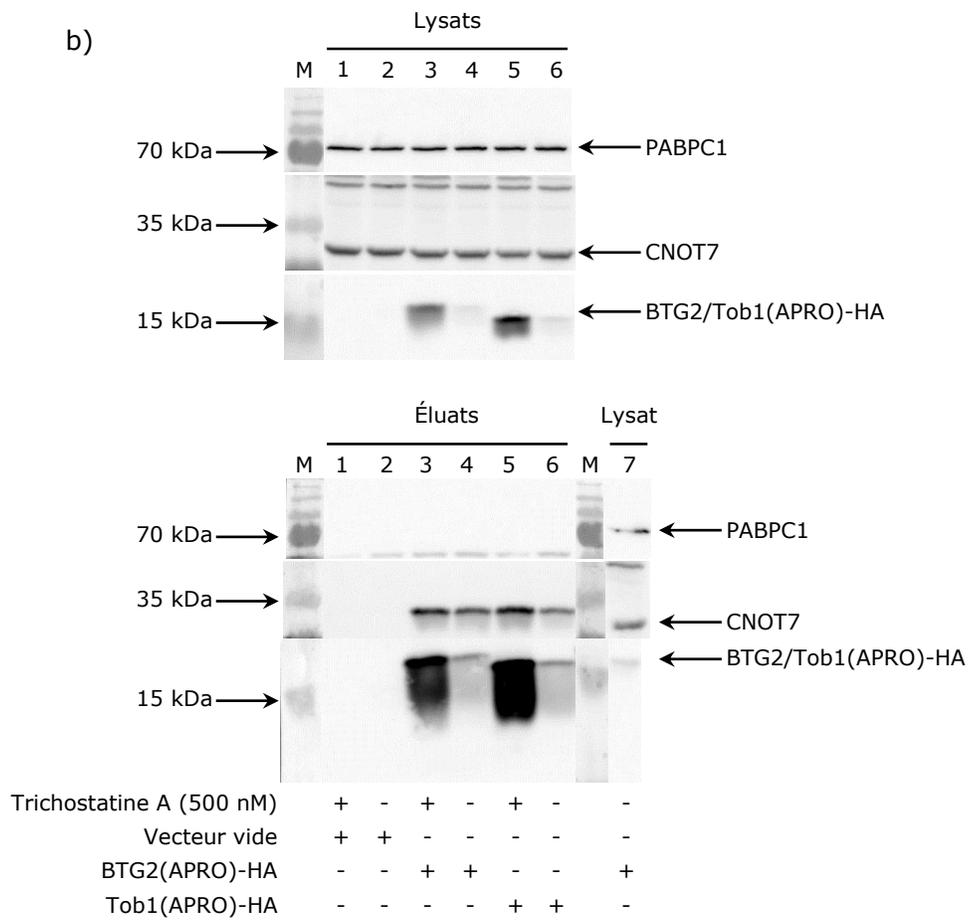
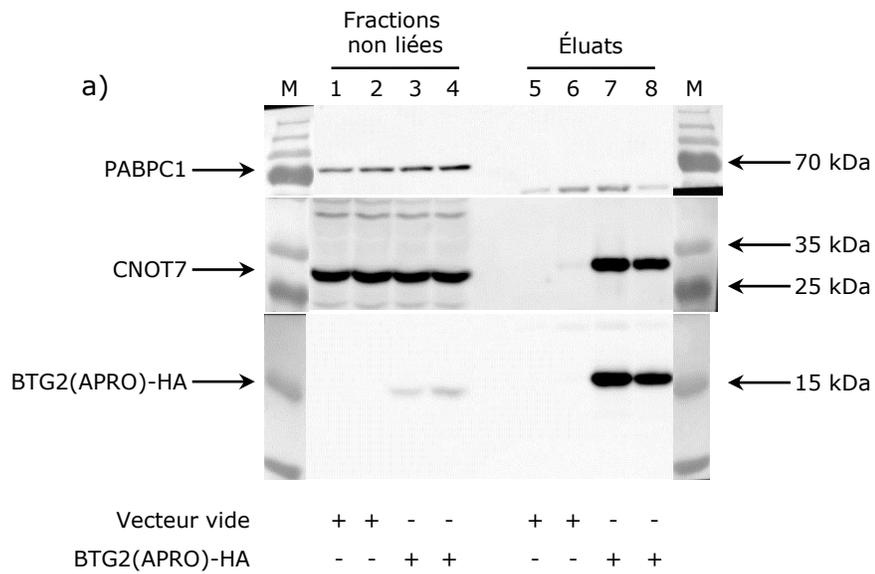
2. RÉSULTATS

2 RÉSULTATS :

2.1 Mise en évidence de l'interaction entre BTG2(APRO) et PABPC1 dans des cellules :

2.1.1 Expérience de co-immunoprécipitation :

L'objectif de l'expérience était de détecter l'interaction entre le domaine APRO de BTG2 et PABPC1 endogène après sur-expression de protéines recombinantes BTG2 marquées HA dans des cellules humaines. Pour ce faire des cellules HEK293 ont été transfectées en duplicata avec, soit un vecteur d'expression vide, soit une construction plasmidique codant pour le domaine APRO de BTG2 sauvage marqué HA en C-terminal (BTG2(APRO)-HA). Après co-immunoprécipitation, les protéines présentes dans les différentes fractions d'élution ont été visualisées par *western blot* (Figure R1a)). Comme attendu, les fractions non liées des cellules transfectées avec un vecteur d'expression vide présentent les protéines CNOT7 (un des paralogues humains de CAF1) et PABPC1, mais pas BTG2(APRO) (puits 1 et 2). Les fractions non liées des cellules transfectées avec un vecteur codant pour la protéine BTG2(APRO) présentent effectivement cette dernière, ainsi que CNOT7 et PABPC1 (puits 3 et 4). On constate que PABPC1, CNOT7 et BTG2 sont absentes des fractions d'élution obtenues avec des cellules transfectées avec un vecteur d'expression vide, ce qui est attendu pour ce contrôle négatif (puits 5 et 6). Les cellules sur-exprimant BTG2(APRO) sauvage présentent CNOT7 mais pas PABPC1 dans leurs fractions d'élution (puits 7 et 8). L'interaction entre PABPC1 et BTG2(APRO) sauvage n'est donc pas détectée dans cette expérience *in cellulo*. Un de nos collaborateurs nous ayant indiqué que l'acétylation de BTG2 favorisait son interaction avec CNOT7, nous avons supposé que l'acétylation de BTG2 pouvait également influencer favorablement l'interaction avec PABPC1. Des cellules HEK293 ont donc été transfectées avec comme précédemment un plasmide exprimant BTG2(APRO)-HA et en plus un plasmide exprimant le domaine APRO de TOB1 sauvage marqué HA en C-terminal (Tob1(APRO)-HA). 24h après transfection, les cellules HEK293 ont été traitées, ou non, sur la nuit avec 500 nM de trichostatine A, un inhibiteur de déacétylases. Les lysats cellulaires ainsi que les fractions d'élution obtenues après co-immunoprécipitation ont été révélés par *western blot* (Figure R1b)). On constate que PABPC1 et CNOT7 sont détectées dans tous les lysats cellulaires (Figure R1b) puits 1 à 6 des lysats). Par ailleurs, les lysats cellulaires des cellules transfectées avec un vecteur codant pour les protéines recombinantes BTG2/Tob présentent effectivement ces dernières (Figure R1b) puits 3 à 6 des lysats).



(Légende en page suivante)

Figure R1 : Co-immunoprécipitation de PABPC1 et CNOT7 endogènes avec BTG2(APRO).

(a) Des cellules HEK293 ont été transfectées avec un plasmide exprimant le domaine APRO de BTG2 sauvage marqué HA en C-terminal (BTG2(APRO)-HA) ou avec un vecteur d'expression vide. La protéine BTG2 a été précipitée avec des billes d'agarose couplées à des anticorps monoclonaux anti-HA et révélée par *western blot* avec des anticorps anti-HA après migration sur gel SDS-PAGE 12% des éluats et des fractions non liées aux billes d'agarose. Les protéines endogènes PABPC1 et CNOT7 co-précipitées ou non ont respectivement été révélées avec des anticorps anti-PABPC1 et anti-CNOT7 ciblant les protéines endogènes. Les protéines d'intérêt, ainsi que les tailles des marqueurs de poids moléculaires sont indiquées. (b) Identique à (a), à l'exception des plasmides utilisés qui expriment le domaine APRO de BTG2 ou de Tob1 sauvage marqué HA en C-terminal (BTG2(APRO)-HA ou Tob1(APRO)-HA). 24h après transfection les cellules ont été traitées sur la nuit avec 500 nM de trichostatine A ou du DMSO.

Cependant, on constate que les signaux correspondant aux protéines BTG2(APRO)-HA et Tob1(APRO)-HA sont plus forts après traitement trichostatine A (Figure R1b, comparer deux à deux l'intensité de signal des puits 3-4 et 5-6 des lysats). Après immunoprécipitation anti-HA, les protéines recombinantes BTG2/Tob sont retrouvées dans les éluats avec un signal plus faible dans le cas de cellules non traitées à la trichostatine A, en accord avec leur abondance dans les lysats cellulaires (Figure R1b) comparer deux à deux l'intensité de signal des puits 3-4 et 5-6 des éluats). De plus, CNOT7 est détectée dans les éluats de cellules transfectées avec une construction exprimant BTG2(APRO) ou Tob1(APRO) (Figure R1b) puits 3 à 6 des éluats), mais PABPC1 n'est détectée dans aucune fraction d'élution (Figure R1b) puits 1 à 6 des éluats) alors qu'elle est bien détectée dans les lysats de départ. Ainsi, même après l'ajout de trichostatine A, une interaction entre BTG2(APRO) et PABPC1 n'a pas pu être détectée par la technique de co-immunoprécipitation. Une autre approche a donc été tentée.

2.1.2 Utilisation de la technique PLA (*Proximity Ligation Assay*) pour détecter une interaction entre le domaine APRO de BTG2 et PABPC1 *in cellulo* :

La technique de PLA permet de visualiser par signaux fluorescents si deux protéines d'intérêt sont présentes dans la cellule à moins de 40 nm l'une de l'autre (cf section Matériel et Méthodes pour une description détaillée de la technique), ce qui suggère fortement que ces deux protéines peuvent interagir. Nous avons choisi d'utiliser cette technique car elle peut révéler des interactions transitoires entre protéines, contrairement à la technique d'immunoprécipitation.

Des cellules U2OS ou HeLa W.S ont été transfectées avec des constructions codant soit pour le domaine APRO de BTG2 sauvage marqué HA (BTG2(A)-HA), le domaine APRO de Tob1 sauvage marqué HA (Tob1(A)-HA) ou une protéine du réticulum endoplasmique ERO1L (*Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin-1-Like protein*) marquée HA (ERO1L-HA). Les protéines

Tob1(A)-HA et ERO1L-HA sont des contrôles négatifs puisque Tob1(APRO) n'est pas censé interagir directement avec PABPC1 et que ERO1L est une protéine localisée au niveau du

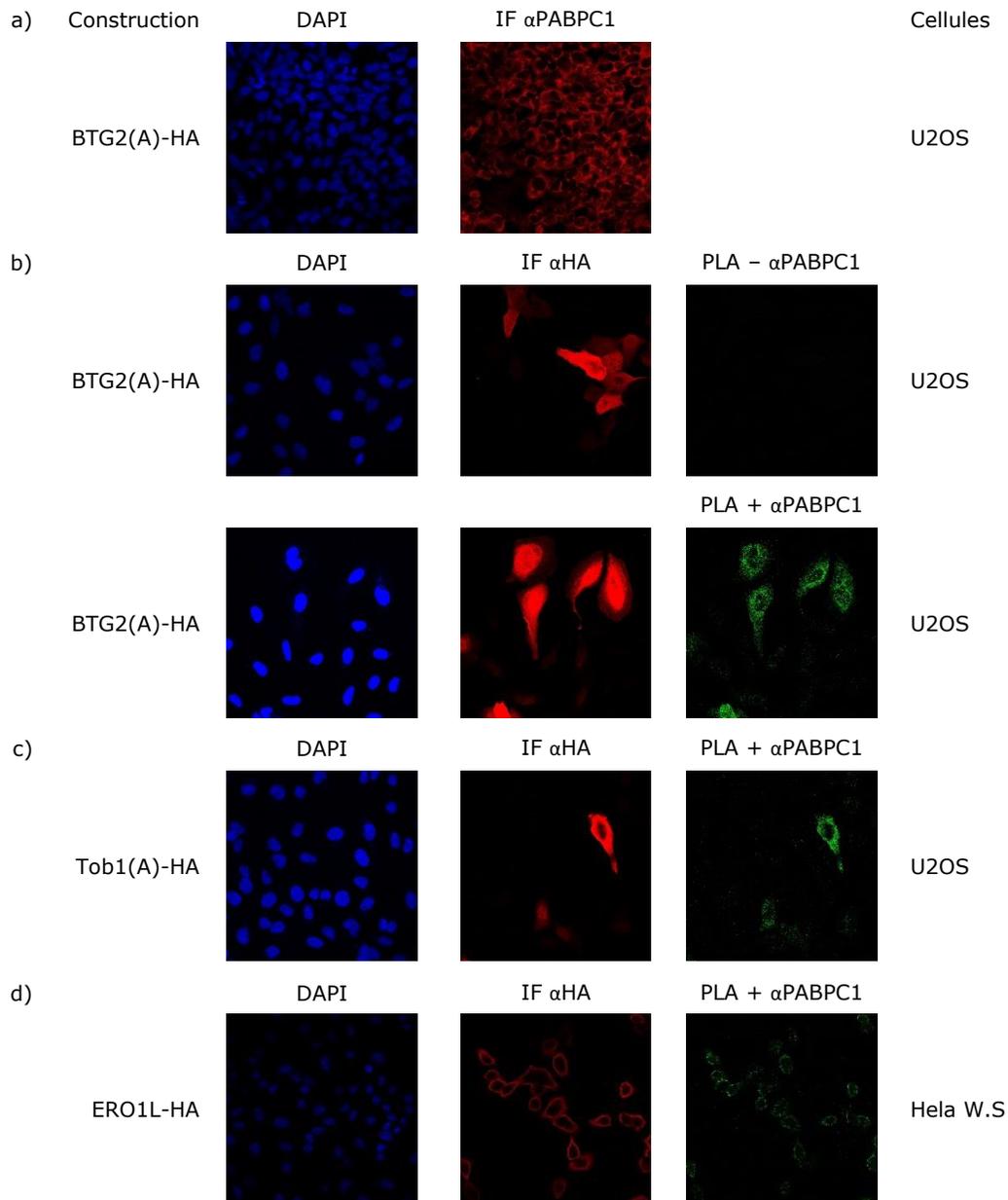


Figure R2 : Essai PLA entre PABPC1 endogène et diverses protéines étiquetées HA. Des cellules U2OS ou HeLa W.S ont été transfectées avec un plasmide exprimant (a) et (b) le domaine APRO de BTG2 sauvage, (c) le domaine APRO de Tob1 sauvage ou (d) la protéine du réticulum endoplasmique ERO1L, toutes marquées HA en C-terminal (BTG2(A)-HA, Tob1(A)-HA ou ERO1L-HA). Les cellules transfectées ont ensuite été traitées PLA ou non, puis révélées par immunofluorescence à l'aide d'anticorps contre le marquage HA ou contre la protéine PABPC1 endogène avant marquage au DAPI et observation au microscope confocal.

réticulum endoplasmique qui a été retrouvée au niveau du lumen mais également associée à la membrane du réticulum endoplasmique (Anelli et al., 2003; Cabibbo et al., 2000). Les cellules transfectées sont révélées par immunofluorescence contre les protéines sur-exprimées après traitement PLA et marquage avec 0,1 µg/ml de marqueur nucléaire 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) avant d'être visualisées avec un microscope confocal (Figure R2). Des signaux nucléaires bleus caractéristiques du marquage DAPI sont détectés dans toutes les populations cellulaires observées. Des signaux rouges très majoritairement cytoplasmiques sont détectés dans toutes les cellules, qu'elles expriment BTG2(APRO)-HA ou non, après traitement avec un anticorps primaire anti-PABPC1, en accord avec une expression majoritairement cytoplasmique et faiblement nucléaire de PABPC1 endogène (Figure R2a)). Des signaux rouges diffus dans le cytoplasme et le noyau sont détectés dans les cellules sur-exprimant la construction BTG2(A)-HA (Figure R2b)). Aucun signal PLA n'est détecté après traitement PLA sur ces cellules avec omission volontaire de l'anticorps primaire anti-PABPC1, attestant ainsi de la spécificité des signaux observés par PLA (Figure R2b)). Par contre, en présence de l'anticorps anti-PABPC1, on observe de nombreux signaux PLA dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules exprimant BTG2(APRO)-HA (Figure R2b)), alors qu'aucun signal PLA n'est détecté dans les cellules non transfectées. Ainsi, les signaux PLA observés sont bien dus à la détection des protéines PABPC1 et BTG2(APRO)-HA. Cependant, des signaux PLA sont également retrouvés dans des cellules exprimant les protéines recombinantes Tob1(APRO)-HA ou ERO1L-HA (Figure R2c) et R2d)). Des résultats identiques ont été observés après sur-expression d'autres protéines de fusion n'étant pas supposées interagir avec PABPC1. La méthode PLA ne permet donc pas de montrer une interaction spécifique entre PABPC1 endogène et le domaine APRO de BTG2.

2.1.3 Co-immunoprécipitation de PABPC1 endogène avec le domaine APRO de BTG2 après réticulation :

Partant de l'hypothèse que l'interaction entre PABPC1 et BTG2 pouvait être peu stable *in cellulo*, des expériences de co-immunoprécipitation ont été répétées après traitement des cellules avec un agent de réticulation, afin de stabiliser l'interaction entre ces deux protéines. Des cellules HEK293 ont été transfectées, en duplicata, avec un vecteur exprimant soit GFP, soit le domaine APRO de BTG2 sauvage marqué en N-terminal à la GFP et en C-terminal avec une étiquette HA (GFP-BTG2(A)-HA). 24h après transfection, les cellules ont été traitées avec 0,25 mM Dithio-bis Succinimidyl Propionate (DSP) pendant 30 min à température ambiante et lysées en présence de

RNAseA. Après immunoprécipitation avec des billes GFP-trap, les éluats et les lysats cellulaires correspondants ont été analysés par *western blot* (Figure R3).

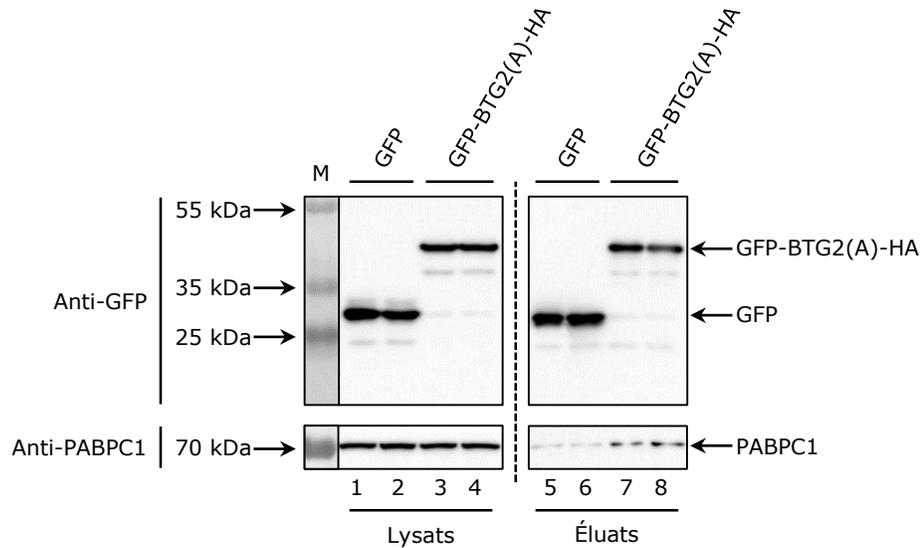


Figure R3 : Co-immunoprécipitation de PABPC1 endogène avec le domaine APRO de BTG2 après réaction de réticulation.

Des cellules HEK293 ont été transfectées avec un plasmide exprimant soit la GFP, soit le domaine APRO de BTG2 sauvage fusionné en N-terminal avec la GFP et présentant une étiquette HA en C-terminal (GFP-BTG2(A)-HA). 24h après transfection, les cellules ont été traitées avec 0,25 mM de Dithio-bis Succinimidyl Propionate (DSP) puis lysées en présence de RNAse A. Les protéines ont ensuite été précipitées avec des billes GFP-trap, puis les profils protéiques des lysats cellulaires et des fractions d'éluat ont été analysés par *western blot* après migration sur gel SDS-PAGE 10% et révélation avec des anticorps anti-GFP et anti-PABPC1. Les protéines d'intérêt, ainsi que les tailles des marqueurs de poids moléculaires sont indiquées.

Les lysats cellulaires ainsi que les éluats des cellules transfectées avec un vecteur codant pour GFP ou GFP-BTG2(APRO)-HA présentent effectivement ces dernières (respectivement puits 1 à 4 et 5 à 8, révélation anti-GFP). Par ailleurs, PABPC1 est retrouvée dans tous les lysats cellulaires (puits 1 à 4, révélation anti-PABPC1). De plus, on constate que la bande correspondant à PABPC1 est plus intense dans les éluats de cellules exprimant GFP-BTG2(APRO)-HA par rapport aux éluats de cellules exprimant GFP (comparer respectivement les puits 7 et 8 aux puits 5 et 6, révélation anti-PABPC1). PABPC1 n'est pas détectée dans les éluats après avoir pratiqué la même expérience en l'absence de DSP (données non montrées). On peut donc conclure que le complexe BTG2(APRO)-PABPC1 peut se former *in cellulo*.

2.2 Étude *in vitro* de l'activité stimulatrice de BTG2 dans le processus de désadénylation :

2.2.1 Préparation des essais de désadénylation *in vitro* :

Il était d'intérêt de savoir si l'interaction entre BTG2(APRO) et PABPC1 avait une quelconque influence sur l'activité désadénylase de CNOT7. Pour répondre à cette question, j'ai mené des expériences de désadénylation *in vitro*.

Les essais de désadénylation consistent en la mise en présence d'un substrat polyadénosines, marqué en 5' avec de la fluorescéine, avec différentes associations de protéines BTG, Tob, CNOT7 et/ou PABPC1. Les produits de dégradation obtenus sont ensuite fractionnés sur gel de polyacrylamide dénaturant puis visualisés par fluorescence. La première étape de préparation a été de purifier les protéines qui allaient être utilisées dans l'essai.

2.2.1.1 Purification des protéines :

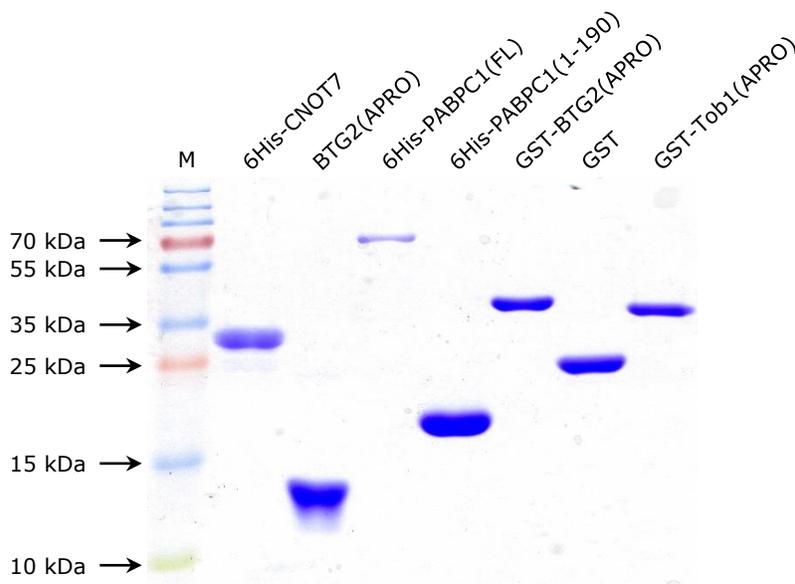


Figure R4 : Protéines utilisées pour les premiers essais de désadénylation *in vitro*. 5 µg de chaque protéine ont été fractionnés sur gel SDS-PAGE 12% et détectés par coloration au bleu de Coomassie.

Les différentes protéines utilisées dans les essais de désadénylation sont présentées sur la Figure R4. Elles correspondent à des protéines marquées avec 6 histidines en N-terminal, qui correspondent à CNOT7 (6His-CNOT7), PABPC1 sauvage complète (6His-PABPC1(FL)), ou à une protéine PABPC1 tronquée ne comprenant que les deux premiers domaines RRM (6His-PABPC1(1-190)). Des protéines de fusion avec la GST ont également été utilisées ; il s'agit du

domaine APRO de BTG2 sauvage (GST-BTG2(APRO)) et du domaine APRO de Tob1 sauvage (GST-Tob1(APRO)). Dans certaines expériences, la protéine BTG2(APRO), obtenue après clivage de l'étiquette GST par la thrombine, a aussi été utilisée. La protéine GST seule a également été purifiée pour servir de contrôle. Après expression dans *Escherichia coli*, ces protéines ont été purifiées, soit uniquement par chromatographie d'affinité manuelle, soit par chromatographie d'affinité suivie d'une chromatographie d'exclusion stérique par HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*, voir Matériel et Méthodes). La Figure R4 représente le profil obtenu après migration de 5 µg de chaque protéine sur gel SDS-PAGE 12%. La faible quantité de 6His-PABPC1(FL) observée est très vraisemblablement due à la présence de nombreux fragments protéiques plus petits dans l'échantillon, ce qui conduit à une inexactitude dans l'estimation de la quantité de 6His-PABPC1(FL).

2.2.1.2 Synthèse d'un substrat de 75 adénosines marqué à la fluorescéine :

Afin d'évaluer l'activité désadénylase de CNOT7 *in vitro*, des substrats d'une taille approchant les 75 adénosines ont été obtenus par extension d'un oligonucléotide ARN d'une taille de 20 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine, à l'aide de la Poly(A) Polymérase d'*E. coli*. Un résumé de la méthode utilisée ainsi qu'un exemple de substrats obtenus après purification par électrophorèse sur gel acrylamide dénaturant sont présentés en Figure M2 de la section Matériel et Méthodes. D'après les études antérieures de PABPC1 (Baer and Kornberg, 1983) un substrat d'une taille proche de 75 adénosines devrait pouvoir être lié par trois molécules de 6His-PABPC1(FL). Ce choix a été fait afin de ne pas occulter un hypothétique effet de la liaison coopérative de PABPC1 à un substrat polyadénosines sur l'activité désadénylase de CNOT7.

2.2.1.3 Mise au point d'un tampon de réaction adapté :

Les conditions réactionnelles ont dû être mises au point afin de permettre à la fois la liaison de 6His-PABPC1(FL) au substrat polyadénosines et l'activité désadénylase de 6His-CNOT7 *in vitro*. Pour ce faire, le substrat polyadénosines a été incubé à une concentration de 100 nM dans divers tampons (IIA, IIB, IIC, IID, IIE et IIF, compositions détaillées dans la légende de la Figure R5) soit en présence d'un excès théorique de 1,2 µM de 6His-PABPC1(FL) soit en présence de 1,8 µM de 6His-CNOT7. Après incubation pendant 0 ou 20 min, les ARN présents dans les échantillons ont été fractionnés sur gel natif acrylamide 6% afin de permettre la visualisation de la

désadénylation du substrat, ou de son association avec 6His-PABPC1(FL) par la technique de retard sur gel (EMSA). Le gel obtenu est présenté en Figure R5.

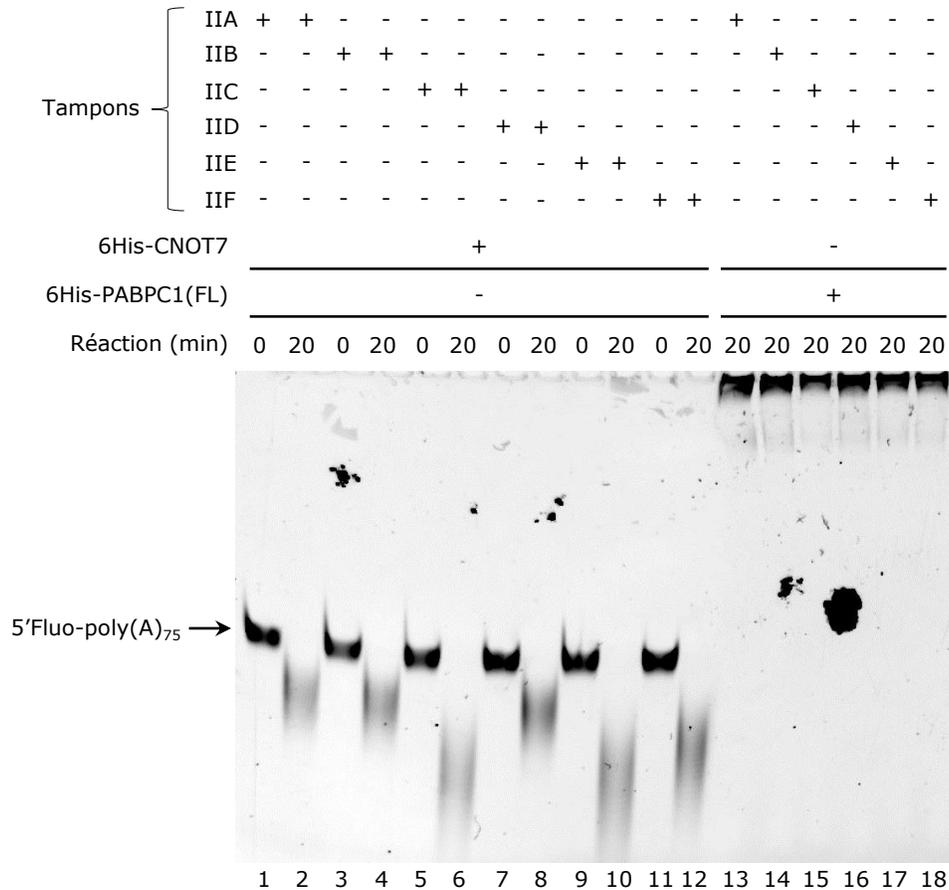


Figure R5 : Détermination d'un tampon permettant le recouvrement d'un substrat polyadénosines par 6His-PABPC1(FL) ainsi que sa dégradation par CNOT7 *in vitro*. Visualisation de la capacité de 6His-PABPC1(FL) à lier un substrat polyadénosines par la technique d'EMSA et visualisation de la capacité de 6His-CNOT7 à dégrader ce même substrat *in vitro* en présence de différents tampons. Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été incubé en présence de divers tampons avec soit 1,2 µM de 6His-PABPC1(FL) pendant 20 min à 23°C, soit avec 1,8 µM de 6His-CNOT7 pendant 20 min à 30°C. Les réactions ont ensuite été chargées sur gel d'acrylamide natif 6% puis migrées à 3W à 4°C pendant 2h avant révélation avec un appareil *ImageQuant™ LAS4000*. Les compositions des différents tampons utilisés sont présentées ci-dessous.

IIA	IIB	IIC	IID	IIE	IIF
10 mM Tris-HCl	20 mM HEPES KOH	20 mM HEPES KOH	10 mM Tris-HCl	20 mM HEPES KOH	10 mM Tris-HCl
100 mM KCl	100 mM KCl	100 mM KCl	100 mM KCl	100 mM KCl	100 mM KCl
0,5 mM DTT	10 mM DTT	0,5 mM DTT	10 mM DTT	10 mM DTT	0,5 mM DTT
0,1% NP-40	0,1% NP-40	0,1% NP-40	0,1% NP-40	0,1% NP-40	0,1% NP-40
1 mM MgAc	1 mM MgAc	5 mM MgAc	1 mM MgAc	5 mM MgAc	5 mM MgAc

Comme on peut le constater, tous les tampons testés lors de cette expérience permettent la désadénylation partielle d'un substrat polyadénosines au bout de 20 min (puits 2, 4, 6, 8, 10 et 12), ainsi qu'une liaison totale de 6His-PABPC1(FL) au substrat adénylé au bout de 20 min (puits 13 à 18). On remarque cependant que la présence d'acétate de magnésium (MgAc) à une concentration de 5 mM, permet une meilleure activité de CNOT7 en comparaison des tampons ne présentant qu'1 mM MgAc (comparer les puits 2, 4 et 8 aux puits 6, 10 et 12). On constate également qu'à composition identique, l'utilisation de 10 mM Tris au lieu de 20 mM HEPES diminue l'activité de CNOT7 (comparer le puits 12 au puits 10, respectivement), tandis que l'augmentation de la concentration en agent réducteur DiThioThreitol (DTT) de 0,5 à 10 mM ne semble pas affecter l'activité de CNOT7 (comparer le puits 6 au puits 10, respectivement). Ainsi, le tampon IIC qui entraîne l'une des plus fortes désadénylations du substrat au bout de 20 min (puits 6) a été choisi comme tampon par défaut pour les réactions de désadénylation.

2.2.1.4 Mise au point de la quantité de 6His-PABPC1 nécessaire à la liaison totale au substrat :

Ayant trouvé un tampon permettant à la fois l'activité désadénylase de 6His-CNOT7 ainsi que la liaison de 6His-PABPC1(FL) à un substrat polyadénosines, j'ai voulu connaître les quantités minimales des protéines PABPC1, complètes ou ne comportant que les deux premiers domaines RRM, nécessaires au recouvrement total du substrat. Pour ce faire, j'ai incubé pendant 20 min à 23°C 100 nM de substrat polyadénosines en présence de quantités croissantes de 6His-PABPC1(FL) (concentrations de 0,075 μ M ; 0,15 μ M ; 0,3 μ M ; 0,6 μ M et 1,2 μ M) ou de 6His-PABPC1(1-190) (concentrations de 0,175 μ M ; 0,35 μ M ; 0,7 μ M ; 1,4 μ M et 2,8 μ M). Puis les produits réactionnels ont été fractionnés sur gel d'acrylamide natif 6%, les gels obtenus sont présentés en Figure R6. On observe un retard croissant de la migration du substrat polyadénosines parallèlement à l'augmentation des quantités de 6His-PABPC1(FL) ou 6His-PABPC1(1-190) présentes dans chaque réaction (comparer les puits 1, 2, 3, 4, 5 et 6 de la Figure R6a), puis de la Figure R6b) respectivement). On constate qu'en présence de 0,6 μ M de 6His-PABPC1(FL) ou de 0,35 μ M de 6His-PABPC1(1-190), le substrat est presque totalement recouvert par PABPC1 (Figure R6a) puits 5 et Figure R6b) puits 3 respectivement), et qu'il est totalement recouvert en présence de 1,2 μ M de 6His-PABPC1(FL) ou 0,7 μ M de 6His-PABPC1(1-190) (Figure R6a) puits 6 et Figure R6b) puits 4 respectivement). Au vu des résultats de ces expériences, une quantité de 0,7 μ M de 6His-PABPC1(FL) ou de 6His-PABPC1(1-190) pour 100 nM de substrat a été choisie

pour effectuer les réactions de désadénylation. Un excès de 6His-PABPC1(1-190) de 7 fois en concentration par rapport au substrat n'est pas surprenant, étant donné qu'il a été montré par étude structurale que les deux premiers domaines RRM sont les domaines de PABPC1 qui lui procurent la plus grande affinité pour une extension polyadénylée, et que ces deux domaines peuvent recouvrir 12 résidus adénosines (Deo et al., 1999) soit environ un septième de la taille du substrat polyadénosines utilisé dans les essais de dégradation *in vitro*.

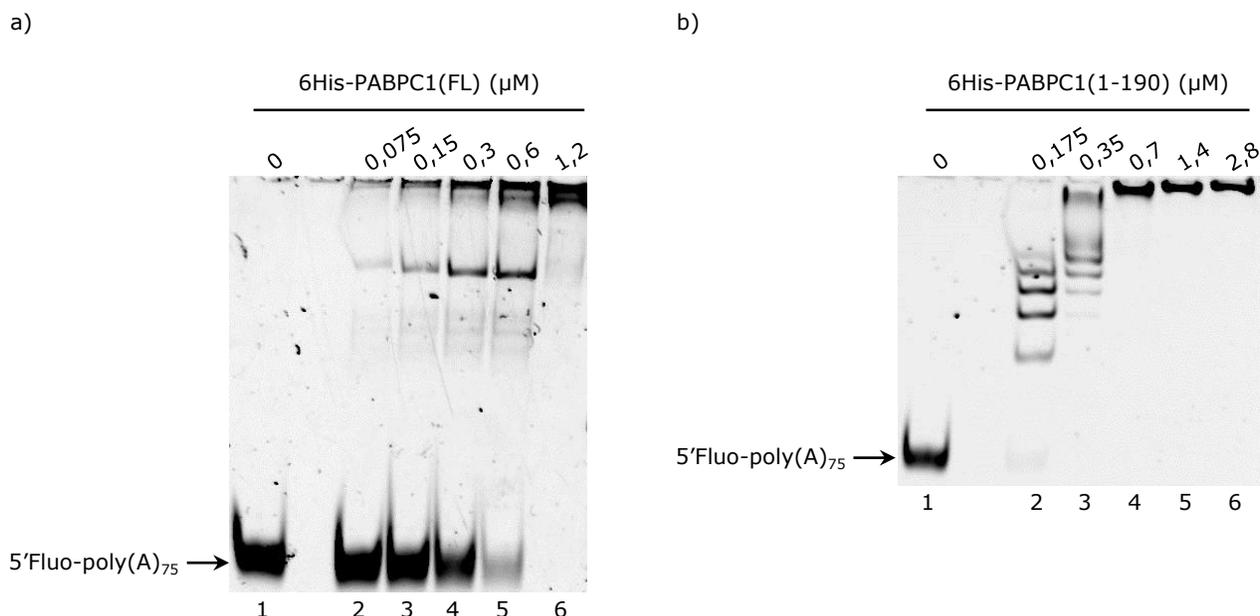


Figure R6 : Détermination de la quantité optimale de 6His-PABPC1(FL) et de 6His-PABPC1(1-190) pour le recouvrement total d'un substrat d'environ 75 adénosines.

(a) Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été incubé à 30°C avec des concentrations croissantes de 6His-PABPC1(FL) comme indiqué dans du tampon IIC pendant 20 min à 30°C. Les réactions ont ensuite été chargées sur gel d'acrylamide natif 6% puis migrées à 3W à 4°C pendant 2h avant révélation avec un appareil *ImageQuant™ LAS4000*. (b) Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été incubé à 30°C avec des concentrations croissantes de 6His-PABPC1(1-190) comme indiqué dans du tampon IIC pendant 10 min à 30°C. Les réactions ont ensuite été chargées sur gel d'acrylamide natif 6% puis migrées à 3W à 4°C pendant 2h avant révélation avec un appareil *ImageQuant™ LAS4000*.

2.2.2 Essais de désadénylation *in vitro* :

2.2.2.1 BTG2 augmente-t-elle l'activité désadénylase de CNOT7 en présence de PABPC1 ?

Afin de savoir si BTG2 impacte l'activité désadénylase de CNOT7 en présence de PABPC1 *in vitro*, 100 nM du substrat polyadénosines marqué en 5' à la fluorescéine et d'une taille d'environ 75 nucléotides a soit été mis en présence de 0,7 µM de 6His-PABPC1(FL), de 1,8 µM de BTG2(APRO) ou de 1,8 µM de 6His-CNOT7 soit d'un mélange de ces trois protéines dans les

mêmes concentrations. Les réactions ont été incubées pendant 40 min, et une fraction de chaque mélange réactionnel a été récupérée à différents temps : 0, 5, 10, 20 et 40 min. Les échantillons ont ensuite été migrés sur un gel d'acrylamide dénaturant, le gel correspondant est présenté en Figure R7. Lorsque le substrat est incubé uniquement avec 6His-CNOT7, on constate une dégradation progressive du substrat pendant les 40 min de la réaction jusqu'à aboutir à un produit de quelques nucléotides (puits 1 à 5). Après quantification, la vitesse de dégradation du substrat calculée dans ces conditions est de 1,8 nucléotides (nts)/min. En présence de 6His-PABPC1(FL) et de 6His-CNOT7, on constate un changement dans le profil de dégradation du transcrit, mais pas de changement majeur dans la cinétique globale de dégradation, avec une vitesse de dégradation calculée de 1,5 nts/min (puits 7 à 11).

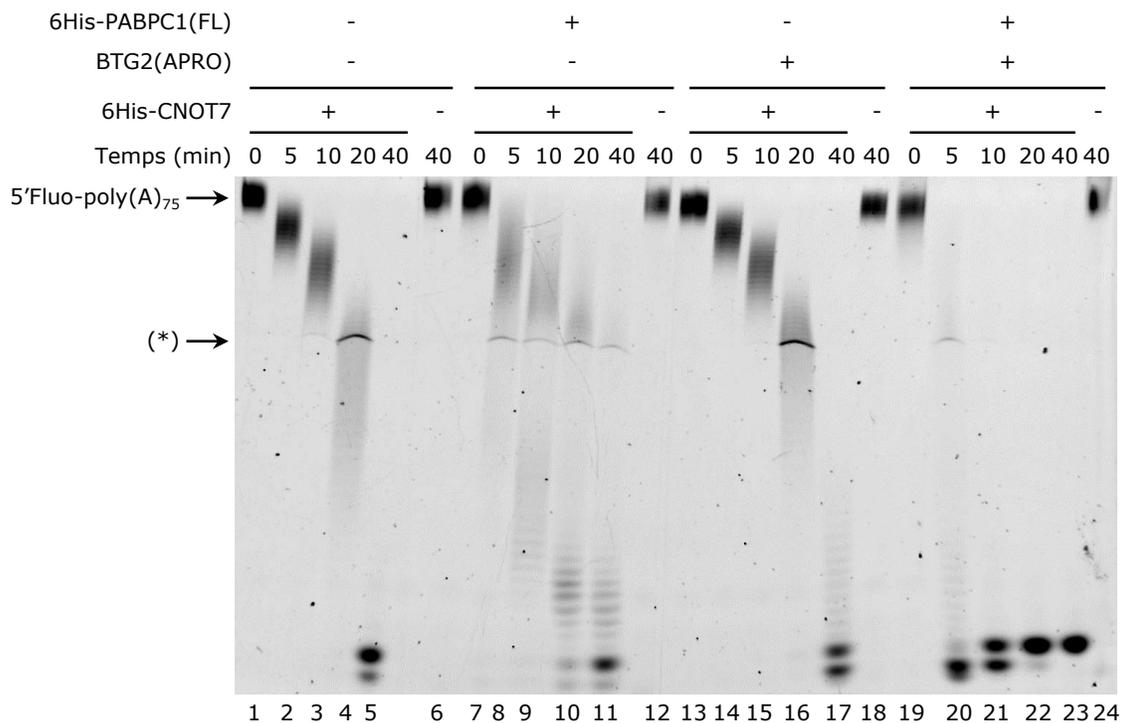


Figure R7 : BTG2(APRO) et PABPC1(FL) stimulent l'activité désadénylase de CNOT7 *in vitro*. Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été mis ou non en présence de 0,7 μ M 6His-PABPC1(FL), 1,8 μ M BTG2(APRO), et (ou non) de 1,8 μ M de 6His-CNOT7 dans du tampon IIC à 30°C pendant les temps indiqués. Les réactions ont ensuite été migrées sur gel d'acrylamide dénaturant 8% avant d'être observées avec un appareil *ImageQuant™ LAS4000*. L'astérisque (*) indique un défaut de migration dû à la présence d'HEPES dans le tampon de réaction IIC. Ce qui semble être une augmentation de taille du produit final de réaction de désadénylation aux temps les plus longs est un artefact résultant d'un impact accru du fluorophore hydrophobe situé en 5' des substrats sur la migration de fragments de petite taille. Les vitesses de dégradation, exprimées en nucléotides/min, sont de 1,8 avec 6His-CNOT7 seule, 1,5 avec 6His-PABPC1(FL)+6His-CNOT7, 1,9 avec BTG2(APRO)+6His-CNOT7, et de 14,1 en réunissant les trois protéines.

Lorsque le substrat est incubé avec BTG2(APRO) et 6His-CNOT7, on retrouve un profil de dégradation identique à celui obtenu avec CNOT7 seule, ainsi qu'une cinétique de dégradation calculée quasi-identique de 1,9 nts/min (puits 13 à 17). De manière très intéressante, une accélération extrêmement marquée de la dégradation du substrat est observée lorsqu'il est incubé simultanément avec BTG2(APRO), 6His-PABPC1(FL) et 6His-CNOT7 (puits 19 à 23), avec une cinétique de dégradation calculée de 14,1 nts/min soit plus de 7 fois supérieure en comparaison des autres conditions testées. L'absence de dégradation lorsque BTG2(APRO) et/ou 6His-PABPC1(FL) sont incubées seules avec le substrat signifie que la dégradation observée n'est pas due à une contamination des protéines purifiées par une/des RNase(s) (puits 12, 18 et 24). Ainsi, on peut conclure avec cette expérience que l'ajout de PABPC1(FL) et de BTG2(APRO) permet d'augmenter très fortement l'activité désadénylase de 6His-CNOT7 *in vitro*.

Une protéine PABPC1 tronquée ne présentant que les deux premiers domaines RRM, RRM1 et RRM2, est-elle également capable d'augmenter l'activité désadénylase de 6His-CNOT7 en présence de BTG2(APRO) ? Pour répondre à cette question, l'expérience précédente a été répétée avec les protéines de fusion 6His-PABPC1(1-190) et 6His-PABPC1(FL) ainsi que BTG2(APRO) et 6His-CNOT7. Le substrat polyadénosines à une concentration de 100 nM a été incubé avec soit 0,7 μ M de 6His-PABPC1(1-190) ou de 6His-PABPC1(FL), 1,8 μ M de BTG2(APRO) ou de 6His-CNOT7, ou une combinaison de ces protéines. Les réactions ont été incubées pendant 20 min, et une fraction de chaque mélange réactionnel a été récupérée à différents temps : 0, 5, 10 et 20 min. Les produits de dégradation issus de la réaction ont ensuite été migrés sur gel d'acrylamide dénaturant 8%, le gel obtenu est présenté en Figure R8.

L'incubation du substrat avec BTG2(APRO) ou 6His-PABPC1(FL) et avec 6His-CNOT7 résulte, comme attendu, en une dégradation progressive du substrat avec les mêmes profils de dégradation obtenus dans l'expérience précédente pendant les 20 min de la réaction, avec des cinétiques respectives de 2,1 nts/min et de 2,8 nts/min similaires à celles obtenues précédemment dans les mêmes conditions (puits 1 à 4 et 16 à 19 respectivement). Lorsque le substrat est incubé avec 6His-PABPC1(1-190) et 6His-CNOT7, on retrouve un profil de dégradation identique à celui obtenu avec BTG2(APRO) et 6His-CNOT7, ainsi qu'une cinétique de dégradation calculée extrêmement similaire de 2,0 nts/min (puits 21 à 24). Par ailleurs, on retrouve une forte stimulation de la dégradation du substrat après incubation simultanée avec BTG2(APRO), 6His-PABPC1(FL) et

6His-CNOT7, avec une cinétique de dégradation calculée de 13,7 nts/min, comparable à ce qui a été obtenu précédemment (puits 6 à 9).

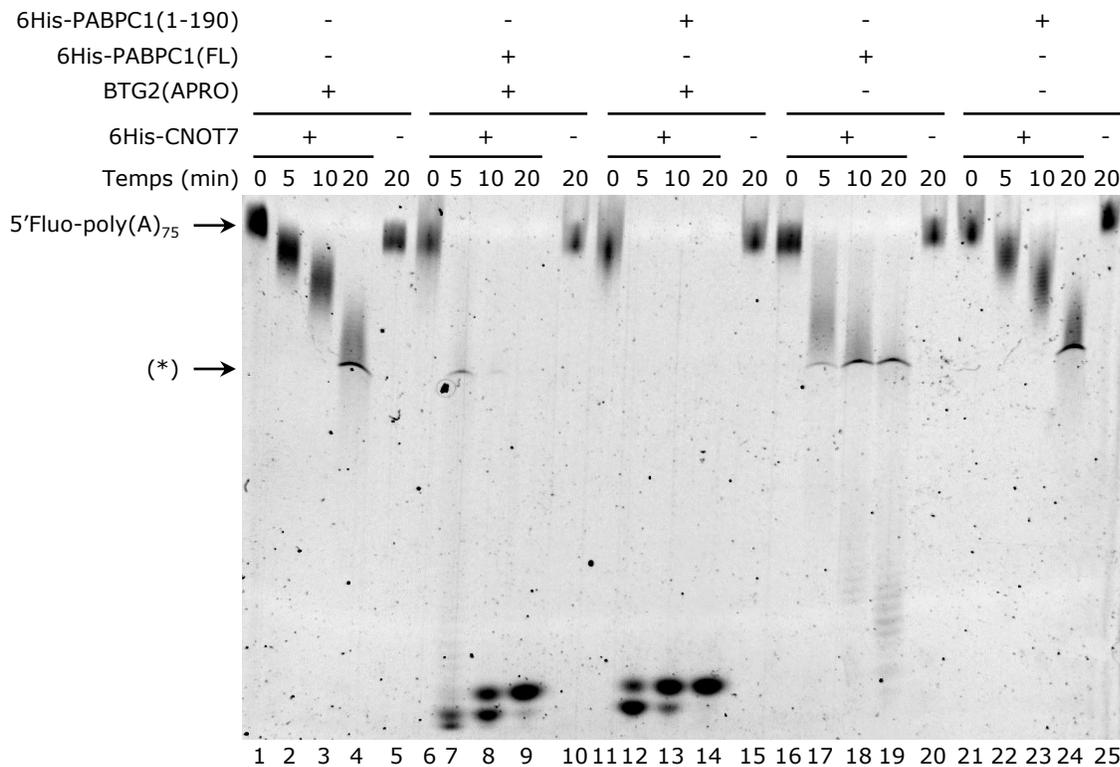


Figure R8 : Les deux premiers domaines RRM de PABPC1 sont suffisants pour stimuler l'activité désadénylase de CNOT7 en présence de BTG2(APRO) *in vitro*.

Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été mis ou non en présence de 0,7 μ M 6His-PABPC1(1-190), 1,8 μ M BTG2(APRO), et (ou non) de 1,8 μ M de 6His-CNOT7 dans du tampon IIC à 30°C pendant les temps indiqués. Les ARN présents dans les réactions ont ensuite été fractionnés sur gel d'acrylamide dénaturant 8% avant d'être observés avec un appareil *ImageQuant™ LAS4000*. L'astérisque (*) indique un défaut de migration dû à la présence d'HEPES dans le tampon de réaction IIC. Des altérations de migration variables selon les expériences sont parfois observées à des temps d'incubation courts, particulièrement en présence de 6His-PABPC1(1-190). Ce phénomène est lié à la présence de PABPC1 et est dû à une dénaturation ou une dissociation incomplète de PABPC1 du substrat. Les vitesses de dégradation, exprimées en nucléotides/min, sont de 2,1 avec BTG2(APRO), 13,7 avec BTG2(APRO)+6His-PABPC1(FL), 14,3 avec BTG2(APRO)+6His-PABPC1(1-190), de 2,8 avec 6His-PABPC1(FL) et 2,0 avec 6His-PABPC1(1-190).

De manière très intéressante, quand le substrat est incubé avec BTG2(APRO), 6His-PABPC1(1-190) et 6His-CNOT7, on retrouve l'augmentation de l'activité désadénylase de 6His-CNOT7 observée avec 6His-PABPC1(FL) dans les mêmes conditions, avec une cinétique de dégradation calculée de 14,3 nts/min (puits 11 à 14). Enfin, l'absence de dégradation lorsque BTG2(APRO) et/ou 6His-PABPC1(FL) et/ou 6His-PABPC1(1-190) sont incubées avec le substrat signifie que la dégradation observée n'est pas due à une contamination par RNase des protéines purifiées (puits

5, 10, 15, 20 et 25). Avec cette expérience, on peut conclure que 6His-PABPC1(1-190) est suffisante pour augmenter l'activité désadénylase de 6His-CNOT7 en présence de BTG2(APRO). Cette expérience signifie également que l'association coopérative de PABPC1, permise par le domaine MLLE ainsi que la région intrinsèquement désorganisée le reliant au domaine RRM4, n'est pas requise pour l'augmentation de l'activité désadénylase de 6His-CNOT7 par PABPC1 et BTG2(APRO). Toutefois, l'absence d'inhibition de la désadénylation par PABPC1 dans les expériences précédentes va à l'encontre de résultats obtenus chez *Saccharomyces cerevisiae* montrant que PAB1 a un rôle inhibiteur sur la désadénylation catalysée par un complexe de levure CCR4-CAF1 purifié (Simon and Seraphin, 2007).

2.2.2.2 La protéine PABPC1 humaine a-t-elle un rôle inhibiteur envers 6His-CNOT7 *in vitro* ?

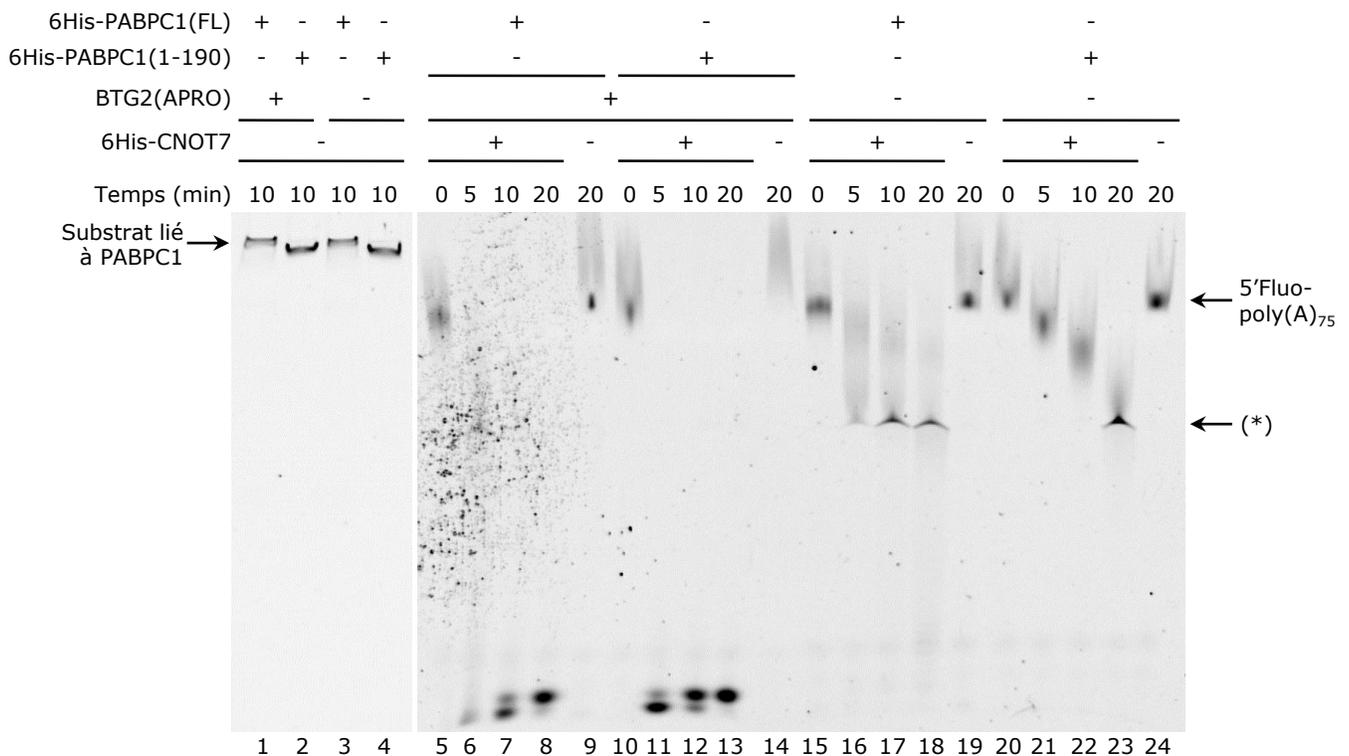


Figure R9 : L'association de PABPC1 au substrat n'inhibe pas l'activité désadénylase de CNOT7 *in vitro*.
 Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été mis ou non en présence de 0,7 μ M 6His-PABPC1(FL), 0,7 μ M 6His-PABPC1(1-190), 1,8 μ M BTG2(APRO), et (ou non) de 1,8 μ M de 6His-CNOT7 dans du tampon IIC à 30°C pendant 10 min. Une fraction des réactions a ensuite été analysée sur gel d'acrylamide natif 6% pendant 2h à 3W et à 4°C (puits 1 à 4). Les fractions restantes de chaque réaction ont été incubées à 30°C pendant les temps indiqués, puis migrées sur gel d'acrylamide dénaturant 8% avant d'être observées avec un appareil *ImageQuant™ LAS4000* (puits 5 à 24). L'astérisque (*) indique un défaut de migration dû à la présence d'HEPES dans le tampon de réaction IIC.

Afin de répondre à cette question, il est nécessaire de confirmer que dans les conditions réactionnelles des expériences de désadénylation précédentes 6His-PABPC1(FL) et 6His-PABPC1(1-190) recouvrent effectivement le substrat polyadénosines. Afin de vérifier cela, le substrat polyadénosines a été pré-incubé pendant 10 min à 30°C avec 0,7 μ M de 6His-PABPC1(FL) ou 0,7 μ M de 6His-PABPC1(1-190) en présence ou non de 1,8 μ M de BTG2(APRO). Une partie de ces échantillons a ensuite été analysée sur gel d'acrylamide natif 6%, et l'autre partie a été incubée ou non avec 1,8 μ M de 6His-CNOT7 pendant 20 min. Une fraction de chaque mélange réactionnel a été récupérée après 0 ; 5 ; 10 et 20 min, puis les divers produits de dégradation ont été migrés sur gel d'acrylamide dénaturant. Les deux gels correspondant à cette expérience sont présentés côte à côte en Figure R9. Comme on peut le constater, le substrat polyadénosines est totalement recouvert par 6His-PABPC1(FL) ou 6His-PABPC1(1-190) après pré-incubation, indépendamment de la présence de BTG2(APRO) (puits 1 à 4). On constate, comme dans les expériences précédentes, une forte augmentation de l'activité désadénylase de 6His-CNOT7 en présence de BTG2(APRO) et de 6His-PABPC1(FL) ou de 6His-PABPC1(1-190) (puits 5 à 8 et 10 à 13 respectivement). De plus, les profils de dégradation observés lorsque le substrat est incubé uniquement avec 6His-CNOT7 et 6His-PABPC1(FL) ou 6His-PABPC1(1-190) sont identiques à ceux observés dans les expériences précédentes dans les mêmes conditions (puits 15 à 18 et 20 à 23 respectivement). Cela signifie que, dans nos conditions expérimentales, la fixation de 6His-PABPC1 au substrat n'inhibe pas sa désadénylation par 6His-CNOT7.

2.2.2.3 La liaison de PABPC1(1-190) protège-t-elle le substrat d'autres activités RNAses hormis CNOT7 ?

Je voulais ensuite observer si PABPC1(1-190) permettait de protéger un substrat polyadénosines de l'activité d'autres RNAses que CNOT7. Pour cela, j'ai incubé pendant 10 min à 30°C un substrat polyadénosines de 75 adénosines avec soit 1,8 μ M d'un mutant 6His-CNOT7 dont l'activité enzymatique est abolie comme contrôle, soit avec 0,7 μ M de 6His-PABPC1(1-190) afin de permettre le recouvrement total du substrat par PABPC1(1-190). Après cette incubation, les échantillons ont été incubés ou non pendant 20 min à 30°C avec 0,0075 U/ μ l de RNase If, une RNase disponible commercialement qui possède une activité endonucléolytique qui agira à chaque liaison phosphodiester. Aux temps 0 ; 5 ; 10 ; et 20 min d'incubation, une fraction de chaque réaction a été prélevée. Les produits de dégradation obtenus ont été ensuite fractionnés sur un gel d'acrylamide dénaturant 8%, présenté en Figure R10. On constate que le mutant inactif de CNOT7

ne permet effectivement pas la dégradation du substrat durant les 20 min de réaction (puits 9 à 11). Par ailleurs, on constate que la réaction de dégradation du substrat est déjà achevée au bout de 5 min en présence de la RNase If et du mutant CNOT7 (puits 2 à 4). Enfin, on remarque que le substrat est dégradé partiellement en présence de la RNase If et de 6His-PABPC1(1-190), et qu'il présente un profil de dégradation identique durant toute la durée de l'expérience (puits 6 à 8).

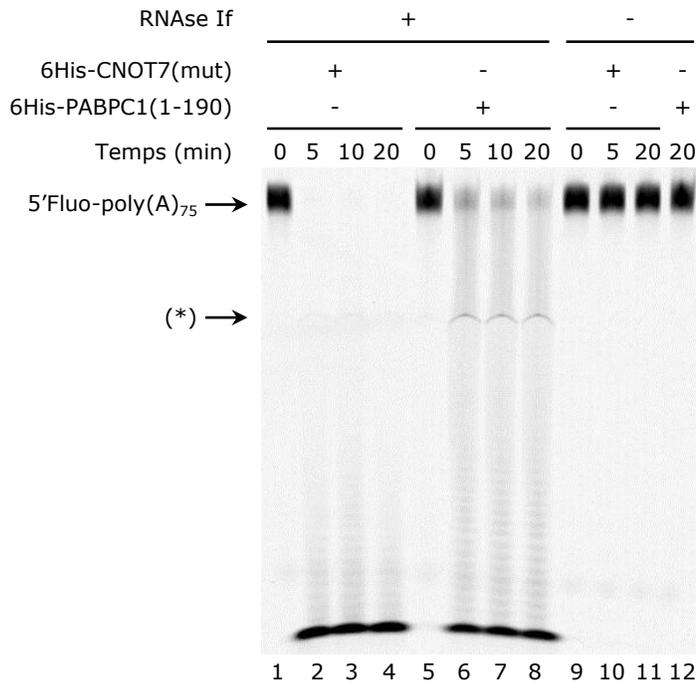


Figure R10 : PABPC1(1-190) confère une protection partielle à un substrat polyadénosines contre une activité RNase autre que celle de CNOT7 *in vitro*.

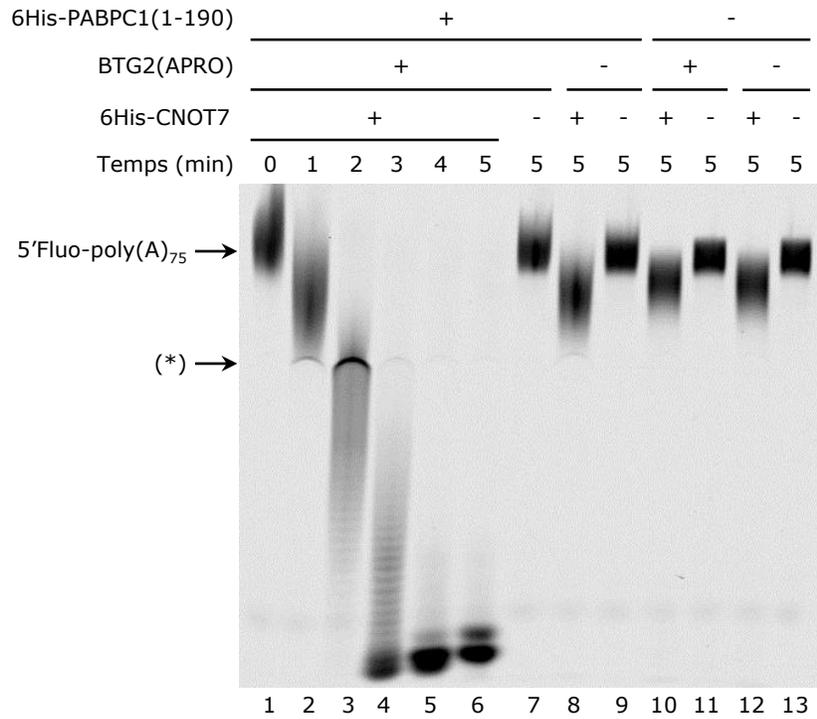
Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a d'abord été mis en présence soit de 0,7 µM 6His-PABPC1(1-190) dans du tampon IIC et incubé pendant 10 min à 30°C, soit de 1,8 µM de 6His-CNOT7(mut) inactive dans du tampon IIC et incubé pendant 10 min sur glace. Puis les échantillons ont été complétés ou non avec 0,0075 U/µL RNase If puis incubés à 30°C pendant les durées indiquées. Les réactions ont ensuite été analysées sur gel d'acrylamide dénaturant 8% avant d'être observées avec un appareil *Typhoon 8600*. L'astérisque (*) indique un défaut de migration dû à la présence d'HEPES dans le tampon de réaction IIC.

Ainsi on peut dire que PABPC1(1-190) confère une protection partielle contre la dégradation d'un substrat polyadénosines par des RNases autres que CNOT7 *in vitro*.

2.2.2.4 BTG2 change-t-elle l'activité enzymatique de 6His-CNOT7 ?

Il était alors intéressant d'étudier l'impact de BTG2(APRO) sur l'activité enzymatique de 6His-CNOT7, et notamment sur sa capacité à dégrader de manière progressive le substrat polyadénosines utilisé. Pour répondre à cette question, deux nouvelles expériences de désadénylation ont été menées. Tout d'abord, les temps de prélèvements lors des expériences de désadénylation

a)



b)

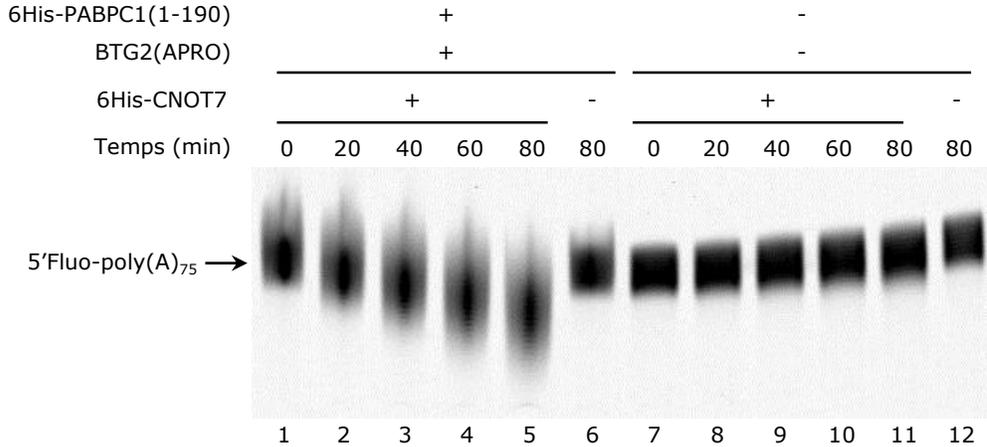


Figure R11 : La désadénylation par CNOT7 est également progressive en présence de BTG2(APRO) et des deux premiers domaines RRM de PABPC1.

(a) Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été incubé à 30°C avec 1,8 µM BTG2(APRO), 0,7 µM 6His-PABPC1(1-190), et (ou non) avec 1,8 µM 6His-CNOT7 dans du tampon IIC à 30°C pendant les temps indiqués. Les réactions ont ensuite été analysées sur gel d'acrylamide dénaturant 8% avant d'être observées avec un appareil *Typhoon 8600*. L'astérisque (*) indique un défaut de migration dû à la présence d'HEPES dans le tampon de réaction IIC. (b) Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été incubé puis analysé comme dans (a) mais avec des concentrations réduites de BTG2(APRO) (50 nM) et de 6His-CNOT7 (50 nM) durant les temps indiqués. L'altération de migration du substrat observée en présence de 6His-PABPC1(1-190) est due à une dénaturation ou une dissociation incomplète de PABPC1 du substrat et varie selon les expériences et les lots de réactifs.

précédentes étaient trop espacés pour observer la dégradation progressive du substrat dans le cas où ce dernier est incubé en présence de BTG2(APRO), 6His-PABPC1(FL) ou 6His-PABPC1(1-190) et 6His-CNOT7. Ainsi, afin d'observer l'activité désadénylase de CNOT7 dans ces conditions, une fraction d'un mélange réactionnel contenant 6His-CNOT7, 6His-PABPC1(1-190) et BTG2(APRO) a été prélevée toutes les minutes durant une réaction d'une durée totale de 5 min. En parallèle, 100 nM de substrat polyadénosines ont été incubés pendant 5 min avec 0,7 μ M de 6His-PABPC1(1-190) ou 1,8 μ M de BTG2(APRO) en présence de 1,8 μ M de 6His-CNOT7 ou juste en présence de 1,8 μ M de 6His-CNOT7. Les produits de réaction ont ensuite été fractionnés sur gel de polyacrylamide dénaturant 8%. Le gel correspondant est présenté en Figure R11a). On constate une faible dégradation du substrat au bout de 5 min en présence de 6His-CNOT7 et 6His-PABPC1(1-190) ou BTG2(APRO), ou de 6His-CNOT7 seule (respectivement puits 8, 10 et 12). Par contre, la dégradation du substrat est achevée au bout de 5 min en présence de 6His-PABPC1(1-190), BTG2(APRO) et 6His-CNOT7, avec un profil de dégradation du substrat, correspondant à une dégradation progressive comme observé précédemment. La vitesse de dégradation calculée est de 18,9 nucléotides par minute dans ces conditions. Étant donné que dans les expériences précédentes les protéines 6His-CNOT7 et BTG2(APRO) sont rajoutées en concentrations 18 fois plus élevées que celle du substrat, j'ai choisi d'ajouter ces protéines en concentrations deux fois plus faibles par rapport au substrat afin d'observer si le caractère distributif de la catalyse par 6His-CNOT7 était affecté en présence de BTG2(APRO) et de 6His-PABPC1(1-190). Pour ce faire, j'ai mis 100 nM d'un substrat polyadénosines de 75 adénosines en présence, soit de 0,05 μ M de 6His-CNOT7 seule, soit d'une combinaison de 0,05 μ M 6His-CNOT7 avec 0,05 μ M de BTG2(APRO) et 0,7 μ M 6His-PABPC1(1-190), et ce pendant 80 min à 30°C. Aux temps de réaction 0 ; 20 ; 40 ; 60 et 80 min, une fraction de chaque réaction a été prélevée. Les produits de dégradation ont été fractionnés sur un gel d'acrylamide dénaturant 8%, présenté en Figure R11b). En présence de 6His-CNOT7 seule, on ne constate aucune dégradation du substrat durant toute la durée de réaction (puits 7 à 11). Cependant, en présence de 6His-PABPC1(1-190) et de BTG2(APRO), on constate une dégradation lente mais progressive qui se manifeste par une migration totale du signal correspondant au substrat, synonyme d'une dégradation distributive du substrat dans ces conditions (comparer puits 2, 3, 4 et 5). Ces deux expériences montrent donc que la stimulation de l'activité désadénylase de 6His-CNOT7 par BTG2(APRO) en présence de 6His-PABPC1(1-190) ne passe pas par un changement de l'activité catalytique de 6His-CNOT7 de distributive à processive.

2.2.2.5 Identification de la taille du produit final de dégradation :

Afin de déterminer la taille en nucléotides du produit final de dégradation obtenu dans tous les essais de désadénylation *in vitro* présentés jusqu'à maintenant, j'ai voulu obtenir une échelle de dégradation, nucléotide par nucléotide, en dégradant un ARN de 17 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine, nommé F94, avec la nucléase P1. Pour ce faire, j'ai mis 100 nM F94 pendant 5 min en présence d'une gamme de concentration de nucléase P1 : 0,124 μ M ; 1,24 μ M ; 12,4 μ M et 124 μ M. Parallèlement, un substrat d'une taille de 20 adénosines marqué en 5', nommé FA20, a été mis en présence ou non de 1,8 μ M de 6His-CNOT7 pendant 15 min. Aux temps de réaction 0 ; 2 ; 5 ; et 15 min une fraction du mélange réactionnel contenant 6His-CNOT7 a été prélevée. Les produits de dégradation des deux réactions ont ensuite été fractionnés sur un gel acrylamide dénaturant 15%, présenté en Figure R12.

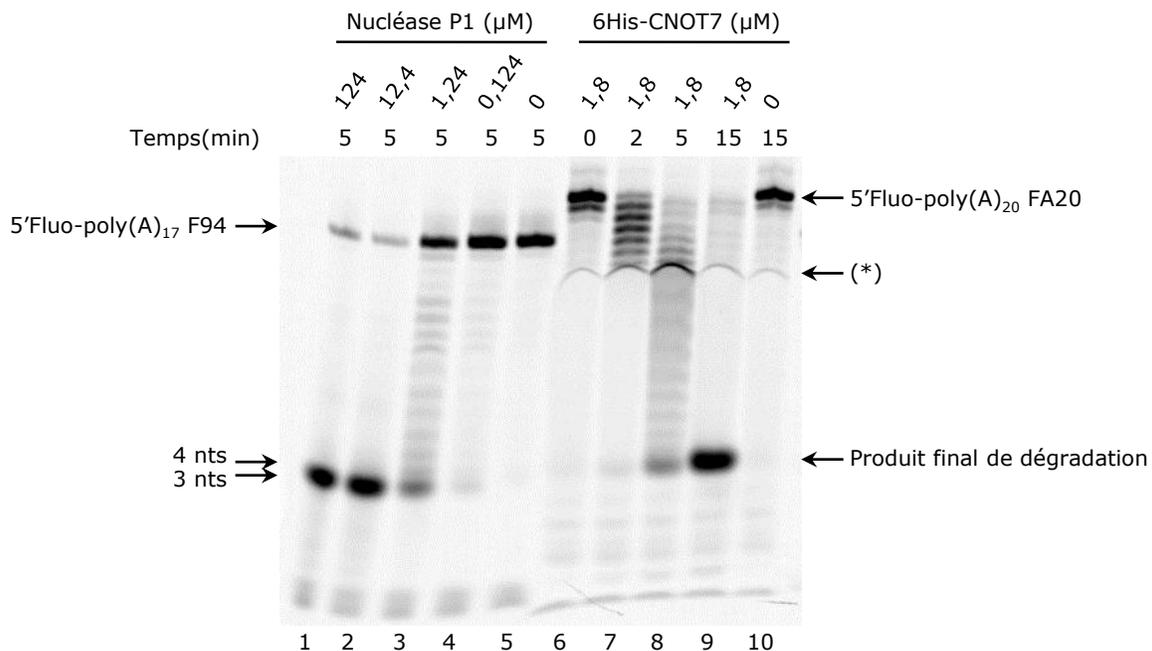


Figure R12 : Le produit final de la réaction de désadénylation catalysée par CNOT7 présente une taille inférieure à 4 nucléotides.

Un ARN synthétique de 17 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été incubé à 50°C pendant 5 min en présence de concentrations décroissantes de Nucléase P1 comme indiqué. En parallèle, un ARN synthétique de 20 adénosines (100 nM) a été incubé avec 1,8 μ M 6His-CNOT7 dans du tampon IIC pendant les durées indiquées. Les réactions ont ensuite été analysées sur gel d'acrylamide dénaturant 15% avant d'être observées avec un appareil *Typhoon 8600*. L'astérisque (*) indique un défaut de migration dû à la présence d'HEPES dans le tampon de réaction IIC. À noter que sur un gel polyacrylamide dénaturant 15% les produits finaux de réactions migrent au niveau d'une même bande visible alors que deux bandes apparaissent au fil du temps sur un gel polyacrylamide dénaturant 8%. Cela est dû à la nature hydrophobe du marqueur fluorescéine en N-terminal qui affecte la migration d'oligonucléotides d'une longueur inférieure à 4 résidus.

On constate une dégradation progressive du substrat polyadénosines de 20 adénosines durant les 15 min de réaction, pour aboutir au produit final de dégradation au bout de 15 min (puits 6 à 9). De plus, une échelle de dégradation nucléotide par nucléotide du 17-mer est obtenue pour une concentration de nucléase P1 de 1,24 μM (puits 3). En comparant cette échelle de dégradation à la taille du produit final de dégradation obtenu après incubation d'un substrat de 20 adénosines avec 6His-CNOT7 pendant 15 min, on constate que le produit final de dégradation a une taille inférieure à 4 nucléotides (comparer le puits 3 au puits 9).

2.2.2.6 Augmentation de l'activité désadénylase de CAF1 : Propriété conservée du domaine APRO ?

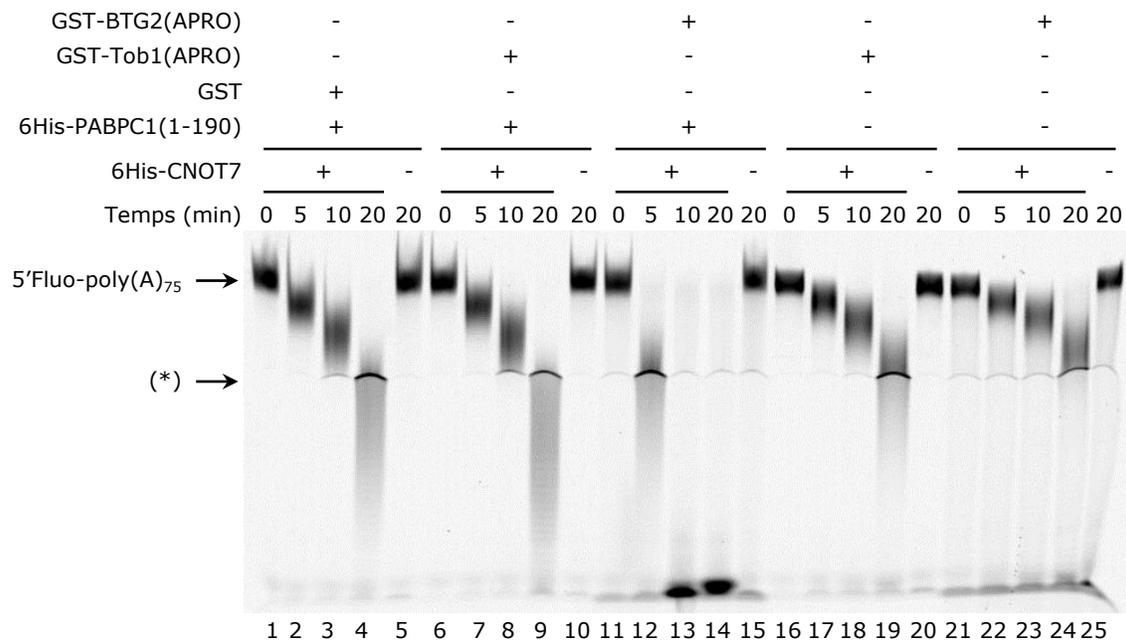


Figure R13 : L'augmentation de l'activité désadénylase de CNOT7 *in vitro* en présence de PABPC1 n'est pas une propriété conservée du domaine APRO.

Visualisation de la capacité de Tob1(APRO) à stimuler l'activité désadénylase de CNOT7 par expérience de désadénylation *in vitro*. Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été mis ou non en présence de 0,7 μM 6His-PABPC1(1-190), 1,8 μM GST-Tob1(APRO), 1,8 μM BTG2(APRO), 1,8 μM GST, et (ou non) de 1,8 μM 6His-CNOT7 dans du tampon IIC pendant 20 min à 30°C. Les réactions ont ensuite été analysées sur gel d'acrylamide dénaturant 8% avant d'être observées avec un appareil *Typhoon 8600*. L'astérisque (*) indique un défaut de migration dû à la présence d'HEPES dans le tampon de réaction IIC. Les vitesses de dégradation, exprimées en nts/min, sont de 2,3 avec GST+6His-PABPC1(1-190), 2,7 avec GST-Tob1(APRO)+6His-PABPC1(1-190), 7,2 avec GST-BTG2(APRO)+6His-PABPC1(1-190), 2,1 avec GST-Tob1(APRO) et 1,7 avec GST-BTG2(APRO). La stimulation observée dans le cas de GST-BTG2(APRO)+6His-PABPC1(1-190) est plus faible que dans les expériences précédentes en raison d'une purification manuelle et non par HPLC des protéines de fusion GST, ce qui augmente la présence de contaminants.

Je me suis ensuite demandé si la capacité qu'a le domaine APRO de BTG2 d'augmenter l'activité désadénylase de CNOT7 était une propriété conservée de la famille BTG/Tob. Pour répondre à cette question, j'ai réalisé une expérience de désadénylation *in vitro* en utilisant diverses protéines de fusion GST ainsi que la protéine GST seule. Le substrat de 75 adénosines a été mis en présence de combinaisons des protéines 6His-PABPC1(1-190), GST-Tob1(APRO), GST-BTG2(APRO), GST et 6His-(CNOT7). Les différentes réactions ont ensuite été incubées pendant 20 min à 30°C, et une fraction de chaque réaction a été prélevée aux temps 0 ; 5 ; 10 et 20 min. Les différents produits de dégradation ont ensuite été migrés sur gel d'acrylamide dénaturant 8%, présenté en Figure R13. On constate une dégradation progressive du substrat durant les 20 min de la réaction, en présence de 6His-CNOT7 et GST-Tob1(APRO) (puits 16 à 19) ou GST-BTG2(APRO) (puits 21 à 24) avec un profil de dégradation identique et des vitesses de désadénylation respectives de 2,1 nts/min et 1,7 nts/min. En présence de 6His-CNOT7, 6His-PABPC1(1-190) et GST (puits 1 à 4), la vitesse de dégradation est similaire (2,3 nts/min), alors que, comme attendu, on constate une augmentation de l'activité désadénylase de 6His-CNOT7 en présence de 6His-PABPC1(1-190) et GST-BTG2(APRO) avec une vitesse de désadénylation calculée de 7,2 nts/min (puits 11 à 14). Cependant, on ne constate pas d'augmentation de l'activité désadénylase de 6His-CNOT7 en présence de GST-Tob1(APRO) et de 6His-PABPC1(1-190) avec une vitesse de dégradation calculée de 2,7 nts/min, donc comparable au cas où GST-Tob1(APRO) et 6His-CNOT7 sont seules avec le substrat (comparer les puits 6 à 9 avec les puits 16 à 19). À noter que la stimulation plus faible de l'activité désadénylase de CNOT7 par GST-BTG2(APRO) et 6His-PABPC1(1-190) en comparaison des expériences précédentes est due au fait que les protéines de fusion GST n'ont pas été purifiées par HPLC, ce qui engendre une plus forte présence de protéines contaminantes entraînant un biais dans la quantification des protéines d'intérêt. Ainsi, on peut conclure avec cette expérience que l'augmentation de l'activité désadénylase de CNOT7 par le domaine APRO n'est pas une capacité conservée de la famille BTG/TOB.

2.2.2.7 La liaison de RRM1+2 au substrat est-elle indispensable à l'augmentation de l'activité de CNOT7 *in vitro* ?

J'ai également voulu savoir si la liaison de PABPC1(1-190) au substrat était indispensable à l'augmentation de l'activité de CNOT7 en présence de BTG2(APRO). Pour répondre à cette question, j'ai choisi un ARN hétérogène d'une taille de 20 nucléotides, nommé FR3, de séquence CCUAUAGUGAGUCGAAAAAA marqué en 5' à la fluorescéine et qui n'est pas censé

pouvoir se lier de manière stable à une molécule de PABPC1. Afin de vérifier ce dernier point, j'ai réalisé un gel retard. Après incubation de 100 nM FR3 ou de 800 nM F94 pendant 10 min à 30°C en présence de diverses concentrations de 6His-PABPC1(1-190) (0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,41 ; 0,82 ou 1,65 µM) les échantillons ont été analysés sur un gel d'acrylamide natif 6%, présenté en Figure R14.

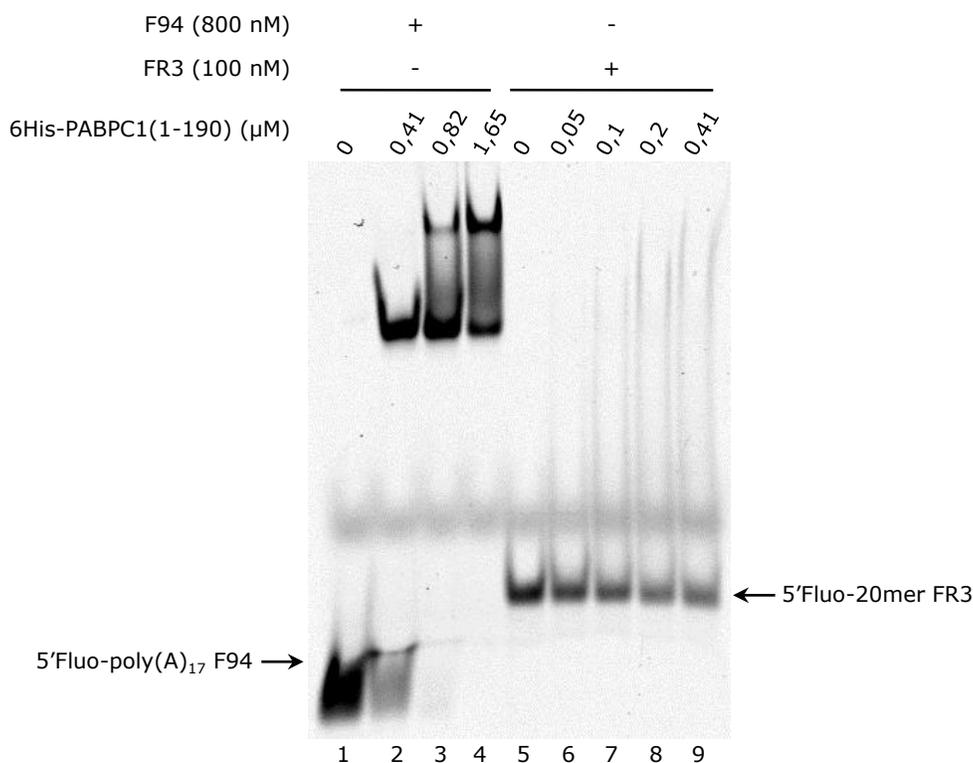


Figure R14 : Évaluation de la capacité de PABPC1(1-190) à recouvrir un ARN de composition hétérogène.

Visualisation de la capacité de 6His-PABPC1(1-190) à lier l'oligo FR3 de séquence CCUAUAGUGAGUCGAAAAA par la technique d'EMSA. L'ARN synthétique FR3 de 20 nucléotides hétérogènes marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) ou l'ARN synthétique F94 de 17 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (800 nM) ont été mis en présence de différentes quantités de 6His-PABPC1(1-190) comme indiquées dans du tampon IIC pendant 10 min à 30°C. Les réactions ont ensuite été analysées sur gel d'acrylamide natif 6% puis migrées à 3W à 4°C pendant 2h avant d'être observées avec un appareil *Typhoon 8600*. Une concentration de 800 nM de F94 a été utilisée afin d'avoir assez de matériel pour précisément observer les différentes migrations engendrées par la liaison d'une ou plusieurs molécules de PABPC1(1-190). Les concentrations de PABPC1 ajoutées ont été ajustées en fonction de la quantité de substrat, afin d'obtenir une gamme de concentrations de 0,5 ; 1 et 2 fois supérieures à F94 et de 0,5 ; 1 ; 2 et 4 fois supérieures à FR3.

On constate que le déplacement de mobilité de F94 augmente avec la concentration de 6His-PABPC1(1-190), pour atteindre un déplacement presque total de l'ARN avec une concentration de 1,65 µM de 6His-PABPC1(1-190), soit un excès de deux fois par rapport à la concentration de substrat (puits 1 à 4). On n'observe pas de formation de complexe stable de l'oligo FR3 avec

PABPC1(1-190), même en présence d'une concentration de 0,41 μM de 6His-PABPC1(1-190), ce qui représente un excès de 4 fois en concentration par rapport à celle du substrat (puits 5 à 9). Cependant, la diminution du signal correspondant au substrat libre ainsi que la présence de trainées de plus hauts poids moléculaires suggèrent des interactions instables entre PABPC1(1-190) et le substrat. L'oligo FR3 a ensuite été utilisé pour tester la nécessité de l'association stable de PABPC1 à un substrat polyadénosines dans l'augmentation de l'activité désadénylase CNOT7 engendrée par BTG2(APRO). 100 nM de l'oligo(A) FA20 ou du substrat hétérogène FR3 ont été mis en présence ou non de 0,7 μM 6His-PABPC1(1-190), de 1,8 μM BTG2(APRO) et de 0,4 μM 6His-CNOT7 pendant 20 min à 30°C. Aux temps de réaction 0 ; 2 ; 5 ; 10 et 20 min une fraction de chaque mélange réactionnel a été prélevée. Les produits de dégradation ont ensuite été migrés sur un gel d'acrylamide dénaturant 15%, présenté en Figure R15.

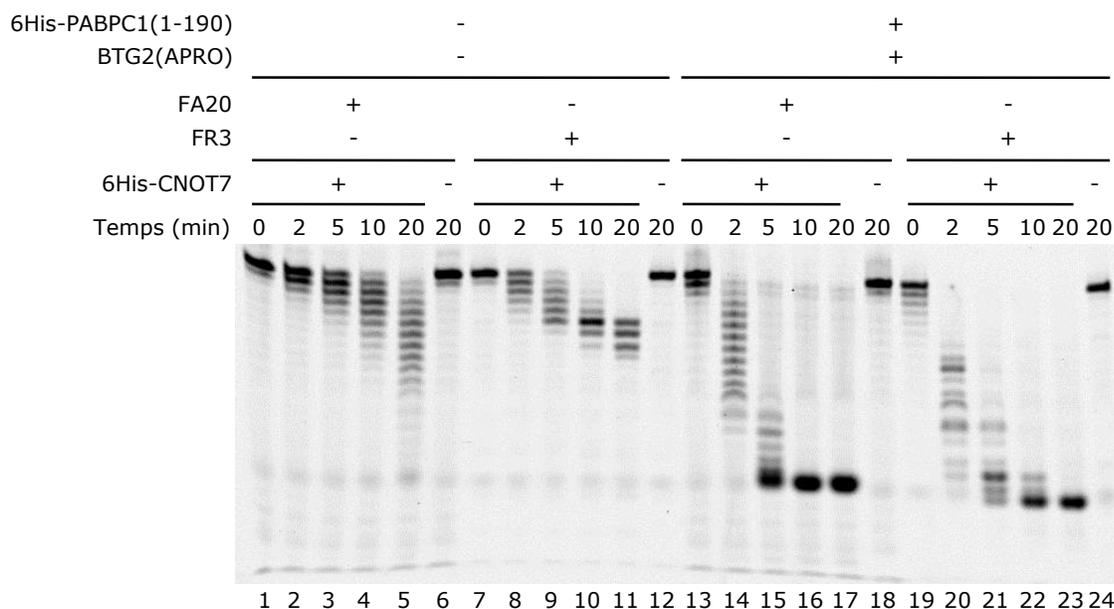


Figure R15 : La fixation stable de PABPC1(1-190) au substrat n'est pas nécessaire à l'augmentation de sa dégradation en présence de CNOT7 et BTG2(APRO) *in vitro*.

Visualisation de l'influence de la liaison de PABPC1(1-190) à un substrat sur sa dégradation par CNOT7 par expérience de désadénylation *in vitro*. Le substrat FA20 de 20 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) ou le substrat hétérogène FR3 de 20 nucléotides marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) ont été mis ou non en présence de 0,7 μM 6His-PABPC1(1-190), de 1,8 μM BTG2(APRO) et de 0,4 μM 6His-CNOT7 dans du tampon IICTris pendant 20 min à 30°C. Les réactions ont ensuite été analysées sur gel d'acrylamide dénaturant 15% avant d'être observées avec un appareil *Typhoon 8600*. Le tampon IICTris (20 mM Tris-HCl pH8, 100 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,1% NP-40, 5 mM MgAc) a été utilisé afin de s'affranchir du défaut de migration observé avec le tampon IIC contenant de l'HEPES.

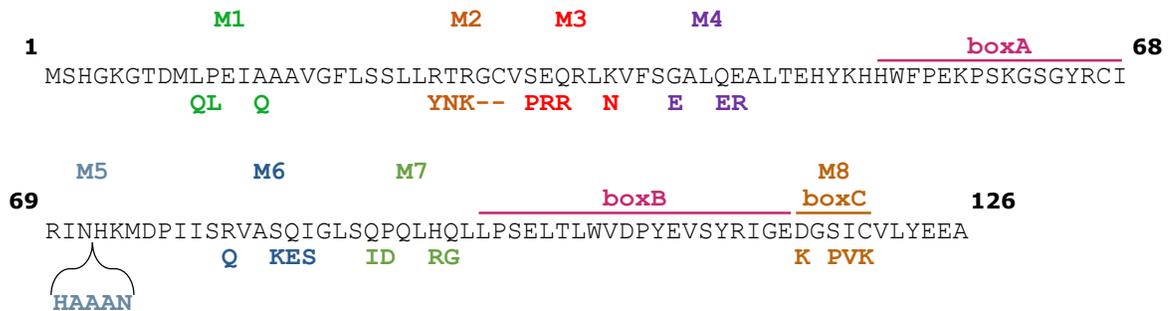
En présence uniquement de 6His-CNOT7, on constate une dégradation progressive des oligos FA20 et FR3 durant les 20 min de réaction (puits 1 à 5 et puits 7 à 11 respectivement). À noter que pour l'oligo FR3, la dégradation est ralentie après désadénylation des 6 premières adénosines, en comparaison du substrat FA20 constitué uniquement d'adénosines. Ce constat est en accord avec une préférence de CNOT7 pour les résidus adénosines (Bianchin et al., 2005). L'ajout de BTG2(APRO) et de 6His-PABPC1(1-190) entraîne une forte augmentation de la dégradation du substrat poly(A) FA20, comme attendu pour un substrat constitué uniquement d'adénosines (puits 13 à 17). De manière intéressante, on constate également une forte augmentation de la dégradation de l'oligo hétérogène FR3 après ajout de BTG2(APRO) et de PABPC1(1-190) (puits 19 à 23). Cela signifie d'une part qu'en présence de ces deux protéines CNOT7 est capable de complètement dégrader des substrats d'une composition hétérogène, et d'autre part que l'augmentation de l'activité désadénylase de CNOT7 par BTG2(APRO) est permise même dans un cas où PABPC1(1-190) ne s'associe pas de manière stable avec le substrat. Cependant, je n'ai pas pu trouver d'explication à ce phénomène durant le temps imparti de ma thèse.

2.2.3 Recherche d'un mutant d'interaction de BTG2 liant CNOT7 mais plus PABPC1 :

Je me suis également demandé si la liaison de BTG2 à PABPC1(1-190) était nécessaire afin d'augmenter l'activité de CNOT7. J'ai donc cherché un mutant d'interaction de BTG2 toujours capable de lier CNOT7 mais plus PABPC1(1-190). Dans ce but, j'ai généré des mutants de BTG2(APRO) par mutagenèse dirigée, basés sur les résidus conservés entre les domaines APRO de BTG1 et BTG2 mais pas avec le domaine APRO de Tob1, et d'autre part sur les acides aminés exposés en surface du domaine APRO à partir de la structure publiée du domaine APRO de BTG2 (Yang et al., 2008). Ces mutants ont ensuite été clonés dans le vecteur pB27, permettant l'obtention de protéines de fusion entre les différents mutants de BTG2(APRO) et le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription LexA. J'ai ensuite testé ces constructions ainsi que d'autres mutants disponibles au laboratoire, obtenus également par mutagenèse dirigée ou par insertion aléatoire de séquences, dans des essais double-hybride chez la levure par mesure d'activité β -galactosidase après co-expression de PABPC1(1-146) ou CNOT7 couplées au domaine d'activation de GAL4. Les résultats des tests d'activité β -galactosidase ainsi que les séquences en acides aminés des différents mutants sont présentés en Figure R16. On constate que les interactions des mutants M1, M2, M4 et M7 avec PABPC1(1-146) ou CNOT7 génèrent une activité β -galactosidase similaire à BTG2(APRO) sauvage, ce qui veut dire que les mutants M1, M2, M4 et

M7 s'associent sans problème à ces dernières. Le mutant M5 quant à lui présente une activité β -galactosidase similaire à BTG2(APRO) sauvage après co-expression avec PABPC1(1-146), mais une forte diminution du signal β -galactosidase après co-expression avec CNOT7, ce qui signifie que sa capacité à lier CNOT7 est affectée, mais pas sa liaison à PABPC1. Les mutants M3, M6 et M8 présentent quant à eux une diminution du signal β -galactosidase en présence de PABPC1(1-146), mais pas en présence de CNOT7 en comparaison de BTG2(APRO) sauvage, ce qui signifie

(a)



(b)

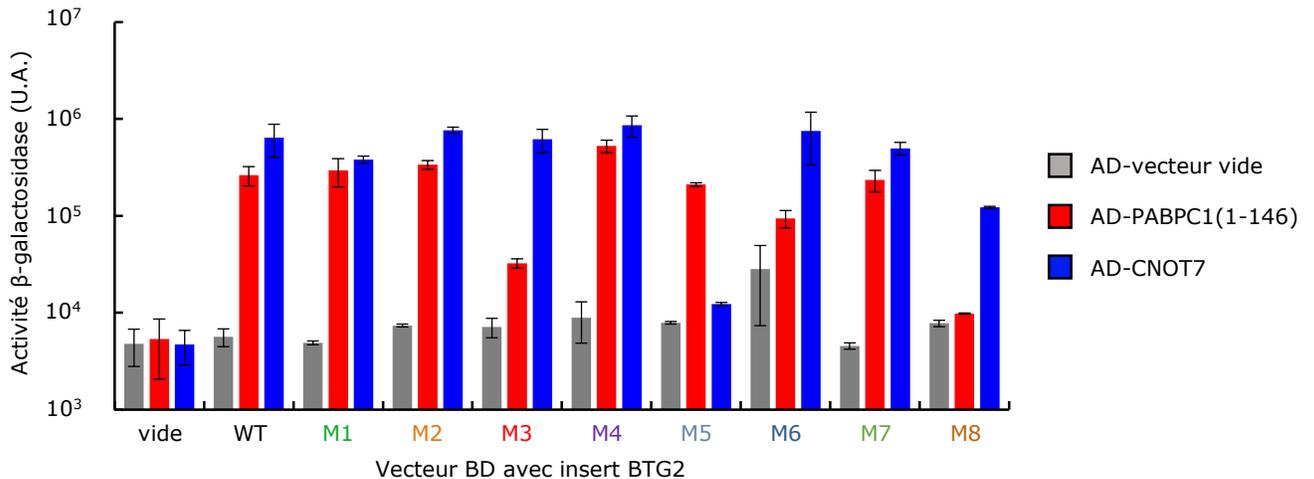


Figure R16 : Obtention d'un mutant de BTG2(APRO) pour lequel la liaison à PABPC1 est affaiblie.

(a) Séquence protéique du domaine APRO de BTG2. Les modifications de séquence, obtenues par insertion aléatoire de séquence ou mutagenèse dirigée, présentes chez les différents mutants analysés par essai β -galactosidase sont annotées ainsi que les positions des acides aminés n°1, 68, 69 et 126 et les différentes régions boxA, boxB et boxC. (b) Activités β -galactosidase obtenues après essai double-hybride durant lequel des levures ont été transformées avec un plasmide exprimant l'une des constructions BTG2(APRO) couplée au domaine de liaison à l'ADN (BD) du facteur de transcription LexA ainsi qu'un autre plasmide exprimant PABPC1(1-146) ou CNOT7 couplée au domaine d'activation de la transcription (AD) de GAL4. Les domaines BD et AD non couplés à des protéines d'intérêt ont été utilisés comme contrôles négatifs. L'activité β -galactosidase a été mesurée après addition de réactif β -Glo.

que ces mutants s'associent moins efficacement à PABPC1(1-146) que BTG2(APRO) sauvage sans que leur liaison à CNOT7 ne soit affectée. Comme l'interaction avec PABPC1(1-146) ne

semble que faiblement affectée par la mutation M6 d'une part et que d'autre part, il a été trouvé que le mutant M3 s'exprime faiblement *in cellulo* au contraire du mutant M8, c'est la mutation M8 qui a été sélectionnée pour la suite des expériences. Cette mutation correspond au remplacement de la séquence située directement en aval du motif boxB, et conservée entre BTG1 et BTG2, par la séquence correspondante de Tob1. Cette séquence avait déjà été caractérisée par d'autres comme un motif spécifique de BTG1 et BTG2 et appelée boxC (Berthet et al., 2002). Nous appellerons donc dorénavant ce mutant, le mutant BTG2(APRO)boxC.

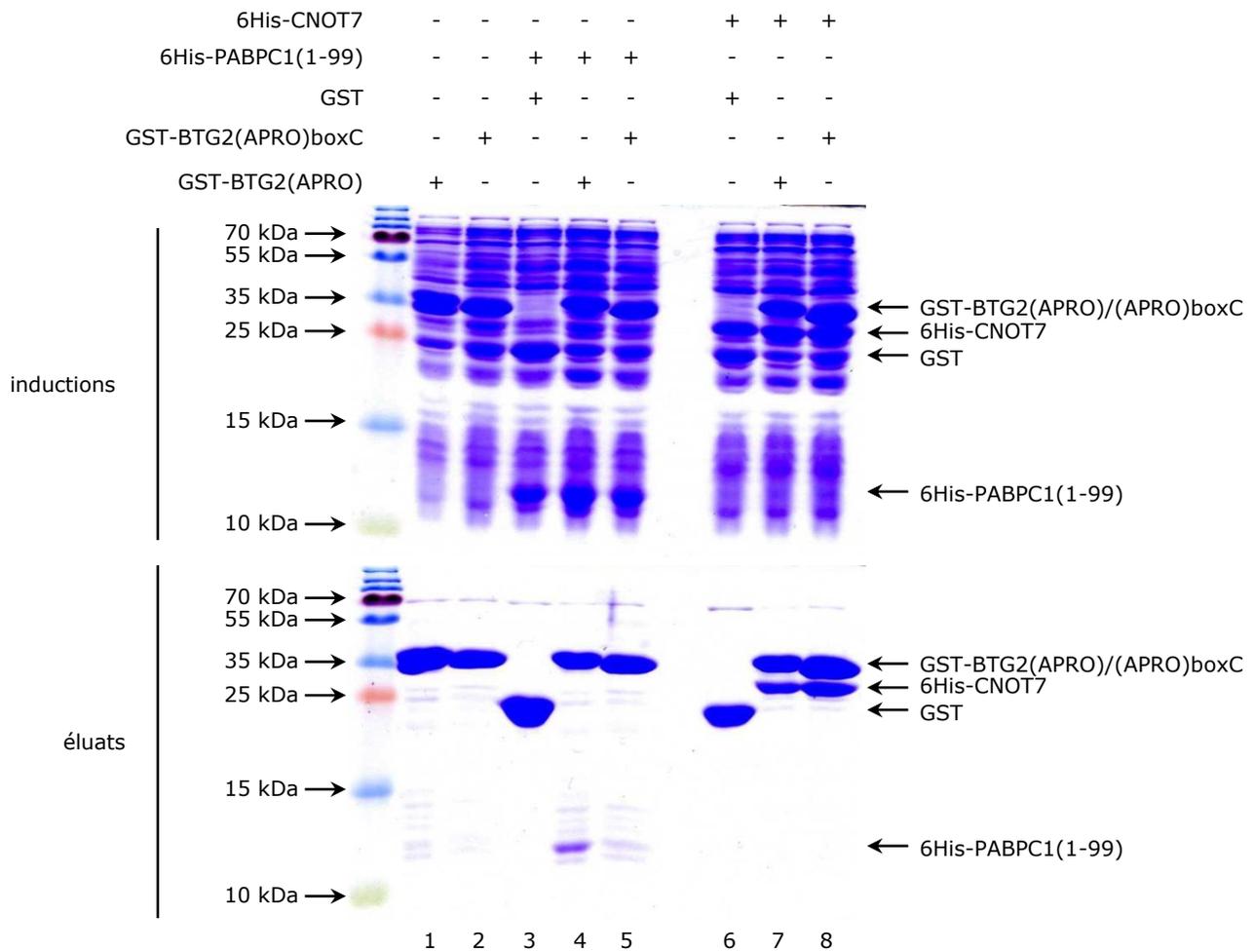


Figure R17 : La mutation de la boxC de BTG2 affecte l'interaction avec le premier domaine RRM de PABPC1. 6His-PABPC1(1-99) ou 6His-CNOT7 ont été co-exprimés dans *E. coli* avec GST, GST-BTG2(APRO) ou GST-BTG2(APRO)boxC comme indiqué. Les protéines marquées GST ont été purifiées à l'aide d'une résine Glutathione Sépharose 4B, puis les inductions ainsi que les éluats ont été fractionnés sur gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de Coomassie.

J'ai voulu vérifier les résultats d'interaction par des expériences de co-précipitation après co-expression dans *E. coli*. J'ai co-exprimé différentes protéines en utilisant des plasmides codant des protéines de fusion GST en N-terminal (GST-BTG2(APRO), GST-BTG2(APRO)boxC et GST seule), ainsi que des protéines marquées par six histidines en N-terminal (6His-CNOT7 et 6His-PABPC1(1-99), cette dernière ne présentant que RRM1). Après précipitation avec des billes de sépharose couplées à de la glutathione, les inductions ainsi que les fractions d'éluat ont été migrées sur gels SDS-PAGE 15%, colorées au bleu de Coomassie et présentées en Figure R17.

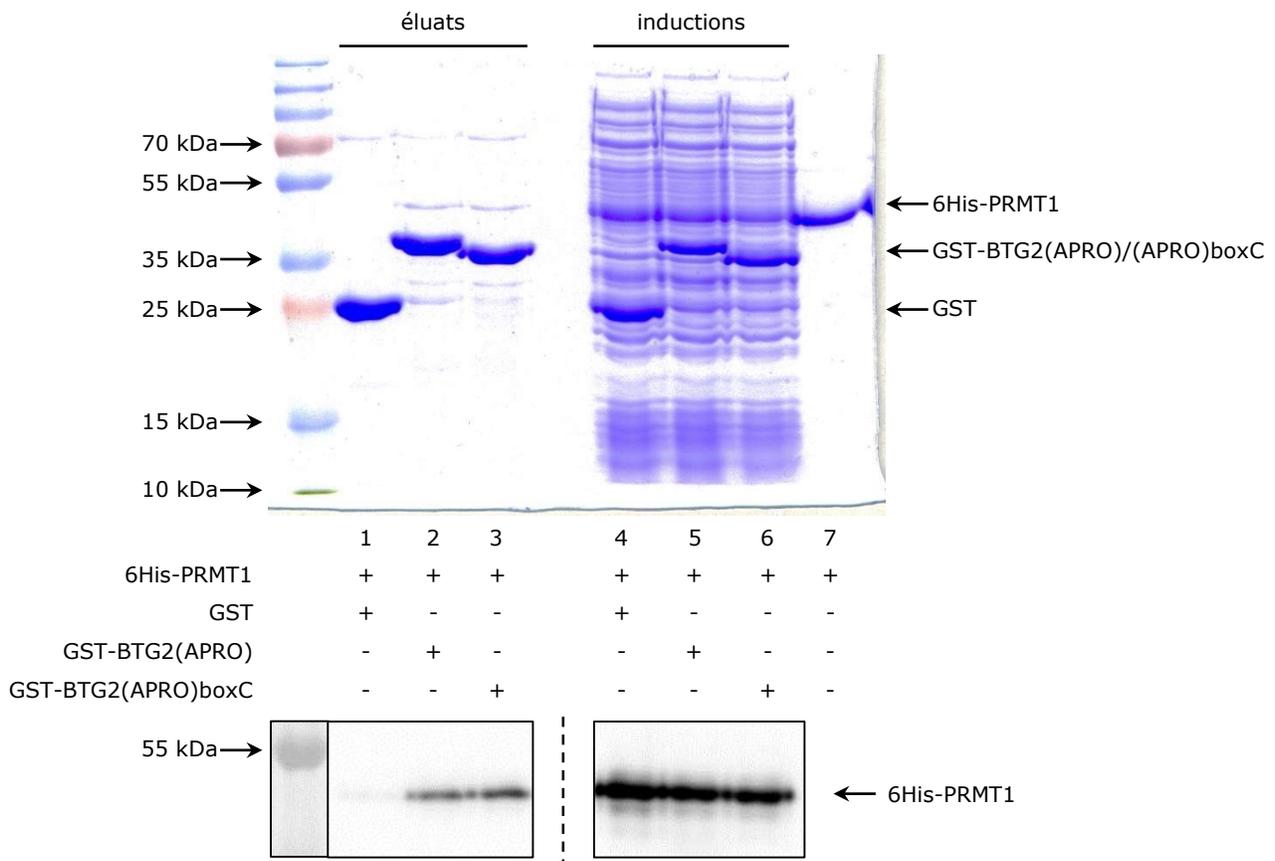


Figure R18 : La mutation de la boxC de BTG2 n'affecte pas l'interaction de BTG2(APRO) avec PRMT1.

La protéine purifiée 6His-PRMT1 a été ajoutée à des lysats bactériens exprimant GST, GST-BTG2(APRO) ou GST-BTG2(APRO)boxC comme indiqué. Après 15 min d'incubation à 4°C, les protéines marquées GST ont été purifiées à l'aide d'une résine Glutathione Sépharose 4B, puis les inductions ainsi que les éluats ont été fractionnés sur gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie. Le *western blot* révélé avec un anticorps anti-PRMT1 et obtenu après migration de dilutions des différentes fractions d'induction et d'éluat est également présenté.

On peut constater que toutes les protéines sont bien présentes dans les inductions (puits 1 à 8 des inductions). On constate également que 6His-CNOT7 co-précipite avec GST-BTG2(APRO) et GST-BTG2(APRO)boxC mais pas avec GST, confirmant la capacité du mutant boxC à lier CNOT7

(comparer puits 7 et 8 au puits 6 pour les fractions d'élution). De plus, 6His-PABPC1(1-99) co-précipite avec GST(BTG2)APRO (puits 4) mais pas avec GST (puits 3) et est bien plus faiblement présente dans le cas d'une co-expression avec le mutant boxC (puits 5). Ceci confirme que la mutation boxC du domaine APRO de BTG2 affecte la liaison au domaine RRM1 de PABPC1, en accord avec les résultats obtenus par essai double-hybride β -galactosidase chez la levure. Étant donné que la région boxC a été identifiée comme une région nécessaire à l'interaction de BTG2 avec la Protéine arginine Méthyl Transférase 1 (PRMT1) (Berthet et al., 2002), j'ai testé l'interaction du mutant BTG2(APRO)boxC avec PRMT1. Pour ce faire, j'ai réalisé une autre expérience de co-précipitation après expression de GST, GST-BTG2(APRO) ou GST-BTG2(APRO)boxC chez *E. coli* et ajout aux extraits d'induction de la protéine 6His-PRMT1, purifiée préalablement par chromatographie d'affinité et chromatographie d'exclusion stérique. Après précipitation avec des billes de sépharose couplées à de la glutathione, les inductions, les fractions d'élution ainsi qu'un échantillon de 6His-PRMT1 purifiée ont été résolus sur un gel SDS-PAGE 12%, ensuite coloré au bleu de Coomassie et présenté en Figure R18. On constate que les protéines d'intérêt sont bien présentes dans les fractions d'induction (puits 4 à 6). 6His-PRMT1 ne précipite pas avec GST (puits 1) mais précipite de manière équivalente avec GST-BTG2(APRO) et GST-BTG2(APRO)boxC (respectivement puits 2 et 3), ce qui signifie que le mutant boxC est toujours capable de lier PRMT1. Étant donnée la faible intensité des bandes correspondant à 6His-PRMT1 sur le gel marqué au bleu de Coomassie, un *western blot* a été réalisé avec des dilutions des différentes fractions en utilisant un anticorps anti-PRMT1. On constate que 6His-PRMT1 est détecté dans toutes les fractions d'induction, comme observé précédemment (puits 4 à 6). De plus, le *western blot* confirme la co-précipitation de 6His-PRMT1 avec GST-BTG2(APRO) et GST-BTG2(APRO)boxC (puits 2 et 3), ainsi que l'absence de co-précipitation de 6His-PRMT1 avec GST (puits 1). On peut donc conclure que la mutation boxC du domaine APRO de BTG2 n'altère pas la capacité de ce mutant à se lier à PRMT1. J'ai ensuite évalué la capacité de ce mutant à augmenter l'activité désadénylase de CNOT7 par essai de désadénylation *in vitro*. Les protéines utilisées sont présentées en Figure R19.

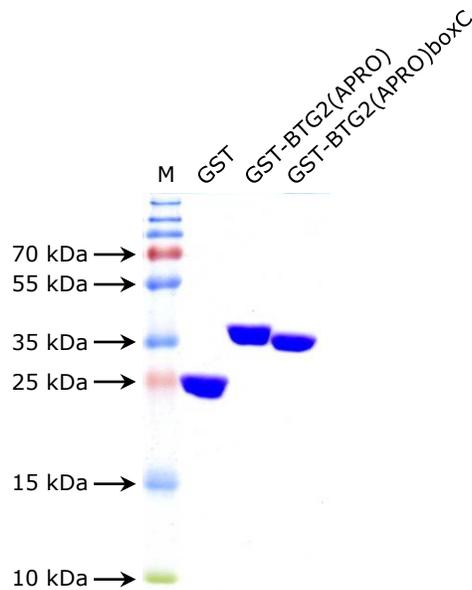


Figure R19 : Protéines de fusion GST utilisées pour des essais de désadénylation *in vitro*. 5 µg de chaque protéine ont été migrés sur gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie. Les protéines GST, GST-BTG2(APRO) et GST-BTG2(APRO)boxC ont été exprimées chez *E. coli* avant purification par chromatographie d'affinité puis par chromatographie d'exclusion stérique.

J'ai incubé à 30°C pendant 20 min un substrat de 75 adénosines avec soit 0,7 µM 6His-PABPC1(1-190), 1,8 µM GST-BTG2(APRO), 1,8 µM GST-BTG2(APRO)boxC, 1,8 µM GST, ou 1,8 µM 6His-CNOT7 ; soit avec une combinaison de ces différents facteurs dans les mêmes concentrations. Aux temps de réaction 0, 5, 10 ou 20 minutes, une fraction de chaque réaction a été prélevée. Les produits de dégradation obtenus ont été fractionnés dans un gel d'acrylamide dénaturant 8%, présenté en Figure R20. On constate une dégradation progressive du substrat durant les 20 min de la réaction dans le cas où le substrat est incubé avec GST, 6His-PABPC1(1-190) et 6His-CNOT7, avec une vitesse de désadénylation de 2,7 nts/min (puits 1 à 4). Le profil de dégradation observé est identique quand le substrat est incubé avec 6His-CNOT7 et GST-BTG2(APRO) (puits 16 à 19 ; vitesse de désadénylation de 2,1 nts/min). De façon surprenante, on observe une légère augmentation de la dégradation du substrat avec le mutant boxC (puits 21 à 24 ; vitesse de désadénylation de 3,5 nts/min). Ceci est peut-être dû à la présence de contaminants RNAses en très faible quantité dans GST-BTG2(APRO)boxC étant donné qu'on constate une très légère dégradation lorsque GST-BTG2(APRO)boxC est incubée seule avec le substrat pendant 20 min (puits 25). Cependant, l'ajout de 6His-PABPC1(1-190) à GST-BTG2(APRO)boxC et 6His-CNOT7 n'augmente pas la vitesse de dégradation du substrat (puits 11 à 14, vitesse de

désadénylation de 3,4 nts/min) contrairement à ce qui est observé après ajout de 6His-PABPC1(1-190) à GST-BTG2(APRO) sauvage et 6His-CNOT7 (puits 6 à 9 ; vitesse de désadénylation de 14,4 nts/min). Ces résultats démontrent donc que, *in vitro*, la forte stimulation de l'activité de CNOT7 en présence de BTG2(APRO) et de PABPC1(1-190) nécessite une interaction entre BTG2 et PABPC1.

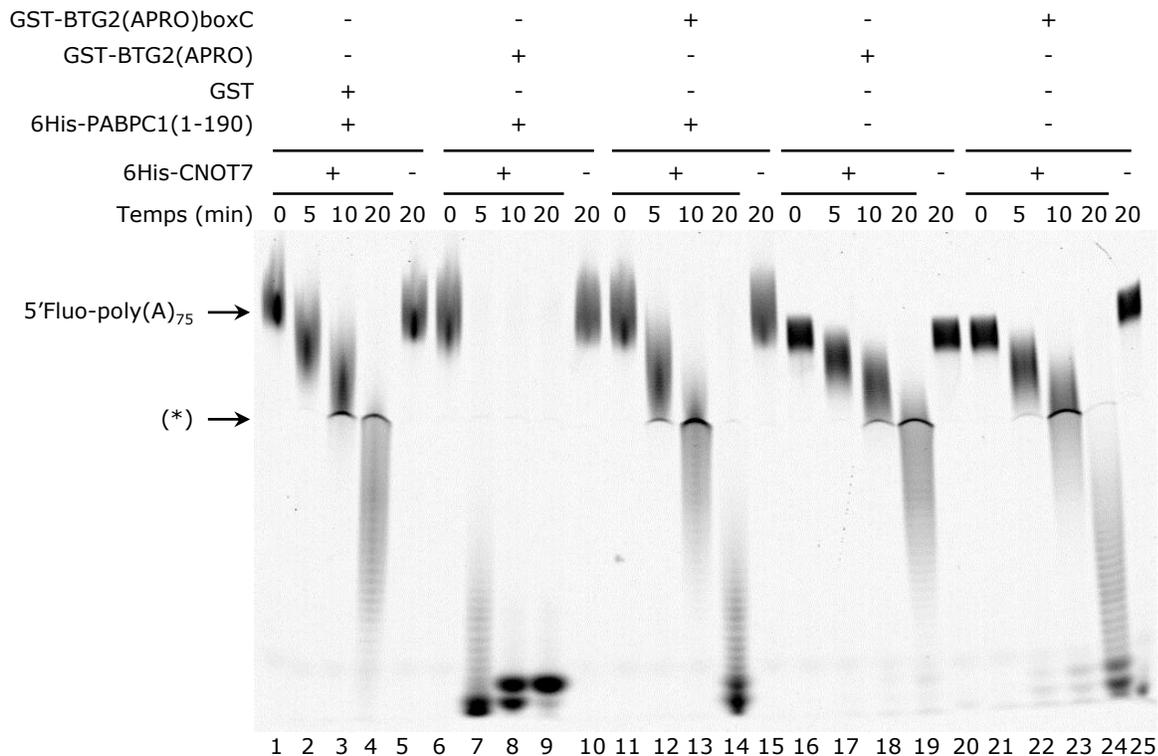


Figure R20 : La mutation du motif boxC de BTG2 affecte la capacité de BTG2 à augmenter l'activité désadénylase de CNOT7 en présence de PABPC1(1-190) *in vitro*.
 Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été mis ou non en présence de 0,7 μ M 6His-PABPC1(1-190), 1,8 μ M GST-BTG2(APRO), 1,8 μ M BTG2(APRO)boxC, 1,8 μ M GST, et (ou non) de 1,8 μ M de 6His-CNOT7 dans du tampon IIC à 30°C pendant les temps indiqués. Les réactions ont ensuite été analysées sur gel d'acrylamide dénaturant 8% avant d'être observées avec un appareil *Typhoon 8600*. L'astérisque (*) indique un défaut de migration dû à la présence d'HEPES dans le tampon de réaction IIC. Les vitesses de dégradation, exprimées en nucléotides/min, sont de 2,7 avec GST+6His-PABPC1(1-190), 14,4 avec GST-BTG2(APRO)+6His-PABPC1(1-190), 3,4 avec GST-BTG2(APRO)boxC+6His-PABPC1(1-190), 2,1 avec GST-BTG2(APRO) et 3,5 avec GST-BTG2(APRO)boxC.

2.3 La liaison de BTG2 à PABPC1 est-elle nécessaire à la stimulation de la désadénylation *in cellulo* ?

Il a d'ores et déjà été démontré que BTG2 est capable de stimuler la désadénylation d'un rapporteur β -globine *in cellulo* (Mauxion et al., 2008). Afin de tester si l'interaction entre BTG2 et PABPC1 était nécessaire à la stimulation de la désadénylation par BTG2 *in cellulo*, des cellules HEK293

Tet-Off ont été co-transfectées avec un plasmide exprimant un rapporteur β -globine sous le contrôle d'un élément de réponse à la tétracycline (TRE) et des plasmides codant pour différentes protéines de fusion GFP, aussi étiquetées HA, ou un plasmide d'expression GFP vide.

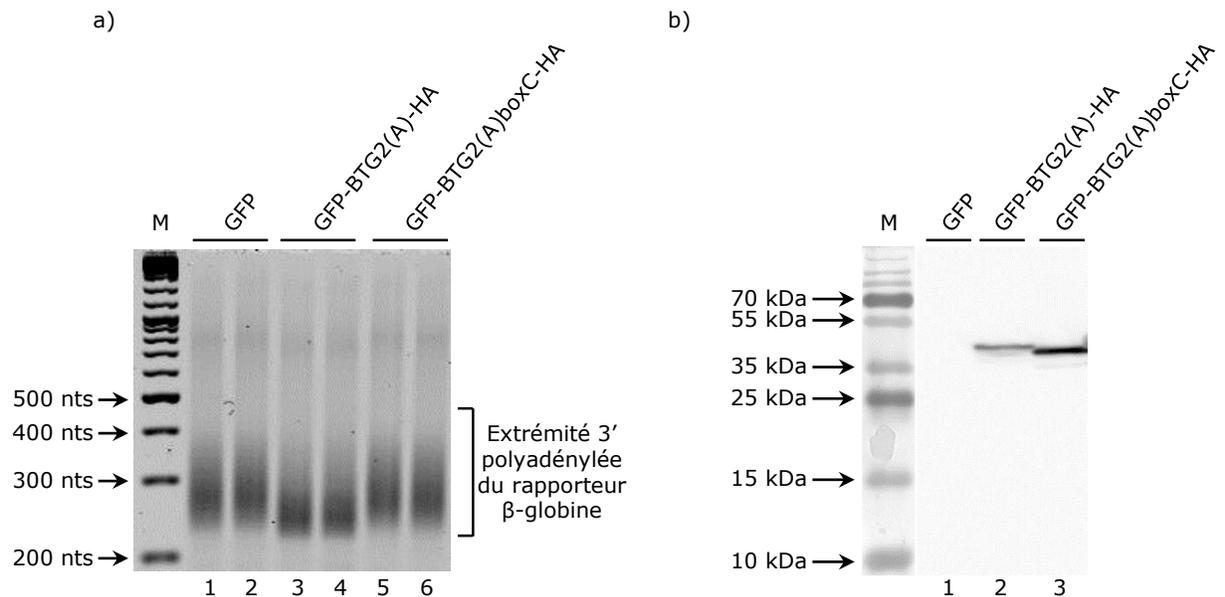


Figure R21 : Évaluation de la capacité de BTG2(APRO) et BTG2(APRO)boxC à affecter la désadénylation d'un rapporteur β -globine *in cellulo*.

(a) Des cellules HEK293 *Tet-Off* ont été co-transfectées avec 0,4 μ g d'un plasmide exprimant un rapporteur β -globine et 0,8 μ g de plasmides exprimant soit la GFP soit BTG2(APRO) ou BTG2(APRO)boxC couplées à la GFP en N-terminal et marquées HA en C-terminal. Des fragments comprenant environ 200 nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARNm du transcrit β -globine ainsi que la queue poly(A) ont été amplifiés par RACE-PAT puis migrés sur gel d'agarose 3%. Les produits d'amplification de deux réactions de transfection sont présentés. (b) La composition des lysats cellulaires correspondant à l'expérience (a) a été observée par *western blot* après révélation avec un anticorps anti-HA. Composition protéique représentative de deux réactions de transfection.

Après extraction des ARN totaux, j'ai utilisé une technique, nommée RACE-PAT (*Rapid Amplification of CDNA Ends Poly(A) Tail assay*) me permettant d'amplifier environ 200 paires de bases (pb) de la 3' UTR de l'ARNm rapporteur β -globine ainsi que la queue poly(A). Les produits PCR obtenus sont ensuite migrés sur gel d'agarose 3%. Parallèlement, une extraction de protéines a été faite, afin d'évaluer l'expression des différentes protéines de fusion par *western blot*. Le gel d'agarose ainsi que le *western blot* obtenus sont présentés en Figure R21. Les cellules sur-exprimant GFP sont les cellules contrôles de cette expérience (Figure R21a) ; puits 1 et 2). Comme attendu, on constate une diminution de la taille de la queue poly(A) du rapporteur β -globine dans des cellules qui sur-expriment GFP-BTG2(APRO)-HA sauvage par rapport au contrôle (comparer

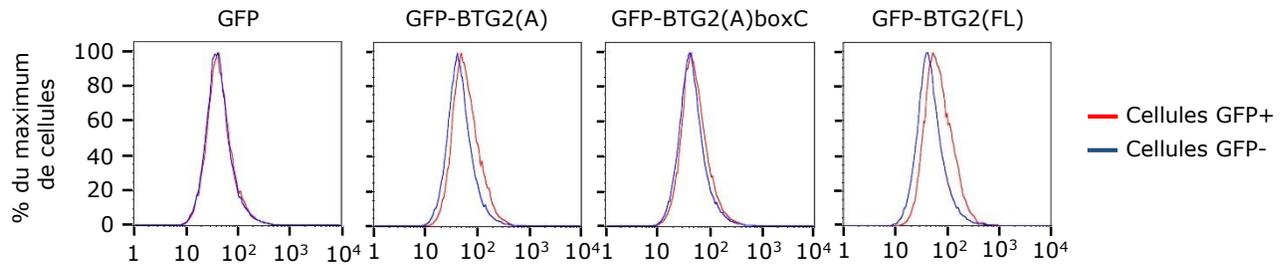
puits 3 et 4 aux puits 1 et 2). Par contre, on constate que les cellules sur-exprimant GFP-BTG2(APRO)boxC-HA présentent des queues poly(A) de taille similaire à celle retrouvée chez les cellules contrôles, ce qui signifie que le mutant boxC n'est pas capable d'activer la désadénylation du rapporteur β -globine *in cellulo* (comparer puits 5-6 aux puits 1-2). Les effets observés ne sont pas dus à une absence d'expression des protéines de fusion BTG, étant donné qu'elles sont toutes exprimées à des niveaux similaires (comparer Figure R21b) puits 2 et 3). Ces résultats impliquent que la liaison de BTG2 à PABPC1 est nécessaire à l'activation de la désadénylation par BTG2 *in cellulo*.

2.4 L'interaction entre BTG2(APRO) et PABPC1 a-t-elle un impact sur les propriétés antiprolifératives de BTG2 ?

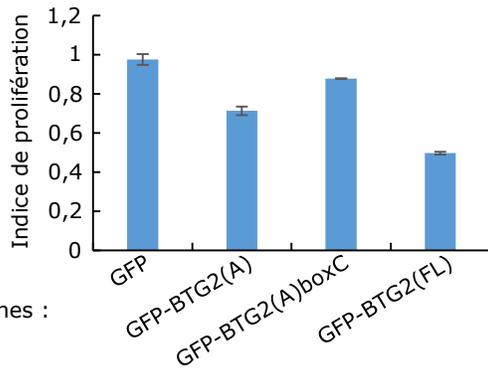
Comme il a été publié que BTG2 possède des propriétés antiprolifératives en affectant la progression du cycle cellulaire (Montagnoli et al., 1996; Rouault et al., 1996; Ryu et al., 2004), je me suis demandé si BTG2(APRO) et le mutant BTG2(APRO)boxC étaient capables d'impacter la prolifération cellulaire. À cette fin, j'ai marqué des cellules U2OS avec le marqueur de prolifération eFluor 670, un réactif qui se lie de manière covalente aux amines primaires des protéines cellulaires et qui est distribué de manière égale entre chaque cellule fille après division cellulaire. Après marquage des cellules U2OS, j'ai co-transfecté ces cellules avec des plasmides exprimant soit la GFP seule, soit des protéines BTG2 fusionnées en N-terminal avec la GFP. Après trois jours, les cellules ont été récoltées et marquées avec 5 μ g/ml d'iodure de propidium puis analysées par cytométrie de flux. Pour des cellules transfectées avec un vecteur exprimant uniquement GFP, on constate que les pics d'intensité du marqueur de prolifération correspondant aux cellules GFP négatives, non transfectées, et aux cellules GFP positives, n'exprimant que GFP, se chevauchent totalement. Cela signifie que ces deux populations cellulaires ont proliféré à la même vitesse. Cependant, pour des cellules transfectées avec des plasmides exprimant des protéines de fusion GFP-BTG2, complète ou comprenant seulement le domaine APRO, on constate que le pic d'intensité du marqueur de prolifération se situe à des valeurs plus fortes dans le cas de cellules GFP-positives, que dans le cas de cellules GFP-négatives. Cela signifie que les cellules exprimant ces protéines prolifèrent moins vite que les cellules n'exprimant aucune protéine de fusion (Figure R22a)). Ces résultats ont permis de calculer un indice de prolifération pour les différentes populations cellulaires sur-exprimant les protéines de fusion. L'analyse de cet indice montre une forte diminution de ce dernier en présence d'une protéine BTG2 complète GFP-BTG2(FL), avec

un indice de prolifération d'environ 0,51 (Figure R22b)). Par ailleurs, on constate aussi une diminution de la prolifération cellulaire quand seul le domaine APRO de BTG2 est exprimé (GFP-BTG2(A)) avec une valeur d'indice d'environ 0,71, suggérant que le domaine APRO de BTG2 est suffisant pour entraîner une inhibition de la prolifération cellulaire.

a)



b)



c)

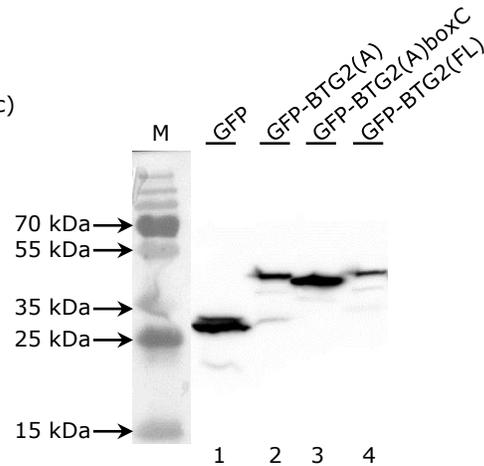


Figure R22 : Essai de prolifération cellulaire.

(a) Histogrammes présentant les intensités du marqueur de prolifération dans des cellules exprimant ou non diverses protéines BTG2. Des cellules U2OS ont été marquées avec le marqueur de prolifération cellulaire eFluor 670 avant ensemencement dans des plaques de transfection. Le jour suivant, les cellules ont été transfectées avec un plasmide exprimant GFP seule ou une protéine de fusion GFP avec BTG2 complète (GFP-BTG2(FL)) ou avec le domaine APRO de BTG2 sauvage (GFP-BTG2(A)) ou mutant (GFP-BTG2(A)boxC). Les cellules ont été analysées par cytométrie de flux 3 jours après transfection. Profils représentatifs de deux expériences. (b) Analyse de la capacité des constructions BTG2 à réduire la prolifération cellulaire. Le changement de taux de prolifération indiqué par la dilution de l'eFluor 670 dans l'expérience (a) a été calculé pour chaque condition en utilisant la formule : $\text{Indice de prolifération} = 1 - \frac{[\text{Médiane de l'intensité du marqueur de la population GFP positive considérée}] - [\text{Moyenne des médianes de l'intensité du marqueur des populations GFP négatives}]}{[\text{Moyenne des médianes de l'intensité du marqueur des populations GFP négatives}]}$. Ainsi, un indice de prolifération égale à 1 représente une population GFP positive qui prolifère à la même vitesse que des cellules GFP négatives, tandis qu'un indice de prolifération de 0 indique un retard d'un cycle de division par rapport à la population GFP négative. Moyenne de deux expériences. (c) Composition des lysats cellulaires correspondant à l'expérience (a) observée par *western blot* après révélation GFP afin d'évaluer l'expression des diverses protéines BTG2 après transfection.

Par contre, l'indice de prolifération est plus élevé lorsque la mutation boxC est introduite dans le domaine APRO de BTG2, atteignant une valeur d'environ 0,89. Ceci indique que les propriétés antiprolifératives de BTG2 nécessitent en partie le domaine boxC et donc l'interaction de BTG2 avec PABPC1. Les modulations de la prolifération cellulaire constatées ne sont pas dues à une absence d'expression des différentes constructions BTG2, étant donné qu'elles sont toutes détectées par *western blot* après révélation anti-GFP, avec des niveaux similaires d'expression pour GFP-BTG2(A) et GFP-BTG2(FL) (Figure R22c) ; puits 2 et 4 respectivement), tandis que GFP-BTG2(A)boxC présente une expression plus forte que ces dernières (Figure R22c) ; comparer puits 3 aux puits 2 et 4).

2.5 Recherche d'un modèle cellulaire d'induction de l'ARNm endogène de BTG2 :

J'ai voulu obtenir un modèle stable d'induction endogène de l'ARNm de BTG2 afin de pouvoir m'affranchir des systèmes de sur-expression et de me rapprocher des conditions physiologiques d'expression de BTG2. L'expression de BTG2 n'est pas constitutive, mais est induite après stimulation par de nombreux composés comme l'étoposide (Ficazzola et al., 2001), la cycloheximide (Ficazzola et al., 2001), la forskolin (Fletcher et al., 1991), l'EGF (Fletcher et al., 1991), le TPA (Cho et al., 2008; Struckmann et al., 2004), la doxorubicine (Ficazzola et al., 2001; Wagener et al., 2013), l'acide rétinoïque (Passeri et al., 2006; Wagener et al., 2013) ou encore une carence en sérum (Fletcher et al., 1991).

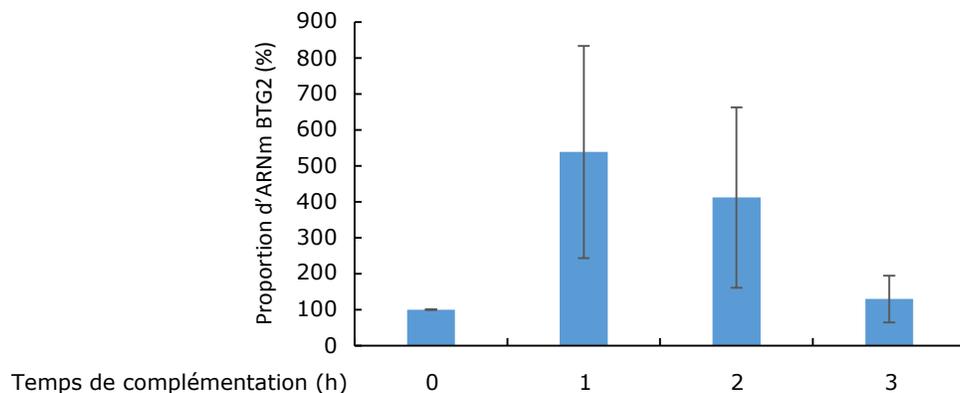


Figure R23 : Induction de l'expression endogène de BTG2 par un traitement carence-complémentation en sérum de cellules U2OS.

Proportion d'ARNm de BTG2 plusieurs heures, comme indiqué, après complémentation avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), précédée par une carence en sérum par incubation des cellules U2OS avec 0,2% SVF pendant 16h. Après extraction d'ARN total et transcription inverse, les ADNc de BTG2 ainsi que du contrôle RPLP0 ont été amplifiés par qPCR.

Le premier traitement que j'ai testé était une carence en sérum de cellules U2OS suivie d'une complémentation pendant plusieurs heures avec le milieu de culture standard contenant du sérum.

Après extraction des ARN totaux et transcription reverse, les ADNc correspondant aux ARNm de BTG2 et de RPLP0 (*Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*) ont été amplifiés par qPCR. Le pourcentage d'expression de l'ARNm de BTG2 en fonction de la durée de complémentation en sérum est présenté en Figure R23. On constate, malgré la grande variabilité des résultats, que le niveau d'ARNm de BTG2 est enrichi après 1h ou 2h de complémentation par rapport aux cellules non complémentées. Cependant, n'obtenant pas d'induction d'expression stable avec ce traitement, d'autres composés ont été testés. Il a été publié qu'un traitement de 3h avec 32 nM de TPA (soit environ 20 ng/mL) engendrait une augmentation d'un facteur 5 par RT-PCR de l'ARNm de BTG2 dans des cellules humaines HL-60 (Cho et al., 2008), et de même un enrichissement de l'ARNm de BTG2 a été constaté par *northern blot* durant un traitement de cellules Swiss 3T3 durant 2h avec 50 ng/mL de TPA (Fletcher et al., 1991). J'ai donc testé si un traitement au TPA permettait une induction de BTG2 dans les cellules U2OS. Pour ce faire, j'ai mis des cellules U2OS en présence de 20 ou de 50 ng/mL de TPA, pendant 0, 1, 2 ou 3h. Après extraction et transcription inverse des ARN totaux, les ADNc de BTG2 et de RPLP0 ont été amplifiés par qPCR. Le pourcentage d'expression de l'ARNm de BTG2 en fonction de la durée de traitement au TPA est représenté en Figure R24a). On ne constate aucune augmentation de l'expression de l'ARNm de BTG2 à la suite d'un traitement avec 20 ou 50 ng/mL de TPA. Une augmentation de 14,8 fois et de 18,9 fois de l'ARNm de BTG2 ayant été constatée par *real-time* PCR, dans des cellules MCF-7 et T24 respectivement, après un traitement de 24h avec 0,5 µg/mL de doxorubicine (Wagener et al., 2013), j'ai testé l'effet d'un traitement avec ce composé pendant 12h, 16h et 24h sur des cellules U2OS. Le pourcentage d'expression de l'ARNm de BTG2 en fonction de la durée de traitement est représenté en Figure R24b). On constate une diminution du niveau de l'ARNm de BTG2 quelle que soit la durée de traitement. Le dernier composé testé a été l'acide rétinoïque. En effet, le traitement de cellules HL-60 avec 1 µM d'acide rétinoïque a été décrit comme augmentant d'un facteur 3 le niveau de l'ARNm de BTG2 au bout de 6h de traitement (Cho et al., 2008). De plus, d'autres équipes ont obtenu une augmentation d'un facteur 6 après 24h d'incubation en présence d'1 µM d'acide rétinoïque pour des cellules HL-60, NB4 ou MCF-7 (Passeri et al., 2006; Wagener et al., 2013). J'ai choisi de traiter soit des cellules U2OS, soit des cellules MCF-7, avec 1 µM

d'acide rétinoïque pendant 0 ; 2 ; 4 ou 6h. Le pourcentage d'expression de l'ARNm de BTG2 en fonction de la lignée cellulaire et de la durée de traitement est présenté en Figure R24c).

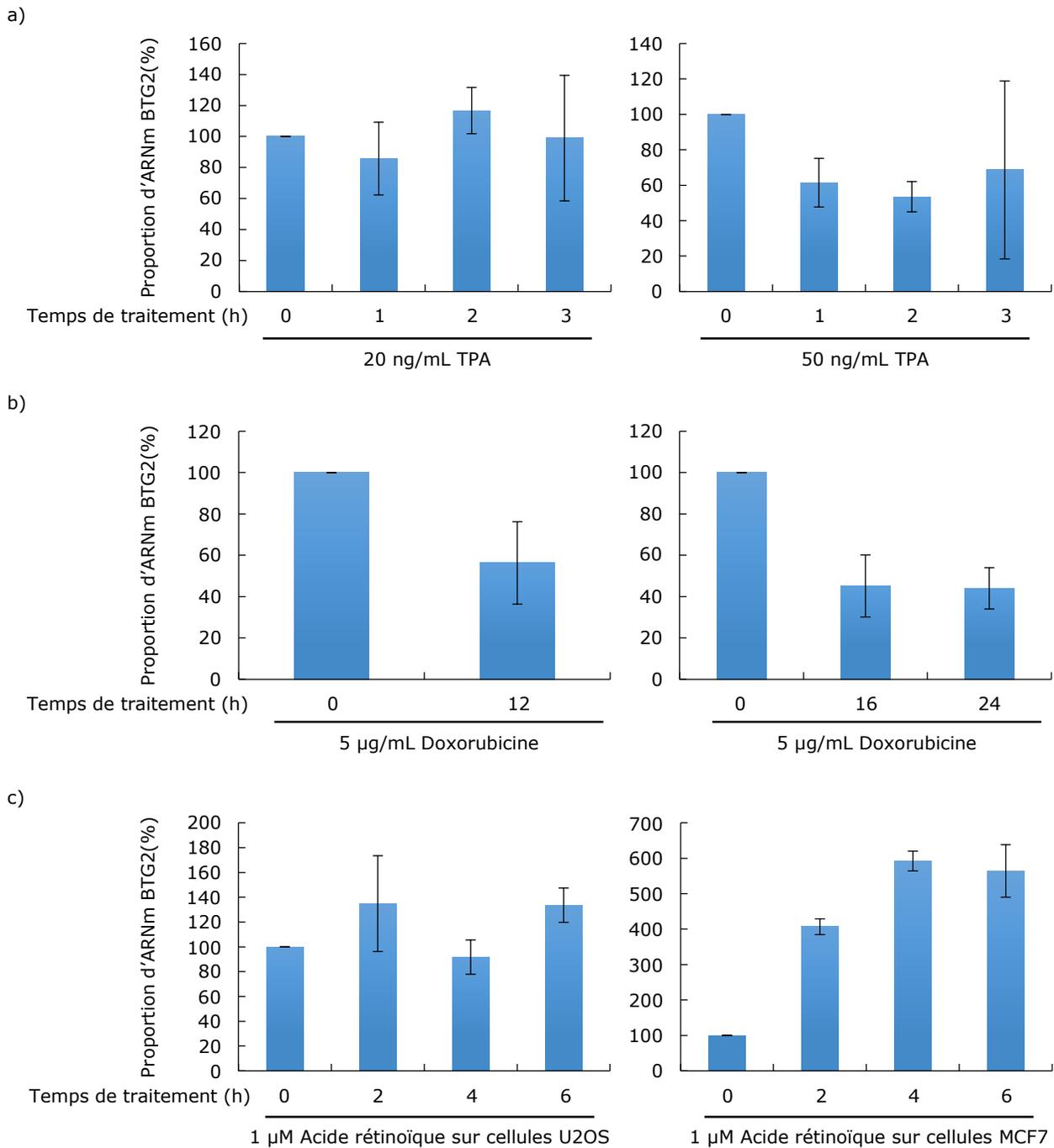


Figure R24 : Induction de l'expression endogène de l'ARNm de BTG2 en réponse à différents traitements.

Proportion d'ARNm de BTG2 suite à un traitement avec (a) 20 ng/mL ou 50 ng/mL TPA, ou (b) 5 µg/mL doxorubicine, ou (c) 1 µM acide rétinoïque pendant plusieurs heures comme indiqué. Après extraction d'ARN total et transcription inverse, les ADNc de BTG2 ainsi que du contrôle RPLPO ont été amplifiés par qPCR.

On constate une forte variabilité de l'effet de l'acide rétinoïque sur le niveau de l'ARNm de BTG2 pour les cellules U2OS, même s'il semble qu'une très faible induction (environ 120 %) soit constatée au bout de 6h de traitement.

Cependant, pour les cellules MCF-7, on constate une nette augmentation du niveau de l'ARNm de BTG2 au bout de 2h (environ 400%), 4h (environ 600%) et 6h (environ 500%). Ainsi, en se basant sur les différentes données obtenues, l'utilisation de l'acide rétinoïque sur des cellules MCF-7 semble la méthode la plus prometteuse pour obtenir un système stable d'induction endogène de BTG2. Ce traitement nécessite toutefois d'être confirmé par d'autres essais.

2.6 BTG2 a-t-elle un rôle dans la traduction ?

Etant donné que BTG2 lie PABPC1 aux niveaux du premier domaine RRM, qui est notamment impliqué dans la traduction par liaison avec des facteurs d'initiation comme eIF4G (Safaei et al., 2012), il était d'intérêt d'étudier si BTG2 était capable d'interférer avec le mécanisme de traduction. Pour ce faire, j'ai réalisé des expériences de traduction *in vitro* en évaluant l'activité de rapporteurs luciférases.

2.6.1 Synthèse des rapporteurs luciférases et obtention d'un extrait cellulaire fonctionnel :

2.6.1.1 Synthèse des rapporteurs luciférases :

Avant de pouvoir effectuer ces expériences, il me fallait synthétiser des transcrits rapporteurs. J'ai synthétisé *in vitro* un transcrit codant la luciférase de Firefly, soit polyadénylé soit non polyadénylé et présentant ou non une coiffe en 5', devant servir de rapporteur principal et j'ai également synthétisé un transcrit codant la luciférase de *Renilla* non polyadénylé et présentant ou non une coiffe en 5' afin de pouvoir normaliser les essais de traduction (la synthèse des transcrits est décrite de manière exhaustive dans le chapitre Matériel et Méthodes).

Avant d'effectuer des essais de traduction, j'ai essayé de quantifier la proportion d'ARNm présentant une coiffe en 5' après la réaction d'addition de la coiffe. Pour ce faire, j'ai réalisé des traitements avec l'apyrase et l'exonucléase XRN1. 39 nM de transcrits Firefly, polyadénylés ou non et présentant ou non une coiffe en 5' ont d'abord été mis en présence de 0,03 U/ μ l d'apyrase pendant 1h à 30 °C pour transformer les extrémités des transcrits ne présentant pas de coiffe en une extrémité 5' monophosphate, afin de permettre leur digestion par l'exonucléase XRN1. Après traitement apyrase, les échantillons ont été complétés avec 0,03 U/ μ l XRN1 puis incubés pendant 1 h à 37°C. Des transcrits contrôles ont été incubés dans les tampons réactionnels, mais

sans les enzymes, puis purifiés de manière identique aux transcrits traités, c'est-à-dire par extraction au Phénol:Chloroforme:alcool Isoamylique (PCI) puis précipitation à l'éthanol. Les échantillons ont ensuite été analysés sur un gel d'acrylamide dénaturant 4%, avec en contrôle des transcrits Firefly non traités.

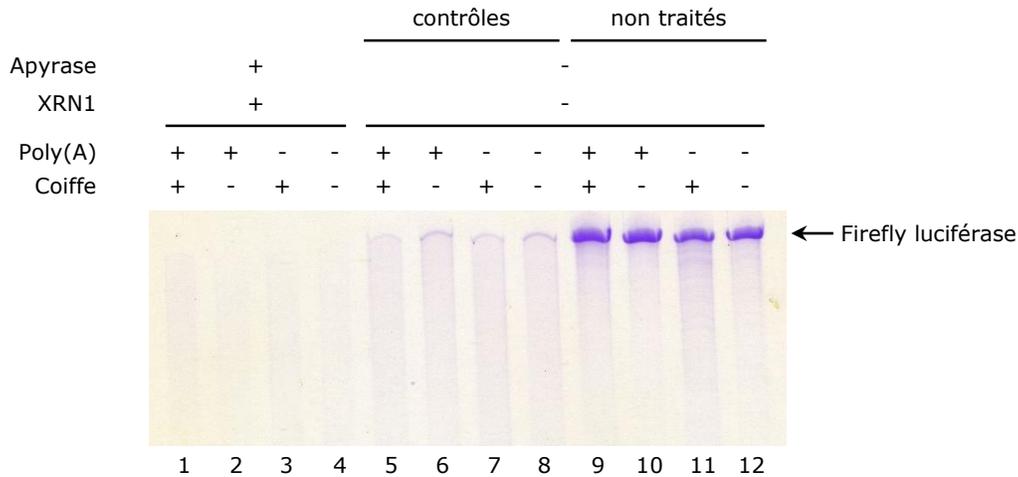


Figure R25 : Essai de quantification de la proportion d'ARNm présentant une coiffe en 5' après réaction d'ajout de coiffe avec l'enzyme du virus de la Vaccine. Produits de dégradation purifiés obtenus après incubation de 39 nM de transcrits Firefly, présentant ou non une queue poly(A) et/ou une coiffe en 5', en présence de 0,03 U/μL Apyrase pendant 1h à 30°C puis en présence de 0,03 U/μL XRN1 pendant 1h à 37 °C. Produits réactionnels fractionnés en parallèle de transcrits contrôles (puits 5 à 8) et non traités (puits 9 à 12) sur gel d'acrylamide dénaturant 4% et révélés après 10 min d'incubation sous agitation avec du réactif *Stains-All*.

Le gel obtenu est présenté en Figure R25. On constate que les transcrits contrôles présentent des signaux moins intenses que les transcrits non traités, ce qui est très vraisemblablement dû à une perte de matériel lors de l'étape d'extraction au PCI précédant la migration (comparer les puits 5 à 8 aux puits 9 à 12). Cependant, on ne détecte plus aucun signal correspondant aux transcrits dans les échantillons traités avec l'apyrase et XRN1, et ceci même pour les transcrits pour lesquels la réaction d'addition de la coiffe a été effectuée (puits 1 à 4). La réaction d'addition de la coiffe étant couramment utilisée dans le laboratoire pour obtenir des transcrits avec une coiffe marquée au ^{32}P , il était peu probable qu'aucun transcrit n'ait possédé de coiffe. Plus probablement, soit les enzymes apyrase et XRN1 sont contaminées avec des RNases ou des phosphatases, soit elles ont une certaine activité sur des transcrits coiffés. Cette expérience n'a donc pas permis d'évaluer la proportion de transcrits coiffés.

2.6.1.2 Test luciférase pour évaluer l'intégrité des transcrits :

J'ai testé la capacité des transcrits luciférase à être traduits à l'aide d'un lysat de réticulocytes de lapin. Pour ce faire, j'ai mis 75 nM d'un rapporteur luciférase, Firefly ou *Renilla* présentant ou non une coiffe en 5' et/ou une queue poly(A), ou 75 nM d'un transcrit Firefly luciférase contrôle fourni avec le kit du lysat de réticulocytes, en présence d'un lysat de réticulocytes de lapin pendant 90 min à 30°C. Après réaction de traduction *in vitro*, l'activité luciférase a été mesurée à l'aide du kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*. Ce kit permet de mesurer l'activité luciférase Firefly puis l'activité *Renilla* sur le même échantillon. L'activité Firefly est d'abord mesurée après ajout du réactif *Luciferase Assay Reagent II*, puis l'activité *Renilla* est mesurée après ajout sur le même échantillon du réactif *Stop and Glo®* qui a la particularité de pouvoir supprimer en grande partie l'activité Firefly (à hauteur d'un facteur 10⁵ selon le fabricant) et d'apporter le substrat pour mesurer l'activité *Renilla*. Le graphique présentant les activités Firefly et *Renilla* obtenues pour chaque échantillon est présenté en Figure R26.

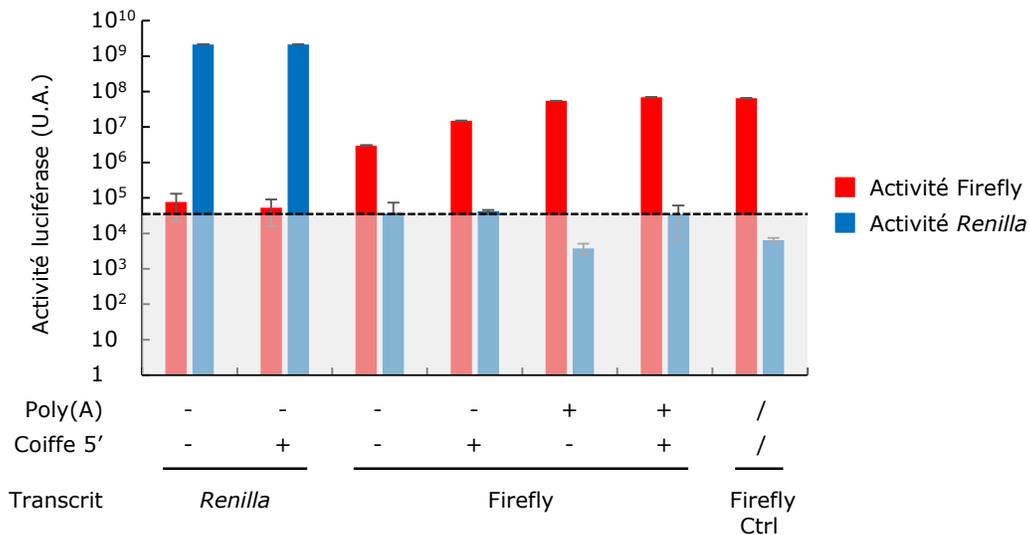


Figure R26 : Vérification de l'efficacité de traduction des transcrits par traduction *in vitro* avec un lysat de réticulocytes de lapins.

Activité luciférase après incubation de 75 nM de transcrit luciférase Firefly ou *Renilla* polyadénylé ou non et présentant ou non une coiffe en 5' pendant 1h30 à 30°C en présence de lysat de réticulocytes de lapin. Un transcrit Firefly luciférase fourni avec le kit de lysat de réticulocytes a été incubé à 75 nM dans les mêmes conditions comme contrôle positif (Firefly Ctrl). Activité Firefly luciférase, exprimée en Unités Arbitraires (U.A.), mesurée après addition de 50 µL de *Luciferase Assay Reagent II* puis activité *Renilla* mesurée après addition de 50 µL de *Stop and Glo® Reagent*. Le bruit de fond moyen obtenu lors de l'expérience est symbolisé par un cadre gris et délimité par une ligne en pointillés. Moyenne sur trois mesures issues de la même réaction.

On constate une forte activité luciférase Firefly (environ 65 millions d'unités arbitraires (U.A.)) après incubation du transcrite contrôle fourni avec le kit, ce qui signifie que le lysat de réticulocytes de lapin est fonctionnel. On détecte également une activité luciférase avec le transcrite Firefly que j'ai synthétisé, qu'il présente ou non une coiffe et/ou une queue poly(A) (valeurs comprises entre 3 millions et 69,6 millions U.A.). Ce résultat n'est pas étonnant, étant donné qu'il est connu que le lysat de réticulocytes de lapin permet la traduction de ces différents types de transcrits. Par ailleurs, on constate qu'avec la concentration utilisée de transcrite *Renilla* présentant ou non une coiffe, le luminomètre est saturé et affiche une valeur fixe de plus de 2 milliards U.A. lorsque l'activité *Renilla* est mesurée. On peut donc conclure que les transcrits synthétisés permettent bien la détection d'activité luciférase dans des essais de traduction *in vitro*.

2.6.1.3 Obtention d'un extrait fonctionnel de cellules HeLa S3 :

Pour évaluer l'impact du domaine APRO de BTG2 sur la traduction d'un ARNm, il me fallait un extrait cellulaire pour lequel la traduction est dépendante de la queue poly(A) et de la coiffe. En effet, l'utilisation du lysat de réticulocytes de lapins n'était pas idéale, puisque ce type d'extrait permet une traduction efficace de transcrits ne présentant pas de coiffe ou de queue poly(A).

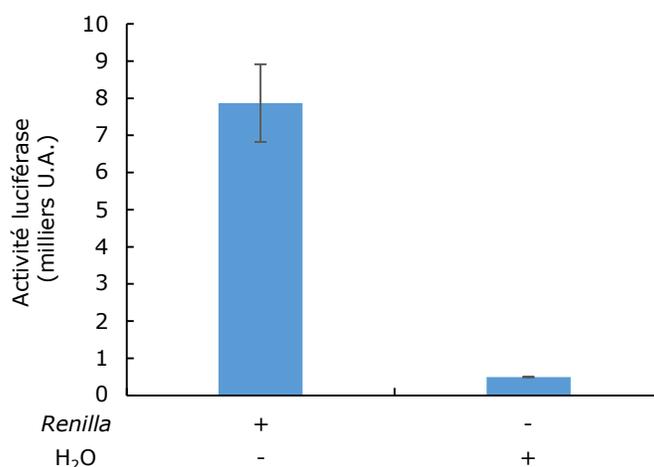


Figure R27 : Efficacité de traduction d'un transcrite luciférase *in vitro* avec un extrait d'HeLa S3.

Activité luciférase après incubation de 48,2 nM de transcrite *Renilla* luciférase non polyadénylé et présentant une coiffe en 5' pendant 3h à 30°C avec un extrait d'HeLa S3 traité avec 0,005 KU/μL micrococcal nucléase pendant 30 min à 37°C. De l'eau a été incubée dans les mêmes conditions comme contrôle négatif. Activité luciférase mesurée après addition de 50 μL de *Renilla Luciferase Assay Reagent*. Moyenne sur trois mesures issues de la même réaction.

Ainsi, j'ai choisi d'obtenir un extrait cellulaire provenant de cellules HeLa S3 étant donné qu'il a été montré qu'un tel extrait permet une traduction dépendante de la coiffe et de la taille de la queue poly(A) (Peng et al., 2008). L'extrait a été obtenu en adaptant la méthode décrite dans *Current Protocols in Cell Biology* (Witherell, 2001). Un essai de traduction *in vitro* a été réalisé en utilisant des transcrits *Renilla*. Pour cela 48,2 nM du transcrit *Renilla* luciférase non polyadénylé mais présentant une coiffe en 5' a été incubé pendant 3h à 30°C (conditions de réactions détaillées dans le chapitre Matériel et Méthodes) dans l'extrait HeLa S3, traité au préalable avec 0,005 KU/ μ l micrococcal nucléase pendant 30 min à 37°C.

Le traitement à la micrococcal nucléase a été effectué afin de débarrasser l'extrait de tout ARNm cellulaire pouvant interférer avec la traduction du transcrit luciférase en monopolisant la machinerie de traduction. L'activité *Renilla* a été mesurée après ajout du réactif *Renilla Luciferase Assay Reagent*, provenant du kit *Renilla Luciferase Assay System* et donc différent du kit utilisé précédemment puisqu'il ne permet de mesurer que l'activité luciférase de *Renilla*. Les données obtenues sont présentées en Figure R27. On constate que le signal obtenu en incubant le transcrit *Renilla* avec l'extrait de cellules HeLa S3 est environ 16 fois supérieur au bruit de fond correspondant au signal obtenu en incubant de l'eau avec l'extrait (respectivement un signal de 7870 contre 494 U.A.). L'extrait de cellules HeLa S3 permet donc la traduction de transcrits luciférases. J'ai ensuite optimisé les conditions expérimentales afin d'augmenter l'efficacité de la réaction de traduction *in vitro*.

2.6.2 Mise au point de l'expérience de traduction *in vitro* :

Etant donné qu'un traitement micrococcal nucléase peut inhiber la traduction, notamment par dégradation des ARN ribosomiques, j'ai décidé de réitérer l'expérience en exposant l'extrait d'HeLa S3 à la même concentration de micrococcal nucléase mais pendant différents temps : 0 ; 5 ; 10 ; 20 et 30 min, et en utilisant 48,2 nM d'un transcrit *Renilla* luciférase présentant une coiffe en 5' et une queue poly(A), ou de l'eau comme contrôle. Le graphique obtenu grâce aux données de cette expérience est présenté en Figure R28.

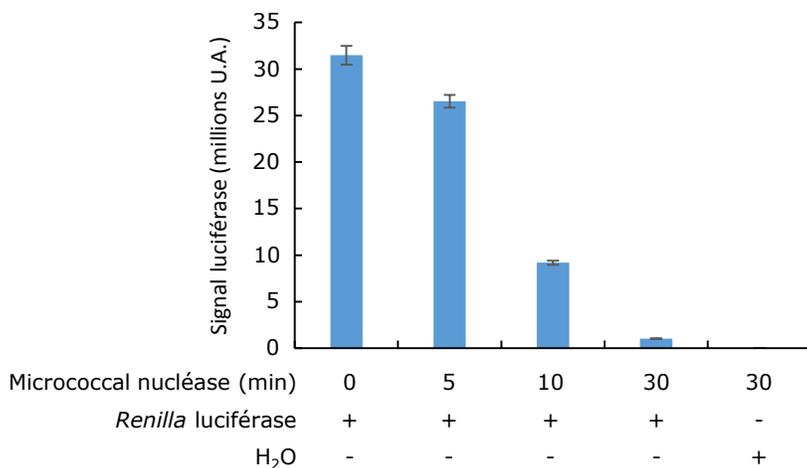


Figure R28 : Mise au point de la durée optimale de traitement micrococcal nucléase pour l'essai de traduction *in vitro*.

Activité luciférase après incubation d'eau ou 48,2 nM de transcrite *Renilla* luciférase polyadénylé et présentant une coiffe en 5' en présence de 0,005 KU/ μ l micrococcal nucléase à 30°C pendant les temps indiqués. Activité luciférase mesurée après addition de 50 μ l de *Renilla Luciferase Assay Reagent*. Moyenne sur trois mesures issues de la même réaction.

On constate que le signal le plus fort est obtenu au temps 0 min du traitement micrococcal nucléase, avec une valeur d'environ 31,5 millions U.A., et que l'intensité des signaux détectés décroît progressivement avec la durée de traitement à la micrococcal nucléase, pour atteindre une valeur de 1 million U.A. au bout de 30 min de traitement. Le traitement micrococcal nucléase précédant l'expérience de traduction *in vitro* a donc été abandonné dans les expériences suivantes.

J'ai voulu ensuite déterminer la quantité optimale de transcrits Firefly et *Renilla* à utiliser dans les essais de traduction *in vitro* réalisés avec l'extrait de cellules HeLa S3 et déterminer les gammes de concentrations pour lesquelles il y avait une augmentation linéaire de l'activité luciférase. Pour cela, j'ai incubé séparément 5,3 nM, 16 nM, 48 nM ou 144 nM de transcrits *Renilla* ou Firefly dans l'extrait HeLa S3 pendant 2h à 30°C puis les activités luciférases Firefly et *Renilla* ont été mesurées à l'aide du kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*. Pour le transcrite *Renilla*, on constate que l'augmentation de l'activité luciférase en fonction de la concentration du transcrite n'est pas linéaire pour les concentrations testées (Figure R29a)). Par contre, l'activité luciférase obtenue avec le transcrite Firefly montre une progression linéaire en fonction de la concentration du transcrite, avec un coefficient de détermination R^2 d'une valeur de 0,998 (Figure R29b)).

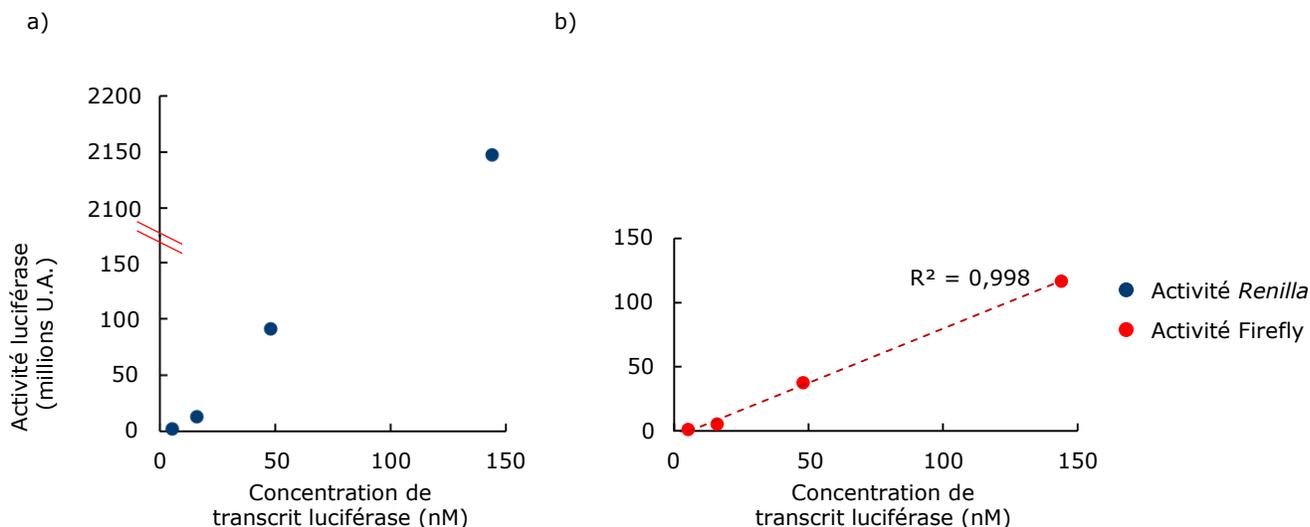


Figure R29 : Mesure de l'activité luciférase en fonction de la concentration de transcrit luciférase.

Activité luciférase après incubation de 5,3 nM, 16 nM, 48 nM ou 144 nM de transcrit (a) *Renilla* ou (b) Firefly coiffé et polyadénylé en présence d'extrait d'HeLa S3 pendant 2h à 30°C. Les activités *Renilla* et Firefly ont été mesurées à l'aide du kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*. Le coefficient de détermination R^2 correspondant à la courbe obtenue après régression linéaire pour l'activité Firefly est annoté. Moyenne sur trois mesures issues de la même réaction.

J'ai donc testé la possibilité d'utiliser le transcrit *Renilla* à une concentration constante dans le but de normaliser les essais et le transcrit Firefly comme rapporteur principal en incubant 3,6 nM, 7,1 nM, 14,3 nM ou 28,6 nM de transcrit Firefly en présence de 3,6 nM ou de 7,1 nM de transcrit *Renilla*. Les activités luciférases ont été mesurées à l'aide du kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*. Le résultat est présenté en Figure R30. Pour la luciférase Firefly, on constate que l'activité luciférase en fonction de la concentration du transcrit Firefly suit une progression très proche d'une progression linéaire pour les deux concentrations de transcrit *Renilla* testées (coefficients de détermination R^2 de valeurs 0,9748 et 0,9709). Cependant, le signal engendré par le transcrit *Renilla* augmente parallèlement à l'augmentation de la concentration du transcrit Firefly bien que la concentration du transcrit *Renilla* soit identique dans tous les échantillons. Il n'est donc pas possible d'utiliser le transcrit *Renilla* pour normaliser les essais. Pour pallier ce problème, les expériences de traduction effectuées avec seulement un seul transcrit luciférase ont été réalisées en triplicata.

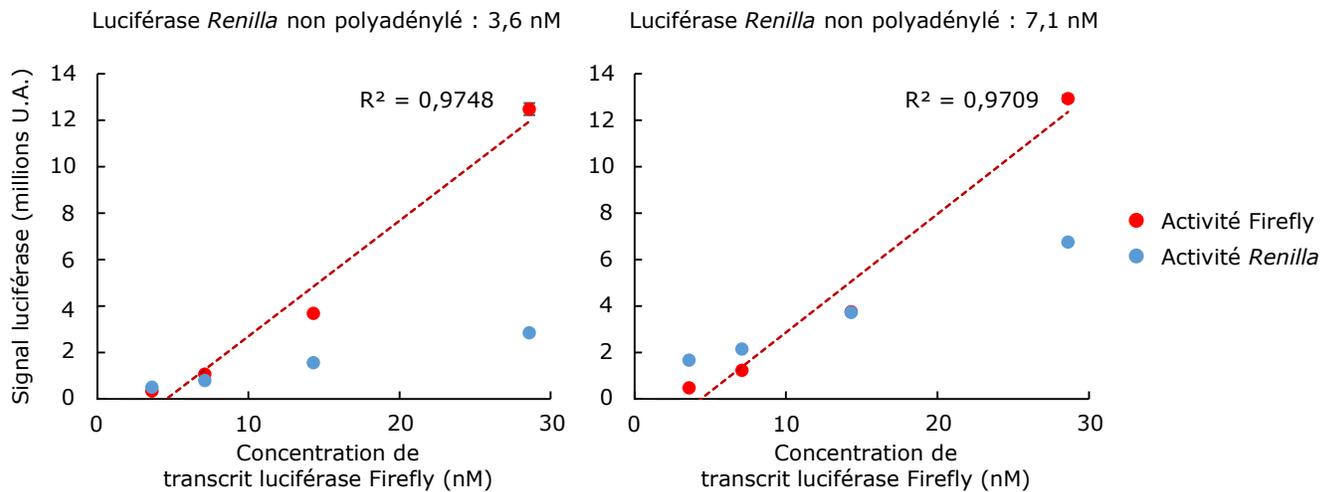


Figure R30 : Mesure de l'activité luciférase en fonction de la concentration de transcrit Firefly.

Activité luciférase après incubation dans un extrait d'HeLa S3 de 3,6 nM, 7,1 nM, 14,3 nM ou 28,6 nM de transcrit Firefly coiffé et polyadénylé en présence de 3,6 nM ou 7,1 nM de transcrit *Renilla* coiffé et non polyadénylé, pendant 2h à 30°C. Les activités *Renilla* et Firefly ont été mesurées à l'aide du kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*. Les coefficients de détermination R^2 correspondant aux courbes obtenues après régression linéaire pour l'activité Firefly sont annotés. Moyenne sur trois mesures issues de la même réaction.

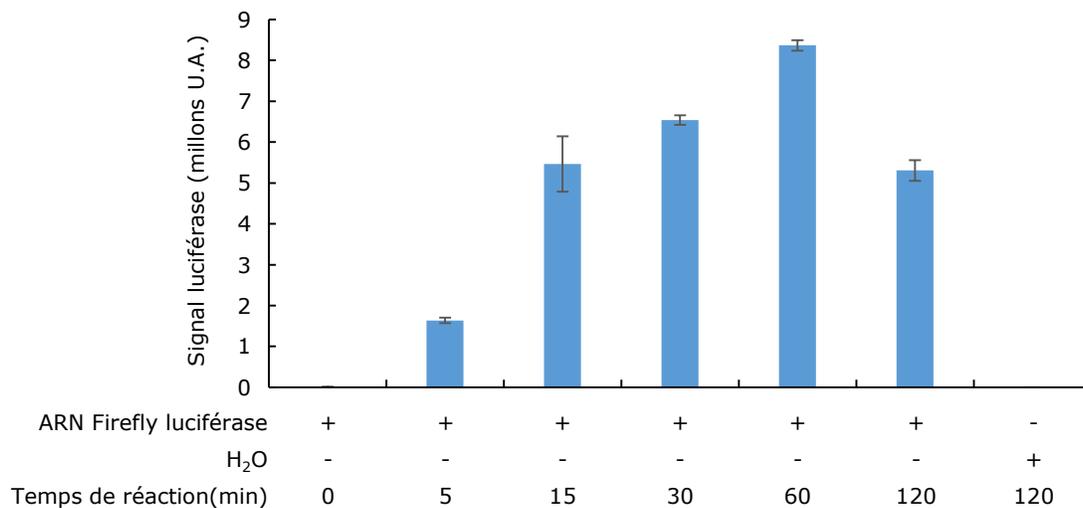


Figure R31 : Mise au point de la durée optimale de réaction pour l'essai de traduction *in vitro*.

Activité Firefly luciférase après incubation d'eau ou de 21,4 nM de transcrit Firefly luciférase polyadénylé et coiffé en 5' à 30°C dans un extrait d'HeLa S3 en fonction du temps. L'activité luciférase Firefly a été mesurée après ajout du réactif *Luciferase Assay Reagent II* provenant du kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*. Moyenne sur trois réactions.

J'ai ensuite voulu connaître la durée optimale de réaction pour une réaction de traduction *in vitro* en utilisant l'extrait de cellules HeLa S3. Pour cela j'ai incubé 21,4 nM de transcrit Firefly luciférase polyadénylé et présentant une coiffe en 5', ou de l'eau en contrôle, avec l'extrait de cellules HeLa S3 pendant 0 ; 5 ; 15 ; 30 ; 60 ou 120 min. L'activité Firefly a été mesurée après ajout du réactif *Luciferase Assay Reagent II* provenant du kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*. On constate que l'intensité du signal luciférase augmente en fonction du temps de réaction jusqu'à atteindre une valeur maximale au bout de 60 min d'incubation, puis l'intensité du signal luciférase diminue (Figure R31). Le temps d'incubation de 60 min a donc été choisi pour les expériences ultérieures de traduction *in vitro*.

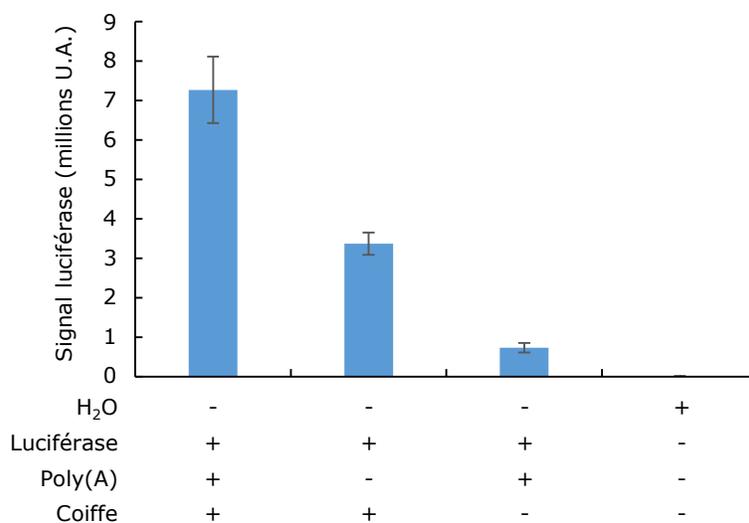


Figure R32 : Évaluation de l'impact de la queue poly(A) et de la coiffe en 5' sur la traduction *in vitro* d'un transcrit luciférase dans un extrait de cellules HeLa S3.

Activité luciférase après incubation d'eau ou de 21,4 nM de transcrit Firefly luciférase polyadénylé ou non et présentant ou non une coiffe en 5' pendant 2h à 30°C en présence d'extrait de cellules HeLa S3. L'activité Firefly a été mesurée après ajout du réactif *Luciferase Assay Reagent II* provenant du kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*. Moyenne sur trois réactions.

En parallèle, j'ai voulu évaluer l'impact de la présence de la coiffe ou de la queue poly(A) sur la traduction du transcrit Firefly luciférase dans un extrait d'HeLa S3. Pour ce faire j'ai incubé un transcrit Firefly luciférase présentant ou non une queue poly(A) et/ou une coiffe en 5' à une température de 30°C pendant 2h en présence de l'extrait de cellules HeLa S3. L'activité Firefly a été mesurée après ajout du réactif *Luciferase Assay Reagent II* provenant du kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*. Le graphique regroupant les données obtenues est présenté en Figure R32.

On constate un fort signal luciférase dans le cas d'un transcrit Firefly présentant à la fois une coiffe en 5' et une extension polyadénylée, avec une valeur de signal d'environ 7,3 millions U.A.. On constate également que le signal luciférase obtenu est plus faible pour un transcrit ne présentant qu'une coiffe en 5', avec une valeur d'environ 3,4 millions U.A.. Par ailleurs, on constate une nette diminution du signal luciférase lorsque le transcrit Firefly est uniquement polyadénylé, avec une valeur de signal d'environ 730 000 U.A. soit environ 10 fois moins que pour un substrat présentant à la fois une coiffe en 5' et une extension polyadénylée. Toutefois, on ne peut pas exclure que le faible signal obtenu pour un transcrit ne présentant pas de coiffe en 5' ne soit pas dû à une dégradation du substrat par des exonucléases de l'extrait lors de la réaction de traduction.

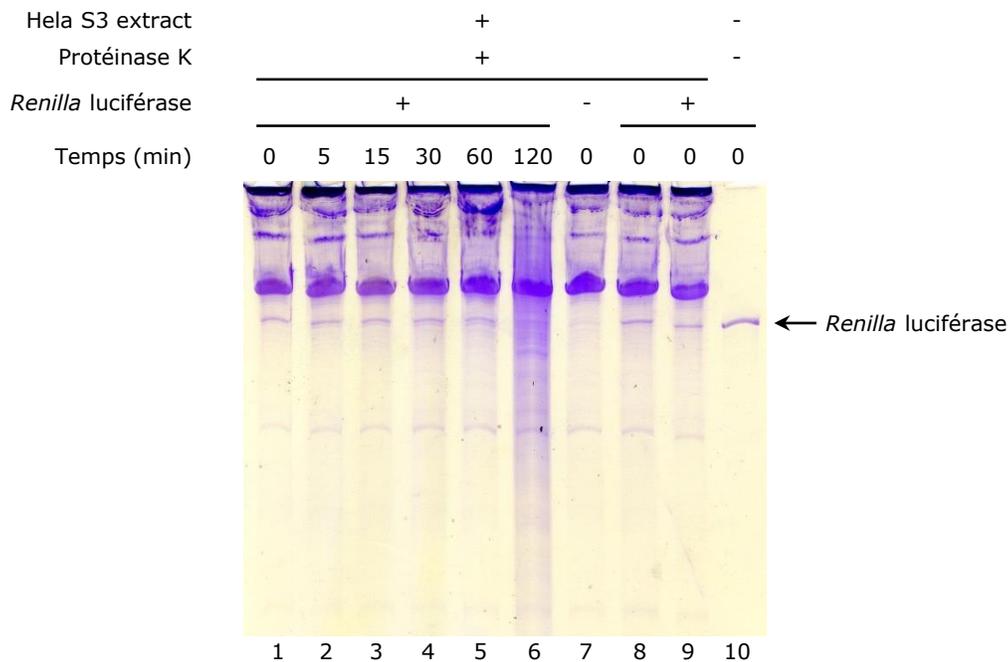


Figure R33 : Stabilité du transcrit *Renilla* luciférase dans un extrait de cellules HeLa S3.
 Produits de dégradation obtenus après incubation de 38,3 nM de transcrit *Renilla* polyadénylé et coiffé en 5' incubé durant les temps indiqués avec l'extrait d'HeLa S3 à 30°C puis traité avec 0,30 µg/µl de protéinase K pendant 10 min à 37°C. L'extrait cellulaire a été complété avec de l'eau puis directement traité à la protéinase K comme les autres échantillons (puits 7) afin de visualiser la composition en ARN de l'extrait traité à la protéinase K comme contrôle négatif. 38,3 nM de transcrit *Renilla* polyadénylé et coiffé en 5' ont été ajoutés à l'extrait soit après (puits 8) soit avant (puits 9) le traitement protéinase K pour tester l'influence de ce dernier sur la stabilité du transcrit. Les échantillons ont ensuite été purifiés par extraction au Phénol: Chloroforme: alcool Isoamylique puis précipitation à l'éthanol. 38,3 nM de transcrit *Renilla* polyadénylé non traité et présentant une coiffe en 5' ont été utilisés comme contrôle d'identification (puits 10). Les produits réactionnels ont été fractionnés sur gel d'acrylamide dénaturant 4% et révélés après 10 min d'incubation sous agitation avec du réactif *Stains-All*.

J'ai donc voulu vérifier si mes transcrits luciférase étaient stables en présence de l'extrait HeLa S3. Le transcrit Firefly n'a pas été utilisé puisque, étant donné sa taille d'environ 1,9 kb, il co-

migrerait avec l'ARN ribosomique 18S présent dans l'extrait. Pour réaliser l'expérience j'ai donc incubé 38,3 nM de transcrit *Renilla* luciférase, d'une taille de 1,2 kb, polyadénylé et présentant une coiffé en 5' pendant une durée de 0 ; 5 ; 15 ; 30 ; 60 ou 120 min à 30°C dans l'extrait des cellules HeLa S3. Les échantillons ont ensuite été traités avec 0,3 µg/µl de protéinase K afin de débarrasser les échantillons des protéines présentes dans l'extrait et pouvant gêner la migration des ARN sur un gel d'acrylamide. Les échantillons ont ensuite été mis à migrer sur un gel acrylamide dénaturant 4%, qui est ensuite révélé avec le réactif *Stains-All*. Le gel obtenu est présenté en Figure R33.

On constate que le transcrit luciférase est détecté pour tous les temps d'incubation (puits 1 à 5), hormis le temps 120 min. La migration altérée de l'échantillon correspondant au temps 120 min est vraisemblablement dû à un excès lipidique ou à la formation d'agrégats lors de la réaction (puits 6). Aucune dégradation significative n'est constatée lors de la réaction, en comparaison des contrôles où l'ARN a été ajouté à l'échantillon après ou avant traitement protéinase K suivi d'une dénaturation immédiate (comparer puits 1 à 5 aux puits 8 et 9, respectivement).

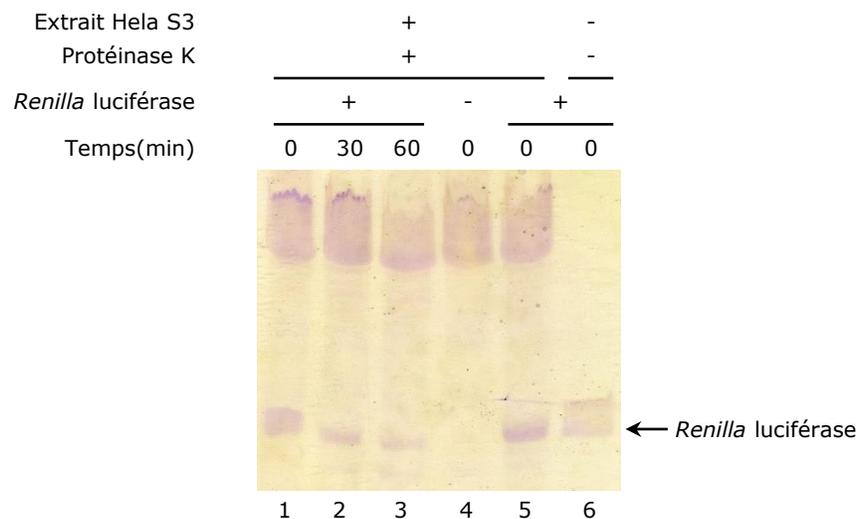


Figure R34 : Stabilité du transcrit *Renilla* luciférase ne possédant pas de coiffe en 5' dans un extrait de cellules HeLa S3.

Produits de dégradation purifiés obtenus après incubation de 153,3 nM de transcrit *Renilla* polyadénylé mais sans coiffe en 5' à 30°C pendant les temps indiqués en présence de l'extrait d'HeLa S3 et traitement avec 0,30 µg/µl de protéinase K pendant 10 min à 37°C. Les échantillons ont ensuite été purifiés par extraction au Phénol:Chloroforme:alcool Isoamylique puis précipitation à l'éthanol. 153,3 nM d'un transcrit polyadénylé non traité (puits 6) a été analysé comme contrôle d'identification. Produits réactionnels fractionnés sur gel d'acrylamide dénaturant 4% et révélés après 10 min d'incubation sous agitation avec du réactif *Stains-All*.

Je me suis ensuite demandé si un transcrit ne possédant pas de coiffe en 5' pouvait être dégradé dans l'extrait d'HeLa S3. J'ai donc incubé 153,3 nM d'un transcrit *Renilla* luciférase polyadénylé

mais ne présentant pas de coiffe en 5' en présence de l'extrait cellulaire d'HeLa S3 pendant 0 ; 30 ou 60 min à 30°C. De l'eau a été incubée avec l'extrait comme contrôle négatif. Les échantillons ont ensuite été traités ou non pendant 10 min à 37°C avec 0,30 µg/µl de protéinase K puis purifiés par extraction au PCI puis précipités à l'éthanol. Après dénaturation, les échantillons ainsi que des transcrits *Renilla* luciférase non traités ont été migrés sur gel d'acrylamide dénaturant 4%, avant marquage du gel avec le réactif *Stains-All*. Le gel obtenu est présenté en Figure R34.

On constate que le signal correspondant au transcrit *Renilla* luciférase polyadénylé diminue au fur et à mesure de la réaction en comparaison du contrôle pour lequel le transcrit a été mis en contact de l'extrait juste avant dénaturation de l'échantillon (comparer les puits 1 à 3 au puits 5). On constate donc qu'un transcrit ne présentant pas de coiffe en 5' est progressivement dégradé en présence de l'extrait d'HeLa S3. Il n'est donc pas possible de conclure sur le caractère coiffe-dépendant de la traduction obtenue avec cet extrait.

2.6.3 Impact de BTG2 sur la stabilité et la traduction d'un transcrit luciférase en présence de l'extrait cytoplasmique de cellules HeLa :

Avant d'effectuer l'essai de traduction *in vitro* en présence de BTG2(APRO), j'ai voulu savoir si un transcrit *Renilla* luciférase possédant une coiffe en 5' et une queue poly(A) serait dégradé en présence de l'extrait d'HeLa S3, de BTG2(APRO) ainsi que de PABPC1(1-190). Pour ce faire j'ai mis ou non 32,2 nM de *Renilla* luciférase polyadénylé et coiffé en 5' en présence ou non de 772 nM de BTG2(APRO) et de 129 nM de PABPC1(1-190).

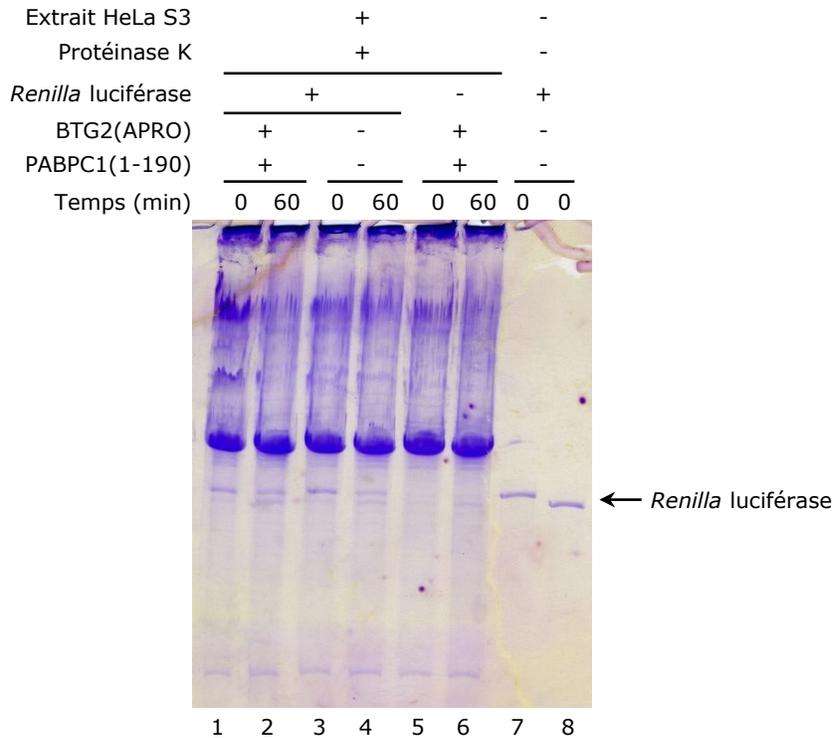


Figure R35 : Stabilité du transcrit *Renilla* luciférase dans un extrait de cellules HeLa S3 en présence de BTG2(APRO) et PABPC1(1-190).

Produits de dégradation obtenus après incubation de 32,2 nM de transcrit *Renilla* à 30°C pendant les temps indiqués en présence de l'extrait d'HeLa S3 complété ou non avec 772 nM BTG2(APRO) et 129 nM PABPC1(1-190) puis traitement avec 0,30 µg/µl de protéinase K pendant 10 min à 37°C. Les échantillons ont ensuite été purifiés par extraction au Phénol:Chloroforme:alcool Isoamylique puis précipitation à l'éthanol. Les transcrits *Renilla* luciférase purifiés polyadénylés (puits 7) ou non (puits 8) ont été fractionnés avec les produits réactionnels après dénaturation sur gel d'acrylamide dénaturant 4% et révélés après 10 min d'incubation sous agitation avec du réactif *Stains-All*. L'apparition d'un fragment d'une taille comparable au transcrit *Renilla* non polyadénylé est inhérente à l'utilisation de l'extrait (voir puits 5 et 6) et donc indépendante de la présence de BTG2(APRO) et de PABPC1(1-190), ce qui ne laisse pas penser que le transcrit puisse être désadénylé à cause de ces deux protéines.

Les différentes réactions ont été incubées pendant 0 ou 60 min à 30°C avec l'extrait d'HeLa S3, puis les échantillons ont été traités avec 0,30 µg/µl de protéinase K à 37°C pendant 10 min. Les échantillons ont ensuite été purifiés par extraction au PCI puis précipitation à l'éthanol. Après dénaturation, les échantillons, ainsi que 32,2 nM de transcrits *Renilla* polyadénylés ou non et présentant une coiffe en 5', ont été mis à migrer sur gel d'acrylamide 4%. Le gel a ensuite été marqué au *Stains-All* (Figure R35).

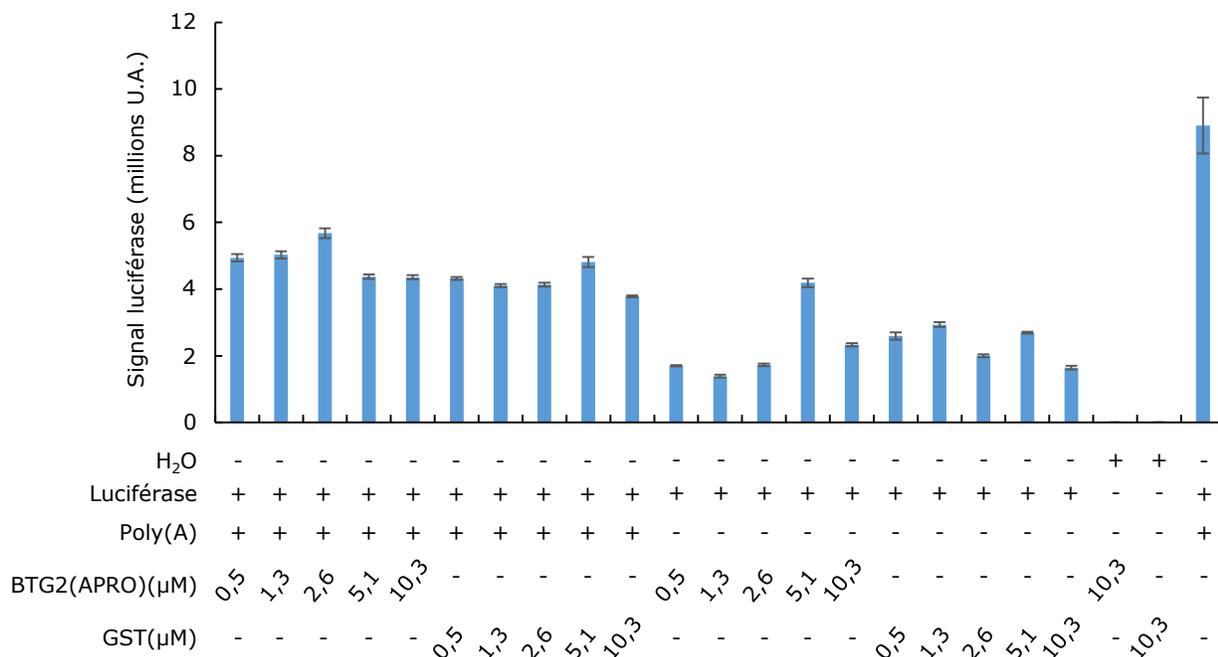


Figure R36 : Impact de BTG2(APRO) sur la traduction *in vitro* d'un transcrite Firefly luciférase. Activité luciférase après incubation de différentes concentrations de BTG2(APRO) ou de GST, comme indiqué, en présence de 21,4 nM de transcrite Firefly coiffé et polyadénylé, ou d'H₂O en contrôle, pendant 1h à 30°C en présence d'extrait de cellules HeLa S3. L'activité Firefly a été mesurée après ajout du réactif *Luciferase Assay Reagent* provenant du kit *Luciferase Assay System*. Moyenne sur trois réactions. La forte intensité de signal du contrôle positif présentant uniquement un transcrite Firefly luciférase polyadénylé s'explique par un rapport transcrite/extrait plus important que pour les autres échantillons en raison d'une erreur de manipulation, engendrant une traduction plus intense du transcrite.

On détecte le transcrite *Renilla* polyadénylé et présentant une coiffe en 5' dans tous les échantillons auxquels il a été ajouté (comparer puits 1 à 4 au puits 5 et 6) et aucune différence n'est visible après ajout des protéines BTG2(APRO) et PABPC1(1-190). Étant donné qu'un transcrite luciférase semble stable en présence de BTG2(APRO) et de PABPC1(1-190) dans l'extrait de cellules HeLa S3, j'ai mené un essai de traduction *in vitro* afin d'évaluer l'impact de BTG2(APRO) sur la traduction d'un transcrite Firefly luciférase. Pour ce faire, j'ai incubé 21,4 nM de transcrite polyadénylé ou non, et présentant une coiffe en 5', en présence de 0,5 μ M, 1,3 μ M, 2,6 μ M, 5,1 μ M ou 10,3 μ M de BTG2(APRO) ou de GST, pendant 1h à 30°C. En guise de contrôle négatif, de l'eau a été incubée avec 10,3 μ M de BTG2(APRO) ou de GST en présence de l'extrait pendant 1h à 30°C. Comme contrôle positif, 21,4 nM de transcrite Firefly luciférase a été incubé uniquement en présence de l'extrait pendant 1h à 30°C. L'activité Firefly a été mesurée après ajout du réactif *Luciferase Assay Reagent* provenant du kit *Luciferase Assay System*. Pour un substrat non polyadénylé, on ne constate pas de différences dans l'activité luciférase entre des échantillons

complémentés avec des concentrations croissantes de BTG2(APRO) ou de GST (Figure R36). On ne constate pas de même d'effet flagrant de l'addition de BTG2(APRO) sur l'intensité du signal luciférase dans le cas d'un transcrit luciférase polyadénylé, en comparaison d'échantillons incubés avec une concentration croissante de GST. Étant donné l'excès de BTG2(APRO) ou de GST ajouté aux réactions, j'ai voulu vérifier que l'absence d'effet de BTG2 sur la traduction dans les conditions de l'expérience n'était pas due à l'ajout d'une quantité trop importante de protéines aux réactions de traduction.

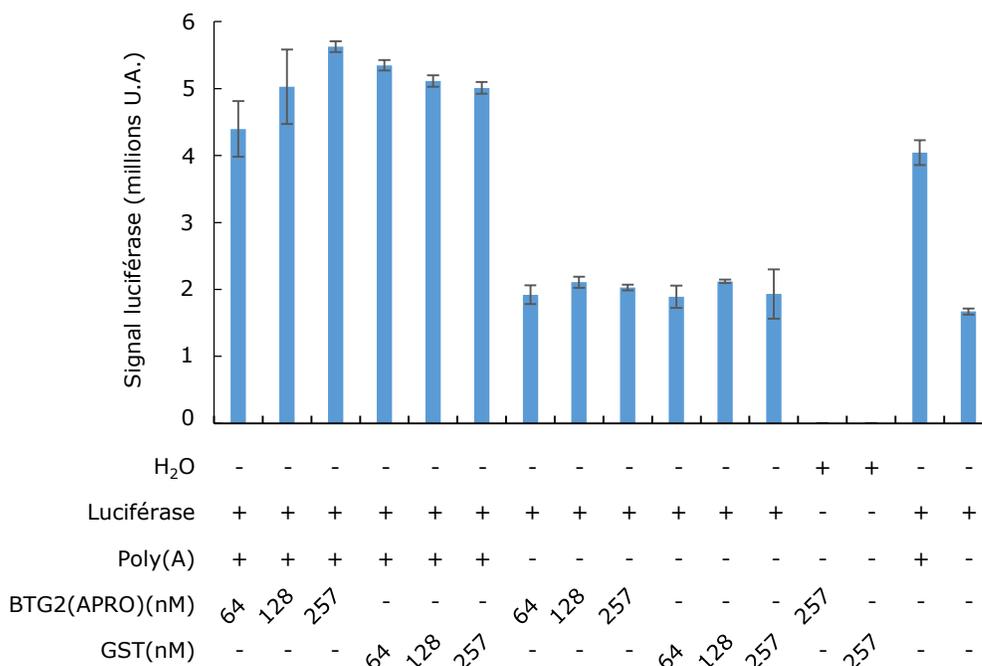


Figure R37 : Impact de BTG2(APRO) sur la traduction *in vitro* d'un transcrit Firefly luciférase. Activité luciférase après incubation de différentes concentrations de BTG2(APRO) ou de GST, comme indiqué, en présence de 21,4 nM de transcrit Firefly coiffé et polyadénylé, ou d'H₂O en contrôle, pendant 1h à 30°C en présence d'extrait de cellules HeLa S3. L'activité luciférase Firefly a été mesurée après ajout du réactif *Luciferase Assay Reagent* provenant du kit *Luciferase Assay System*. Moyenne sur trois réactions.

L'expérience a donc été répétée avec des concentrations plus faibles de BTG2(APRO) et de GST. Dans l'extrait d'HeLa S3, 21,4 nM de transcrit polyadénylé ou non et présentant une coiffe en 5' ont été mis en présence de 64 nM, 128 nM ou 257 nM de BTG2(APRO) ou de GST, puis ont été incubés pendant 1h à 30°C. L'activité Firefly a été mesurée après ajout du réactif *Luciferase Assay Reagent* provenant du kit *Luciferase Assay System*. Pour un transcrit non polyadénylé, on ne constate pas de différence significative des signaux luciférase en présence des différentes concentrations de GST ou de BTG2(APRO) en comparaison du contrôle où le transcrit est incubé

uniquement avec l'extrait (Figure R37). Pour un transcrit polyadénylé, une légère augmentation des signaux luciférase est observée après addition de GST, ou de BTG2(APRO), par rapport au contrôle présentant uniquement le transcrit polyadénylé et l'extrait. Cependant, aucune différence significative n'est remarquée entre une incubation avec GST et une incubation avec BTG2(APRO).

Ainsi, je n'ai pas pu observer d'effets inhibiteurs ou activateurs spécifiques de BTG2 sur la traduction avec les essais de traduction *in vitro* réalisés durant le temps imparti de cette thèse. Concernant ces essais, il faudrait vérifier si l'inhibition de la traduction d'un rapporteur est possible dans les conditions expérimentales utilisées. Pour ce faire, on pourrait rajouter un excès de coiffe, et constater une diminution ou non de l'activité d'un rapporteur luciférase.

2.7 BTG3 et BTG4 ont-elles un impact sur l'activité désadénylase de CAF1 ?

Etant donné que des séquences spécifiques des protéines BTG/Tob, à savoir boxC pour BTG2 et les motifs PAM2 pour Tob1 et Tob2, permettent à ces protéines d'interagir avec PABPC1 et sont impliquées dans l'activation de la désadénylation, j'ai voulu savoir si les protéines BTG3 et BTG4 possèdent des régions similaires. Pour ce faire, j'ai procédé d'une part à un alignement des séquences des domaines APRO de toutes les protéines de la famille BTG/Tob et d'autre part à l'alignement des parties C-terminales des protéines BTG3, BTG4, Tob1 et Tob2 présentes dans différentes espèces. Les alignements sont présentés en Figure R38.

Comme on peut le constater à l'aide des deux alignements, les protéines BTG3 et BTG4 ne présentent pas de façon évidente de région boxC ou des motifs PAM2. J'ai donc voulu vérifier si BTG3 et BTG4 était impliquées dans la désadénylation des ARNm.

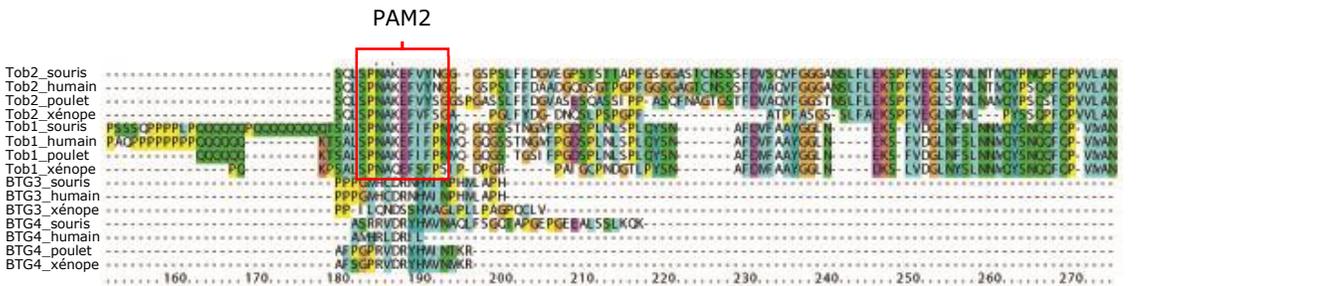
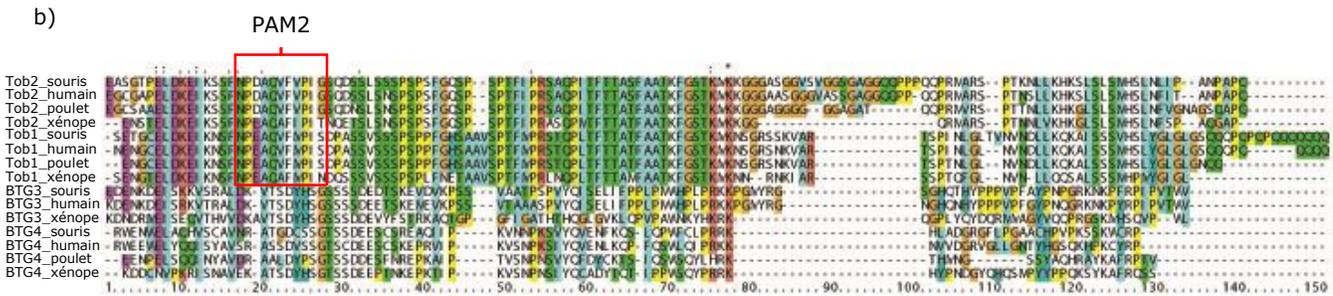
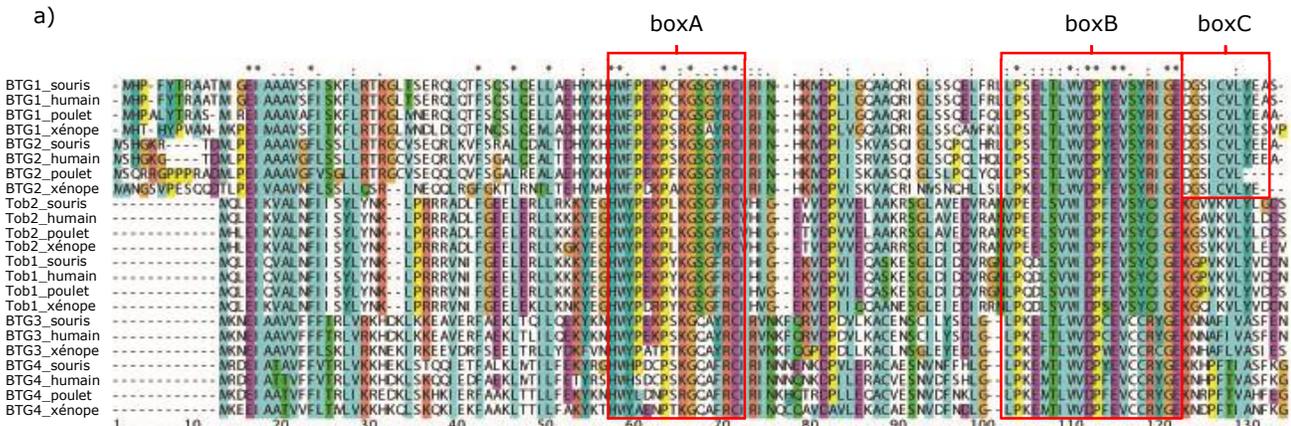


Figure R38 : Alignements des domaines APRO et des parties C-terminales des membres de la famille BTG/Tob.
 (a) Les domaines APRO de toutes les protéines de la famille BTG/Tob ou (b) les parties C-terminales des protéines BTG3, BTG4, Tob1 ou Tob2 provenant de différentes espèces ont été alignés afin de vérifier la présence de région boxA, boxB et boxC et de motifs PAM2 au sein des protéines BTG3 et BTG4. Les régions boxA, boxB et boxC ainsi que les motifs PAM2 sont encadrés et annotés. Les séquences suivantes ont été utilisées : BTG1: humain (Swissprot:P62324), souris (Swissprot:P62325), poulet (Swissprot:P34743), xénope (Trembl:Q9PVQ0) ; BTG2: humain (Swissprot:P78543), souris (Swissprot:Q04211), poulet (Trembl:R4GJS1), xénope (Trembl:Q640A4) ; BTG3: humain (Swissprot:Q14201), souris (Swissprot:P50615), xénope (Trembl:Q0VFP9) ; BTG4: humain (Swissprot:Q9NY30), souris (Swissprot:O70552), poulet (Trembl:E1C802), xénope (Trembl:Q28GL0) ; Tob1: humain (Swissprot:P50616), souris (Swissprot:Q61471), poulet (Trembl:Q90VW0), xénope (Trembl:Q28192) et Tob2: humain (Swissprot:Q14106), souris (Swissprot:Q9JM55), poulet (Trembl:Q5F453), xénope (Trembl:A41IU0).

2.7.1 Clonage de BTG3 et BTG4 :

Il existe deux variants de BTG3 exprimés de manière endogène et ayant pu être détectés : le plus exprimé que l'on nommera variant 1 (V1) possède 252 acides aminés (référence NCBI : NM_006806.4), tandis que le deuxième variant (V2) d'une taille de 296 acides aminés présente

une insertion de 44 acides aminés à partir de l'acide aminé 104 situé dans le domaine APRO (référence GenBank : BC011957.1). J'ai choisi de tester l'impact de ces deux variants sur la désadénylation, en supposant que l'insertion présentée par BTG3(V2) au niveau du domaine APRO puisse avoir une influence sur ce phénomène, s'il existe. Les structures des variants de BTG3 ainsi que de BTG4 (référence GenBank : BC031045) sont schématisées en Figure R39.

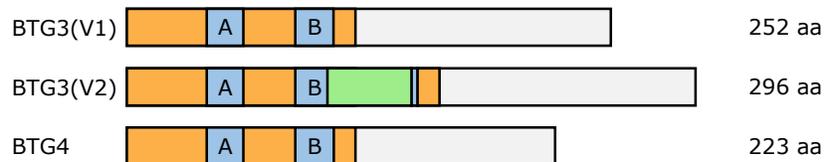


Figure R39 : Représentation schématique des protéines BTG3 et BTG4. Les protéines BTG3(V1) (*NCBI Reference Sequence* : NM_006806.4), BTG3(V2) (*GenBank* : BC011957.1) et BTG4 (*GenBank* : BC031045) sont présentées à l'échelle. Le domaine APRO est représenté en orange. Les motifs conservés boxA (A) et boxB (B), signatures de la famille BTG/TOB, sont indiqués et représentés en bleu. L'insertion de 44 acides aminés présente à partir de l'acide aminé 104 dans le domaine APRO de BTG3(V2) est représentée en vert. Les tailles en acides aminés (aa) de chaque protéine sont annotées à côté de ces dernières.

Des vecteurs exprimant des protéines de fusion possédant une étiquette HA en C-terminal ou un couplage avec la GFP en N-terminal ont été obtenus. J'ai voulu vérifier l'expression de ces constructions avant de conduire des expériences de RACE-PAT.

2.7.2 Optimisation de l'expression des protéines de fusion dans des cellules HEK293 Tet-Off :

Pour cela, j'ai transfecté des cellules HEK293 *Tet-Off* avec des plasmides exprimant soit des protéines BTG, étiquetées HA ou fusionnées à la GFP, soit la GFP seule. Les *western blot* correspondants sont présentés en Figure R40.

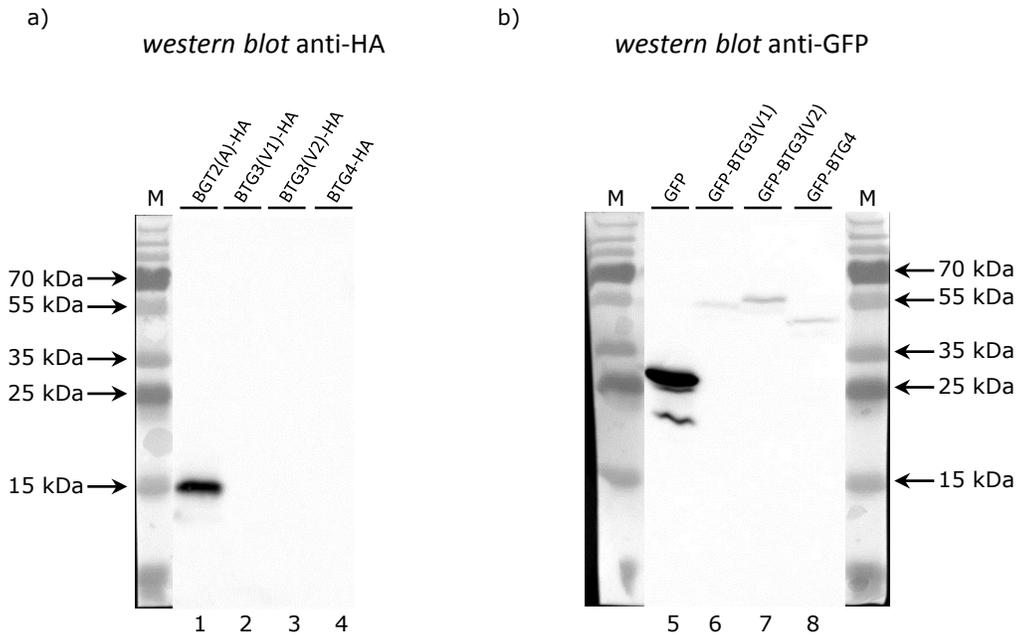
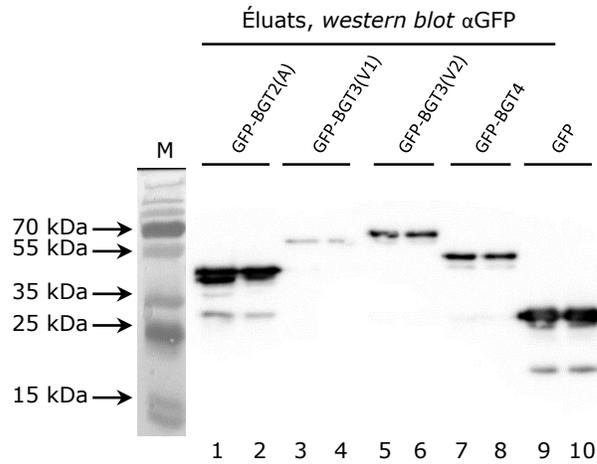


Figure R40 : Vérification de l'expression des constructions BTG3 et BTG4 marquées GFP ou HA.

Des cellules HEK293 *Tet-Off* ont été transfectées en duplicata avec (a) 2,4 µg d'un plasmide exprimant les protéines BTG étiquetées HA en N-terminal ou (b) la protéine GFP seule ou les protéines BTG fusionnées à la GFP en N-terminal comme indiqué. La présence de protéines d'intérêt a été observée par *western blot* soit après révélation avec un anticorps anti-HA soit après révélation avec un anticorps anti-GFP.

On constate que les variants de BTG3 ainsi que la protéine BTG4 étiquetées HA ne sont pas détectés, contrairement au domaine APRO de BTG2 (Figure R40a), BTG2(A)-HA). Par contre, les protéines de fusion GFP-BTG3 et GFP-BTG4 sont détectées, mais beaucoup plus faiblement que la GFP seule (Figure R40b)). J'ai ensuite voulu vérifier si ces protéines de fusion GFP étaient fonctionnelles. Pour ce faire j'ai testé si ces protéines étaient bien capables de lier CNOT7, un des paralogues humains de CAF1. Après transfection de cellules HEK293 *Tet-Off* avec des plasmides exprimant les protéines de fusion GFP-BTG2(A), GFP-BTG3 et GFP-BTG4, j'ai réalisé une immunoprécipitation avec des billes GFP-Trap (voir Matériel et Méthodes). Les lysats cellulaires et les éluats correspondants ont été analysés par *western blot* (Figure R41). On constate que toutes les protéines de fusion BTG sont détectées dans les fractions d'éluion (Figure R41a)).

a)



b)

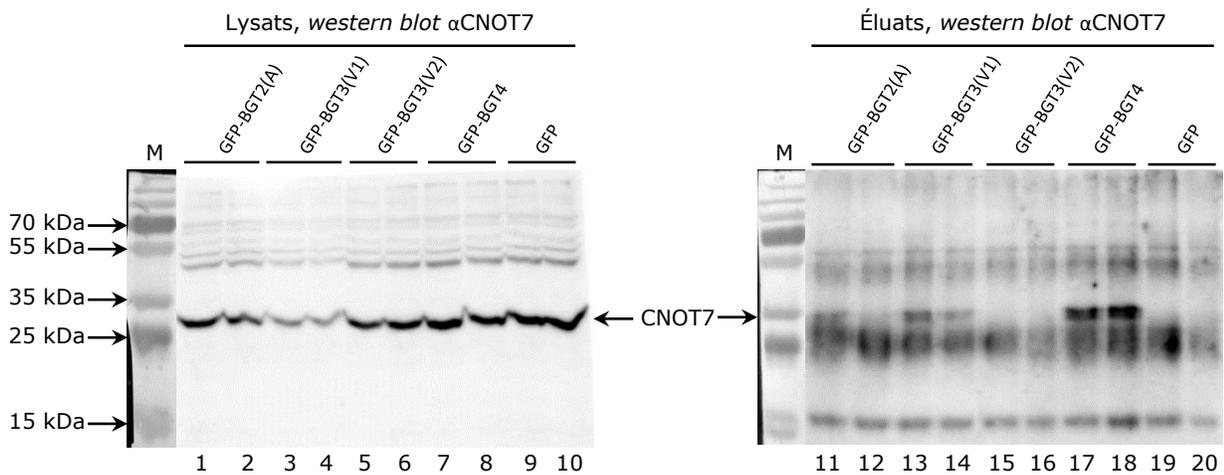


Figure R41 : Vérification de la liaison de BTG3 et BTG4 à CNOT7 endogène.

(a) Des cellules HEK293 *Tet-Off* ont été transfectées en duplicata avec 2 µg de plasmide exprimant GFP seule ou une protéine BTG de fusion marquée GFP en N-terminal : soit le domaine APRO de BTG2 (GFP-BTG2(A)), BTG3(V1) (GFP-BTG3(V1)), BTG3(V2) (GFP-BTG3(V2)) ou BTG4 (GFP-BTG4). Après précipitation avec des billes GFP-trap, la présence des protéines d'intérêt a été observée par *western blot* avec un anticorps anti-GFP. (b) La présence de protéines d'intérêt dans les lysats cellulaires a été observée par *western blot* après révélation anti-CNOT7 afin d'évaluer l'expression endogène de CNOT7 (puits 1 à 10). La présence de protéines d'intérêt dans les éluats a été observée par *western blot* après révélation avec un anticorps anti-CNOT7 afin de vérifier si les constructions BTG utilisées précipitent ou non la protéine CNOT7 endogène (puits 11 à 20).

De plus, on détecte CNOT7 dans tous les lysats cellulaires obtenus avec les cellules transfectées (Fig R41b) puits 1 à 10). Dans cette expérience, on constate que GFP-BTG2(A) co-précipite faiblement CNOT7, avec un signal presque indétectable pour l'un des deux réplicas (Figure R41b) puits 11 et 12) ; ce résultat est en désaccord avec les résultats obtenus au préalable (voir Figure R1)

et l'explication de cette différence n'est pas connue. Par ailleurs on constate que GFP-BTG3(V1) co-précipite CNOT7, mais pas GFP-BTG3(V2) (Figure R41b) comparer les puits 13-14 avec les puits 15-16, respectivement). Cela est très vraisemblablement dû à l'insertion de 44 acides aminés présente dans le domaine APRO de BTG3(V2) (au niveau de boxB) qui empêcherait l'interaction à CNOT7. On constate également que GFP-BTG4 co-précipite CNOT7, mais pas GFP ce qui confirme que les interactions constatées sont bien spécifiques des protéines BTG considérées (Figure R41b) comparer puits 17-18 et 19-20 respectivement).

Constatant que les protéines BTG3(V1) et BTG4 sont fonctionnelles par leur capacité à co-précipiter CNOT7, j'ai voulu mettre au point les conditions permettant une expression similaire de ces protéines et le domaine APRO de BTG2 avant de tester leur effet sur la désadénylation d'un rapporteur β -globine, étant donné que dans les expériences précédentes, GFP-BTG3(V1) et GFP-BTG4 étaient peu abondantes (Figure R40b). J'ai donc transfecté des cellules HEK293 *Tet-Off* avec des quantités croissantes des plasmides exprimant GFP-BTG3 et GFP-BTG4 et décroissantes du plasmide exprimant GFP-BTG2(A). Le *western blot* obtenu est présenté en Figure R42.

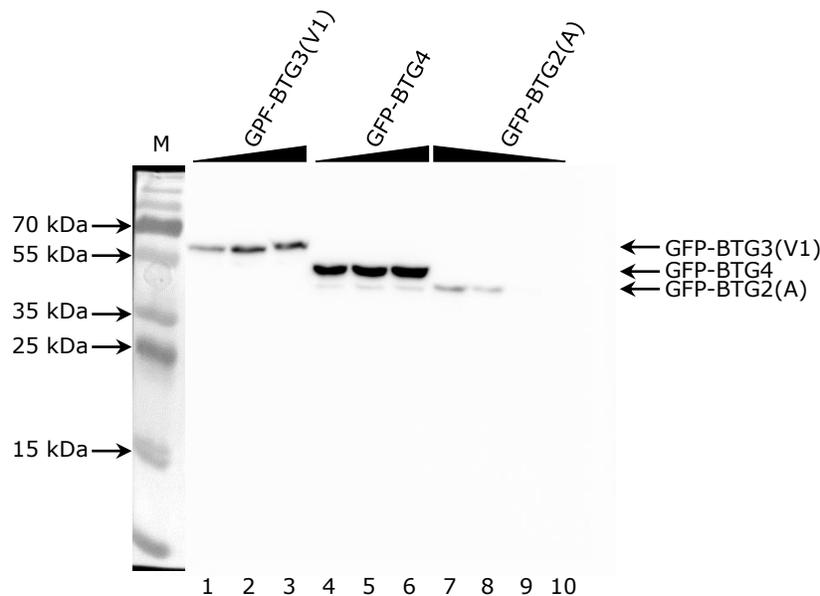


Figure R42 : Optimisation de l'expression de BTG2(A), BTG3 et BTG4 par transfection *in cellulo*.

Des cellules HEK293 *Tet-Off* ont été transfectées avec diverses quantités de plasmides exprimant le domaine APRO de BTG2 (BTG2(A)), BTG3(V1) et BTG4 couplées à la GFP en N-terminal. La gamme de concentration pour GFP-BTG3(V1) et GFP-BTG4 est de 0,8 ; 1,6 et 2,4 μ g, et de 0,2 ; 0,1 ; 0,05 et 0,025 μ g pour GFP-BTG2(A). La présence des protéines d'intérêt a été observée par *western blot* après révélation avec un anticorps anti-GFP.

On constate une légère augmentation de l'expression de GFP-BTG3(V1) et de GFP-BTG4 en fonction de la quantité de plasmide transfectée (puits 1-3 et 4-6, respectivement). Par contre, GFP-BTG2(APRO) n'est que faiblement détectable pour les quantités de plasmides utilisées (puits 7 et 8).

2.7.3 Évaluation de la capacité de BTG3 et BTG4 à induire la désadénylation d'un ARNm rapporteur par RACE-PAT :

En tenant compte de l'expérience précédente, des cellules HEK293 *Tet-Off* ont été transfectées avec une gamme croissante de quantités de plasmides exprimant GFP-BTG2(A) et avec une quantité fixe de plasmides exprimant soit GFP-BTG3 soit GFP-BTG4.

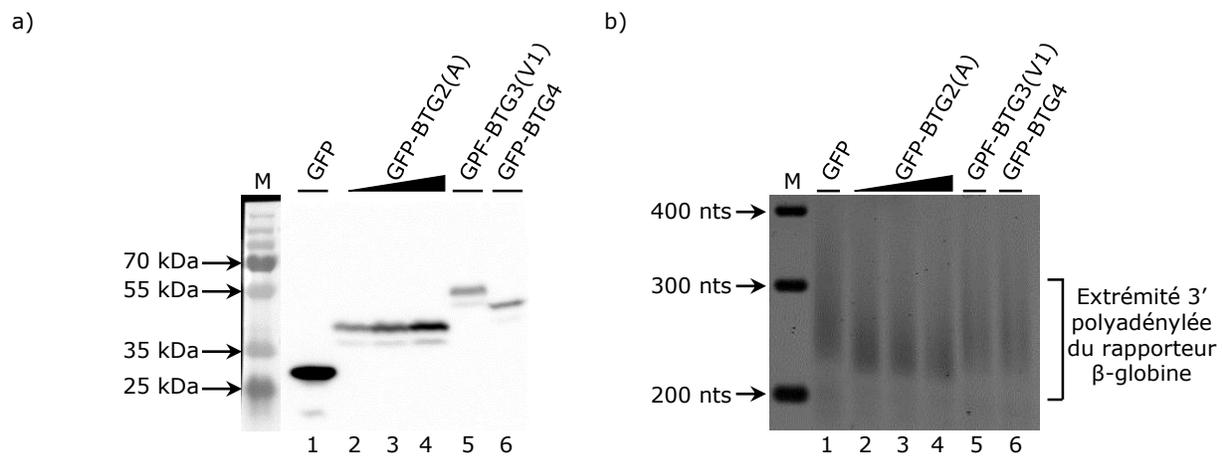


Figure R43 : Évaluation de la capacité de BTG3(V1) et BTG4 à affecter la désadénylation d'un rapporteur β -globine *in cellulo*.

(a) Des cellules HEK293 *Tet-Off* ont été co-transfectées avec un plasmide exprimant un rapporteur β -globine et diverses quantités de plasmides exprimant soit la GFP soit BTG2, BTG3 ou BTG4 couplées à la GFP en N-terminal et étiquetées HA en C-terminal pour BTG2. La gamme de plasmide transfecté pour GFP-BTG2(A) est de 0,2 ; 0,3 et 0,4 μ g, tandis que les cellules exprimant GFP ont été transfectées avec 0,2 μ g de plasmide et celles exprimant BTG3(V1) ou BTG4 avec 1,6 μ g de plasmides. La présence des protéines d'intérêt a été observée par *western blot* après révélation avec un anticorps anti-GFP. Composition protéique représentative de deux réactions de transfection. (b) RT-PCR des queues poly(A) du transcrit rapporteur β -globine provenant des lysats cellulaires de l'expérience (a). Des fragments comprenant environ 200 nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARNm du transcrit β -globine ainsi que la queue poly(A) ont été amplifiés par RACE-PAT puis migrés sur gel d'agarose 3%. Les tailles moyennes des fragments (en nucléotides) sont d'environ 240 pour GFP, 232, 227 et 224 pour GFP-BTG2(A) (puits 2, 3 et 4 respectivement), 248 pour GFP-BTG3(V1) et 242 pour GFP-BTG4. Produits d'amplification représentatifs de deux réactions de transfection.

Sur le *western blot* effectué à partir des lysats cellulaires et présenté en Figure R43a), on constate une augmentation de l'expression de GFP-BTG2(A) en fonction de la quantité de plasmide transfectée (puits 2 à 4), tandis que les protéines de fusion GFP-BTG3 et GFP-BTG4 ont un niveau d'expression similaire à GFP-BTG2(A) pour la plus faible quantité de plasmide transfectée (Figure

44a) comparer puits 2, 5 et 6). On constate également que, comme attendu, les queues poly(A) du rapporteur β -globine sont plus courtes pour les cellules sur-exprimant la protéine de fusion GFP-BTG2 que pour les cellules sur-exprimant uniquement GFP (Figure R43b) comparer puits 2-4 au puits 1), et l'on constate même une augmentation de la désadénylation en fonction de la quantité de plasmide transfectée pour GFP-BTG2(A). En effet, les tailles moyennes des fragments amplifiés du rapporteur β -globine (en nucléotides) sont d'environ 240 pour GFP et de 232, 227 et 224 pour GFP-BTG2(A) (puits 2, 3 et 4 respectivement). Cependant, on constate que les queues poly(A) des rapporteurs des cellules sur-exprimant GFP-BTG3 ou GFP-BTG4 sont de tailles similaires à celles retrouvées chez les cellules contrôles sur-exprimant GFP, avec des tailles moyennes (en nucléotides) d'environ 248 pour GFP-BTG3 et 242 pour GFP-BTG4 (Figure R43b) comparer puits 5 et 6 au puits 1). Ainsi, avec ces essais, on ne peut pas affirmer que BTG3(V1) et BTG4 activent la désadénylation d'un rapporteur β -globine *in cellulo*. Je ne peux cependant pas conclure sur l'absence d'effet de BTG3 et de BTG4 sur la désadénylation. Une technique plus résolutive permettant de visualiser la désadénylation d'un lot de rapporteurs invariant en nombre, comme la technique de *pulse-chase* transcriptionnel à partir de cellules HEK293 *Tet-Off*, pourrait être utilisée afin d'évaluer plus précisément le rôle de BTG3 et de BTG4 sur la désadénylation d'un rapporteur β -globine. Par ailleurs, il est possible qu'un ou plusieurs partenaire(s) protéiques de BTG3 et BTG4 ne soient pas présents dans les cellules utilisées pour les essais de RACE-PAT, empêchant ainsi de constater l'effet de BTG3 et BTG4 sur la désadénylation. Il pourrait donc être intéressant de réitérer ces expériences dans d'autres lignées cellulaires.

3. DISCUSSION

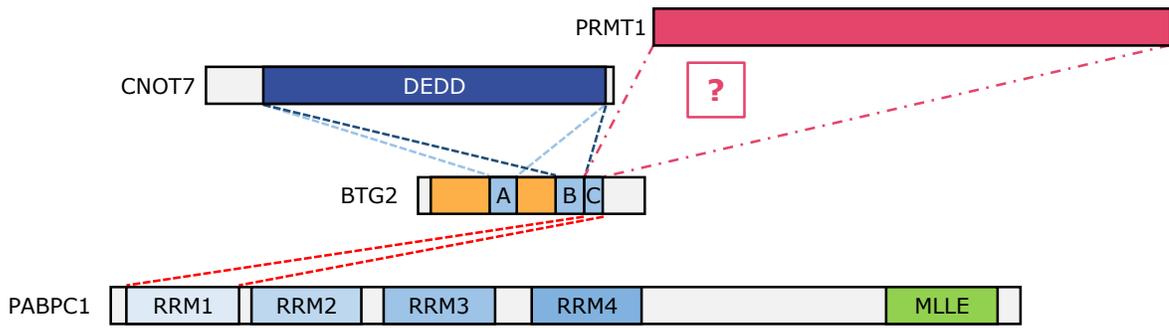
3 DISCUSSION :

3.1 BTG2(APRO) et PABPC1 sont capables d'interagir *in cellulo*, et cette interaction est principalement permise par la région boxC de BTG2 :

Durant ma thèse, j'ai mis en œuvre plusieurs stratégies afin de détecter une interaction entre BTG2(APRO) et PABPC1 *in cellulo*. Entre autres, j'ai réalisé des essais de *Proximity Ligation Assay* afin de visualiser la présence de BTG2(APRO)-HA et de PABPC1 endogène à moins de 40 nm l'une de l'autre. Cependant, ces essais n'ont pas été concluants étant donné que toutes les protéines étiquetées HA utilisées comme contrôle négatif ont généré des signaux PLA avec PABPC1 endogène. Ce résultat est peut-être dû à la présence abondante de PABPC1 dans le cytoplasme ainsi qu'à la sur-expression par transfection transitoire des diverses protéines testées. Par ailleurs, étant donné qu'un ribosome possède une taille avoisinant les 30 nm (Ben-Shem et al., 2011) et que PABPC1 interagit avec des protéines impliquées dans la traduction comme eIF4G et eRF3, il est possible que PABPC1 se trouve à proximité de toutes les protéines lors de leur traduction, engendrant ainsi des signaux PLA quelle que soit la protéine sur-exprimée dans les cellules. J'ai également procédé à des expériences de co-immunoprécipitation. Dans un premier temps, ces tests, réalisés ou non après traitement trichostatine A, n'ont pas permis de visualiser une interaction *in cellulo* entre BTG2 et PABPC1. Cependant, ce résultat était sans-doute dû à une interaction instable entre ces protéines puisque, après traitement avec un agent de réticulation, il a été possible de visualiser une co-précipitation spécifique de PABPC1 endogène avec une protéine GFP-BTG2(APRO)-HA. Ainsi, le domaine APRO de BTG2 est capable de lier PABPC1 *in cellulo*, ce qui n'avait jamais été démontré auparavant. De plus, j'ai montré qu'une mutation du motif boxC, qui consiste au remplacement de la séquence DGSIC, conservée entre BTG1 et BTG2, par la séquence KGPVK retrouvée chez Tob1, diminuait fortement la liaison de BTG2(APRO) au premier domaine RRM de PABPC1 sans pour autant affecter de façon marquante l'association de BTG2 à CAF1. Par ailleurs, des expériences d'ultra-centrifugation analytique menées par un autre membre de l'IGBMC ont permis de mettre en évidence que la liaison de BTG2(APRO) à PABPC1 et à CAF1 n'étaient pas mutuellement exclusives. Ainsi, j'ai contribué à démontrer que le domaine APRO de BTG2 est capable de s'associer à la fois à CAF1 et à PABPC1 et nécessite l'intégrité de la région boxC afin de lier le premier domaine RRM de PABPC1, tandis que Tob1 interagit avec CAF1 via son domaine APRO et s'associe au domaine MLLE de PABPC1 à l'aide de ses motifs PAM2 (Ezzeddine et al., 2007; Okochi et al., 2005). Une étude antérieure à ma thèse avait déjà mis

en lumière le fait que BTG2 était capable de stimuler la désadénylation d'un rapporteur β -globine *in cellulo* (Mauxion et al., 2008). Durant ma thèse, j'ai pu montrer grâce au mutant BTG2(APRO)boxC que la stimulation de la désadénylation d'un rapporteur β -globine *in cellulo* par BTG2(APRO) nécessitait l'interaction entre BTG2(APRO) et PABPC1 (Figure D1).

A)



B)

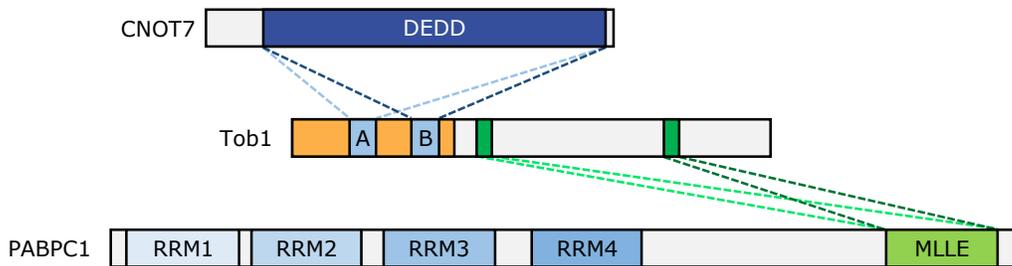


Figure D1 : Bilan des interactions de BTG2 et Tob1 avec PRMT1 et/ou PABPC1.

A- Bilan des interactions entre BTG2, CNOT7, PRMT1 et PABPC1

Les différentes protéines CNOT7, BTG2, PABPC1 et PRMT1 sont représentées. Le domaine DEDD de CNOT7, les régions boxA (A), boxB (B), et boxC (C) de BTG2, ainsi que les domaines RRM1, RRM2, RRM3, RRM4 et MLE de PABPC1 sont annotés. Les régions d'interaction entre les différentes protéines sont reliées par des pointillés.

B- Bilan des interactions entre Tob1, CNOT7 et PABPC1

Les différentes protéines CNOT7, Tob1 et PABPC1 sont représentées. Le domaine DEDD de CNOT7, les régions boxA (A) et boxB (B) de Tob1, ainsi que les domaines RRM1, RRM2, RRM3, RRM4 et MLE de PABPC1 sont annotés. Les motifs PAM2 de Tob1 sont représentés en vert. Les régions d'interaction entre les différentes protéines sont reliées par des pointillés.

Il est à noter que la région boxC de BTG2 a été identifiée au préalable comme nécessaire pour l'interaction de BTG2 avec PRMT1 (Berthet et al., 2002; Lin et al., 1996). Ces auteurs ont en effet montré qu'une protéine BTG2, déletée de la séquence DGSICVLYEA située juste en aval du motif boxB, et donc nommée boxC, n'interagissait plus avec PRMT1. Mes résultats semblent donc en contradiction avec leurs résultats puisque j'ai montré qu'une séquence boxC modifiée après substitution de la séquence DGSIC de boxC par la séquence KGPVK retrouvée chez Tob1 à la même position permet toujours la liaison à PRMT1. Donc, ces résultats suggèrent que la séquence

VLVYA de boxC est responsable de l'interaction à PRMT1. Par ailleurs, on peut également émettre l'hypothèse que l'interaction avec PRMT1 est assurée par le motif GXXXVLY retrouvé chez BTG1, BTG2, Tob1 et Tob2 (Berthet et al., 2002), en partant de la supposition que ces quatre protéines sont capables de s'associer à PRMT1, même si l'interaction entre PRMT1 et Tob1 ou Tob2 n'a jamais été testée. La vérification de la capacité de Tob1 et Tob2 à lier PRMT1 par expérience de double-hybride et de co-immunoprécipitation, ainsi que la résolution des structures des complexes BTG2(APRO)-PRMT1 et BTG2(APRO)-PABPC1 permettrait d'éclaircir les différents résultats obtenus concernant cette interaction par l'identification des acides aminés et/ou des structures tridimensionnelles requises pour les interactions.

3.2 Le domaine APRO de BTG2 permet d'augmenter l'activité désadénylase de CAF1 *in vitro* et cette propriété n'est pas une propriété conservée du domaine APRO au sein de la famille BTG/Tob :

Durant ma thèse, j'ai mis en évidence que le fait de mettre CNOT7 (un des paralogues humains de CAF1) en présence de BTG2(APRO) et de PABPC1(FL) entraînait une forte augmentation de l'activité désadénylase de CNOT7 sur un substrat polyadénosines lors d'expériences de désadénylation *in vitro*. De plus, j'ai montré que les deux premiers domaines RRM de PABPC1 (PABPC1(1-190)) étaient suffisants pour entraîner cette augmentation de l'activité désadénylase de CNOT7 en présence de BTG2(APRO). L'utilisation du mutant BTG2(APRO)boxC pour lequel la liaison au premier domaine de PABPC1 est fortement affaiblie a également permis de prouver que l'interaction entre BTG2(APRO) et PABPC1(1-190) était nécessaire à l'augmentation de l'activité désadénylase de CNOT7 lors d'expériences de désadénylation *in vitro*. Par ailleurs, j'ai constaté que CNOT7 est capable de dégrader un substrat de composition hétérogène en présence de BTG2(APRO) et de PABPC1(1-190). Bien que PABPC1(1-190) ne s'associe pas de manière stable à un tel substrat ARN (testé par gel retard), une association transitoire avec ce substrat de composition hétérogène pourrait expliquer l'augmentation de sa dégradation par CNOT7 en présence de BTG2(APRO). Une hypothèse possible est que les nombreuses protéines liant des ARN de cette composition dans les cellules empêcheraient, par compétition, le recrutement de PABPC1 sur de tels substrats *in vivo*, et donc leur dégradation.

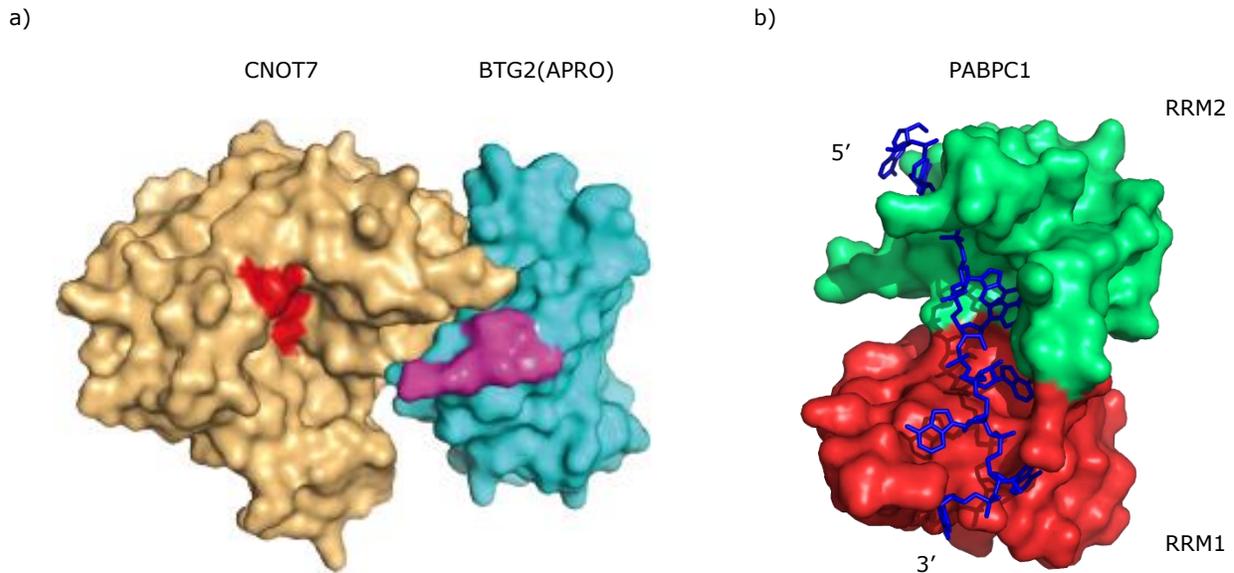


Figure D2 : Modèle proposé pour la stimulation de la désadénylation par BTG2. (a) Une prédiction de l'association entre BTG2(APRO) et CNOT7, ainsi que (b) la structure des deux premiers domaines RRM de PABPC1 associés à un ARN polyadénosines sont présentées. La structure de CNOT7, adaptée de la structure du complexe CNOT7-Tob1(APRO) (PDB ID 2D5R) (Horiuchi et al., 2009), est représentée en orange, et son domaine catalytique est représenté en rouge. La structure du domaine APRO de BTG2 (PDB ID 3E9) est représentée en bleu turquoise, et la région boxC est représentée en violet. La surface des deux premiers domaines RRM de PABPC1 associés à un ARN polyadénosines est représentée. RRM1 est représenté en rouge, RRM2 est représenté en vert, tandis que l'ARN polyadénosines est représenté en sticks bleus (PDB ID 1CVJ) (Deo et al., 1999).

Enfin, j'ai montré que l'augmentation de l'activité désadénylase de CNOT7 en présence de PABPC1 *in vitro* n'était pas une propriété conservée du domaine APRO de la famille BTG/Tob, étant donné que le domaine APRO de Tob1 n'est pas capable d'augmenter l'activité de CNOT7 *in vitro*. Pour rappel, le modèle proposé pour Tob1 consiste en un recrutement de CAF1, lié au domaine APRO de Tob1, sur un substrat ARNm associé à PABPC1, dont le domaine MLLE peut être reconnu par les motifs PAM2 de Tob1 permettant ainsi de rapprocher la désadénylase et son substrat. Si l'on compare le modèle proposé pour Tob1 aux résultats obtenus pour BTG2 lors de cette thèse, on peut proposer un modèle très similaire pour BTG2 à l'exception du fait que c'est uniquement le domaine APRO de BTG2 qui assure à la fois l'association à CAF1 et au premier domaine RRM de PABPC1. De façon intéressante, une étude structurale a révélé qu'un substrat oligo(A) associé à PABPC1 est orienté de telle sorte que son extrémité 3' émerge du premier domaine RRM tandis que son extrémité 5' est liée par le deuxième domaine RRM de PABPC1 (Deo et al., 1999). De plus, après comparaison des structures du complexe CAF1-Tob1(APRO) (PDB ID 2D5R) (Horiuchi et al., 2009) et de BTG2(APRO) (PDB ID 3E9V), la modélisation de l'interaction entre BTG2(APRO) et CAF1, faite par un autre membre du laboratoire, montre que

la région boxC de BTG2 se trouve à proximité du site catalytique de CAF1, ce qui laisse envisager un modèle fonctionnel où BTG2(APRO) permet de présenter efficacement l'extrémité 3' de la queue poly(A) au site catalytique de CAF1 permettant ainsi l'augmentation de la désadénylation (Figure D2).

3.3 PABPC1 permet l'activité désadénylase de CAF1 mais protège un substrat polyadénylé d'autres activités nucléases :

J'ai également constaté durant ma thèse que l'association de PABPC1(1-190) à un substrat poly(A) permet d'empêcher partiellement sa dégradation par une endonucléase, la RNase If. Ce constat n'est pas étonnant, étant donné que PABPC1 a été identifiée comme une protéine conférant une protection de la queue poly(A) jusqu'à 27 nucléotides par molécule de PABPC1 (Baer and Kornberg, 1983). De plus, il a été démontré chez *Saccharomyces cerevisiae* que PAB1 est une protéine inhibitrice de la désadénylation, confirmant son rôle de protéine protectrice (Simon and Seraphin, 2007). Paradoxalement, il a été montré que PABPC1 permet le recrutement, via son domaine MLLE, du complexe PAN au niveau des ARNm en s'associant au motif PAM2 de PAN3, facilitant ainsi leur désadénylation (Siddiqui et al., 2007). Ainsi, étant donné que j'ai observé que PABPC1 permet aussi la digestion d'un substrat poly(A) par la désadénylase CAF1, les résultats obtenus lors de cette thèse mettent en exergue la complexité du comportement de PABPC1 vis-à-vis de la stabilité et de la désadénylation des ARNm.

3.4 L'expression du domaine APRO de BTG2 est suffisante pour observer une réduction de la prolifération cellulaire :

En réalisant des essais de prolifération cellulaire, j'ai observé que le domaine APRO de BTG2 possède des propriétés antiprolifératives tandis que l'expression du mutant boxC, qui n'interagit plus efficacement avec PABPC1, ne produit pas une réduction de la prolifération cellulaire aussi marquée que le domaine APRO sauvage, ce qui suggère que les propriétés antiprolifératives de BTG2 sont dues à sa capacité à augmenter la désadénylation des ARNm. Le profil obtenu lors des expériences de prolifération cellulaire avec BTG2(APRO) ne suggère pas un arrêt total de la prolifération pour tout ou partie des populations cellulaires sur-exprimant cette protéine, mais plutôt un ralentissement de la prolifération de la totalité des cellules concernées. Ainsi je n'ai pas retrouvé de profil de prolifération laissant penser à un arrêt du cycle cellulaire lors de la transition de la phase G1 à S ou de la phase G2 à M du cycle cellulaire comme cela a pu être publié

précédemment (Montagnoli et al., 1996; Rouault et al., 1996; Ryu et al., 2004). Cela peut être dû à la lignée cellulaire utilisée, ici la lignée U2OS, pour laquelle une surexpression de BTG2 aurait un effet moins marqué que pour les lignées NIH3T3, ES et U937 pour lesquelles les arrêts du cycle cellulaire ont été publiés.

3.5 Expression de la protéine BTG2 endogène :

J'ai observé une augmentation de 6 fois du niveau de l'ARNm codant BTG2 après traitement de cellules MCF-7 avec 1 μ M d'acide rétinoïque pendant 4 heures. Cependant, cette expérience n'a été réalisée qu'une fois, il serait donc d'intérêt de la réitérer afin de confirmer l'induction d'expression obtenue avec ce traitement. De plus, il serait intéressant de vérifier le niveau d'expression de la protéine BTG2 afin d'observer si l'augmentation de l'ARNm après un tel traitement est corrélée à une augmentation de l'expression de la protéine. Cependant l'absence d'anticorps reconnaissant BTG2 avec de bonnes spécificité et affinité ne permet pas pour le moment de réaliser ces expériences. Une optimisation de l'induction par synchronisation des cellules pourrait également être testée. L'obtention d'un mode d'induction stable de l'ARNm ainsi que de la protéine BTG2 pourrait être utilisée afin d'éviter une méthode de sur-expression par transfection, donnant un résultat plus proche des conditions physiologiques durant lesquelles la protéine BTG2 est exprimée.

3.6 BTG2 ne semble pas avoir d'effet sur la traduction d'un ARNm luciférase lors d'essais de traduction *in vitro* :

L'étude de l'impact de BTG2 sur la traduction est intéressante pour plusieurs raisons. D'une part, BTG2(APRO) s'associe à PABPC1 au niveau des deux premiers domaines RRM de cette dernière, domaines aussi bien impliqués dans l'initiation de la traduction via une liaison à eIF4G (Safaei et al., 2012) que dans la stimulation, via Paip1, ou l'inhibition, via Paip2, de la traduction (Derry et al., 2006). D'autre part, il a été démontré que Tob1 est capable d'inhiber la traduction de l'ARNm d'IL-2 par sa liaison avec l'iPABP (*inducible PABP*) (Okochi et al., 2005). Ainsi, il était intéressant de tester un potentiel rôle de BTG2 dans la traduction.

Au cours de mon travail de thèse, je n'ai pas pu fournir de réponse précise concernant l'impact de BTG2 sur la traduction. En effet, malgré l'ajout de différentes concentrations de BTG2(APRO), je n'ai observé aucune altération de la traduction d'un ARNm luciférase dans un extrait de cellules HeLa S3. Cependant, il faudrait vérifier que, dans l'extrait de traduction utilisé, l'initiation de la

traduction dépend bien de la présence du complexe eIF4F et de PABPC1, en réalisant par exemple des expériences de compétition par ajout d'un excès de coiffe ou en appauvrissant les extraits de traduction en protéine PABPC1.

3.7 Implication de BTG3 et BTG4 dans la désadénylation d'ARNm :

Même si j'ai confirmé que BTG3(V1) et BTG4 sont capables de s'associer avec CNOT7, je n'ai observé aucune augmentation de la désadénylation d'un rapporteur β -globine en présence de l'une ou l'autre protéine par technique de RACE-PAT. Cependant, BTG3(V1) et BTG4 peuvent peut-être accentuer la désadénylation, mais trop faiblement pour que cela soit visualisé par RACE-PAT. Ainsi il serait intéressant de mettre en œuvre une expérience de *pulse-chase* transcriptionnel sur des cellules *Tet-Off*, ce qui permettrait de mesurer des vitesses de désadénylation et donc d'observer de manière plus résolutive l'effet de BTG3 et de BTG4 sur la désadénylation du rapporteur β -globine. Par ailleurs, il n'est pas impossible que le rapporteur β -globine ne soit pas une cible de BTG3 et de BTG4, empêchant ainsi d'observer un quelconque effet de BTG3 et BTG4 sur la désadénylation avec la technique utilisée.

3.8 Fonctions des protéines de la famille BTG/Tob et lien avec la désadénylation :

Les membres de la famille BTG/Tob ne sont pas exprimés de manière constitutive, mais présentent une grande diversité d'expression, à l'image de la grande variété de stimuli capables d'induire leur expression, comme des stress génotoxiques, des facteurs de croissance ou encore des suppresseurs de tumeurs comme p53 (Cortes et al., 2000; Fletcher et al., 1991; Rouault et al., 1996). De plus, ces protéines sont exprimées au niveau d'organes divers, et peuvent être aussi bien ubiquitaires, à l'image de BTG2 et Tob1, qu'exprimées de manière plus ciblée comme BTG1, qui se trouve être principalement exprimé au niveau du cerveau, ou BTG4 qui est exprimé très majoritairement au niveau des ovocytes (Buanne et al., 2000; Farioli-Vecchioli et al., 2012b; Terra et al., 2008). Malgré ces différences, les membres de la famille BTG/Tob sont impliqués dans des mécanismes physiologiques similaires. De manière remarquable, tous les membres de la famille BTG/Tob présentent des propriétés antiprolifératives (Buanne et al., 2000; Ikematsu et al., 1999; Matsuda et al., 1996; Rouault et al., 1996; Rouault et al., 1992; Yoshida et al., 1998). De plus, les membres de la famille BTG/Tob sont notamment impliqués dans l'embryogénèse en permettant d'assurer aussi bien le développement et la différenciation des cellules neuronales que la mise en place du plan d'organisation corporel (Farioli-Vecchioli et al., 2009; Sugimoto et al., 2005; Wessely et al., 2005).

Aussi, tous les membres de cette famille ont été retrouvés comme sous-exprimés dans de nombreux cancers (Deng et al., 2013; Dong et al., 2009; Feng et al., 2011; Iwanaga et al., 2003; Kanda et al., 2015a; Mollerstrom et al., 2010). Une telle convergence d'effets physiologiques pour une famille de protéines déterminée par un domaine caractéristique laisse envisager un mécanisme d'action central. Ainsi, on peut supposer que la variété de processus régulés par les membres de la famille BTG/Tob soit liée à leur rôle sur la stabilité des messagers via la régulation de l'étape de désadénylation, étant donné que le domaine APRO qui caractérise cette famille permet leur interaction avec la désadénylase CAF1. En effet, réguler la stabilité des transcrits est une méthode de choix pour induire des changements rapides d'expression génomique, afin de réguler des processus variés comme le devenir des cellules lors de l'embryogénèse, l'inhibition de la division cellulaire ou la mort cellulaire. Il a été proposé que BTG2 et Tob1 étaient capables d'induire la désadénylation de tous les ARNm (Ezzeddine et al., 2007; Mauxion et al., 2008). Il a été démontré par la suite que Tob1 interagit via sa partie C-terminale avec la partie C-terminale de la protéine CPEB3, une protéine capable de se lier à des ARNm présentant des structures secondaires spécifiques en 3' UTR (Hosoda et al., 2011), mettant en lumière la désadénylation ciblée de certains ARNm par Tob1. Il serait donc d'intérêt de savoir si BTG2 possède un effet global sur le transcriptome ou si BTG2 possède des cibles ARNm spécifiques. Afin de répondre à cette question, des expériences de séquençage haut débit des queues poly(A) des ARNm cellulaires (technique *Poly(A)-Tail seq* (Chang et al., 2014)) après sur-expression ou induction endogène de l'expression de BTG2 pourraient être menées.

De manière très intéressante, deux études récentes ont révélé que BTG4 est impliquée dans la dégradation des ARNm maternels lors de la transition d'expression génomique permettant l'expression du génome zygotique aux dépens des ARNm maternels présents dans l'ovocyte fécondé (*Maternal to Zygotic Transition MZT*) (Liu et al., 2016; Yu et al., 2016). La dégradation des ARNm maternels aurait lieu suite à leur désadénylation, permise par la liaison de BTG4 à CAF1. Il a été proposé que BTG4, en plus de lier CAF1, puisse lier le domaine C-terminal d'eIF4E, impliqué dans la liaison à eIF4G et à la coiffe, à l'aide de son domaine boxB et donc que CAF1 puisse être recruté via BTG4 à des ARN en cours de traduction (Yu et al., 2016). De plus, il a été identifié que BTG4 est capable de s'associer à la PABPC1 embryonnaire PABPC1L (*Poly(A)-Binding-Protein Cytoplasmic I-Like*) à l'aide de sa partie N-terminale, ce qui suggère que BTG4 augmente la désadénylation des transcrits maternels lors du MZT en permettant de rapprocher

CAF1 de son substrat (Liu et al., 2016), comme cela a été proposé précédemment pour Tob1 avec PABPC1 (Ruan et al., 2010), et comme je l'ai proposé pour BTG2 avec PABPC1 à partir des résultats obtenus lors de ma thèse. Le fait que BTG4 puisse s'associer à PABPC1L est très intéressant étant donné que cela suggère que la liaison à une PABPC est une caractéristique conservée des protéines BTG. Il serait donc d'intérêt d'évaluer l'association des différents membres de la famille BTG/Tob aux différentes PABPC en fonction de l'organisme métazoaire considéré. En conclusion, de façon très intéressante, BTG4 a été démontrée être impliquée dans un processus de dégradation global des messagers ayant une implication dans le développement.

BTG3 est donc maintenant la seule protéine de la famille BTG/Tob pour laquelle aucune donnée n'a été fournie quant à son rôle dans la désadénylation/dégradation des ARNm. Étant donné que toutes les autres protéines de la famille interviennent dans ce phénomène, il est plus que probable que BTG3 soit également un activateur de la désadénylation. Il serait intéressant de confirmer cette supposition et de déterminer les différentes cibles ARNm de BTG3, ainsi que celles des différents membres de la famille BTG/Tob. Cela permettrait de relier ces cibles ARNm aux divers processus physiologiques auxquels prennent part les membres de la famille BTG/Tob et de mieux comprendre les effets pathologiques dus à ces protéines.

4. MATÉRIEL ET MÉTHODES

4 MATÉRIEL ET MÉTHODES :

4.1 Milieux pour la culture bactérienne :

LB (*Sigma* L3022).

Milieu d'auto-induction (*Formedium* AIMTB0210).

En fonction des gènes de résistance aux antibiotiques présents dans les plasmides utilisés pour des expériences de transformation bactérienne, les antibiotiques suivants ont pu être incorporés aux milieux de culture : ampicilline (100 µg/ml), kanamycine (50 µg/ml), tétracycline (7 µg/ml) ou chloramphénicol (25 µg/ml).

4.2 Souches bactériennes :

La souche d'*Escherichia. coli* MH1 (*araD39, lacX74Δ, gal E, gal K, hsr, rpsL*) a été utilisée pour les constructions de plasmides et la préparation d'ADN plasmidique.

Les souches d'*Escherichia. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL (F- *ompT hsdS*(_{RB-} _{MB-}) *dcm*⁺ Tetr *gal endA Hte* (DE3) [*argU ileY leuW CamR*]) et ROSETTA (F- *ompT hsdS*_B(_{RB-} _{MB-}) *gal dcm* (DE3) pRARE (Cam^R)) ont été utilisées pour produire des protéines recombinantes.

4.3 Milieux et tampons utilisés pour la culture de levure :

YPDA (*Yeast Peptone Dextrose Adenine*) : Extrait de levure 10 g/l, Peptone 20 g/l, Glucose 20 g/l et Adénine Sulfate 0,04 g/l.

Tampon phosphate Sorensen 1X : 10 mM Na₂HPO₄ ; 40 mM KH₂PO₄ ; pH 6,25.

Milieu minimum -Leu-Trp : 6,7 g/l *Yeast Nitrogen Base without amino acids* (*Becton Dickinson*) ; *Complete Supplement Mixture -Leu-Trp* (*MP Biomedicals*) ; Glucose 2%, Sorensen 1X.

4.4 Souche de levure :

La souche BSY2528 diploïde Y187/L40 (*MATα/MATα, ade2-101/ade2, his3-200/his3Δ200, leu2-3,-112/leu2-3,-112, lys2-801am::LYS2::(lexAop)4-HIS3/LYS2, MEL1/? , met-/MET, trp1-901/trp1-901, gal4Δ/gal4-542, gal80Δ/gal80-538, ura3-52::URA3::GALI UASGALITATA-lacZ/URA3::(lexAop)8-lacZ*) a été utilisée lors de cette thèse pour des expériences de double-hybride.

4.5 Milieux utilisés pour la culture de lignées cellulaires humaines :

Différentes lignées cellulaires humaines ont été utilisées durant cette thèse : une lignée de cellules embryonnaires rénales (HEK293), deux lignées de cellules de cancer de l'utérus (HeLa) adhérentes (HeLa W.S) ou pouvant être mises en culture en suspension (HeLa S3), une lignée de cellules de cancer du sein (MCF7) ainsi qu'une lignée de cellules de cancer osseux (U2OS).

Milieu de culture HEK293 : milieu *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM), 4,5 g/l glucose, GlutaMAX-I, 10% sérum fœtal de veau (SVF) 202 et 40 µg/ml gentamicine.

Milieu de culture HEK293 *Tet-Off* : milieu DMEM, (4,5 g/l glucose) GLUTAMAX-I, 10% *Tet System Approved* SVF et 40 µg/ml gentamicine.

Milieu de culture HeLa W.S : milieu DMEM, 1g/l glucose, 5% SVF 892 et 40 µg/ml gentamicine.

Milieu de culture HeLa S3 : milieu SMEM, 7% sérum de veau nouveau-né (SVN), 40 µg/ml gentamicine et 2 mM glutamine.

Milieu de culture MCF7 : DMEM, 1g/l glucose, 10% SVF 805, 0,6 µg/ml insuline et 40 µg/ml gentamicine.

Milieu de culture U2OS : milieu DMEM, 1 g/l glucose, 10% SVF 805 et 40 µg/ml gentamicine.

4.6 Clonage par ligation *in-gel* :

Tout d'abord, des fragments PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sont obtenus après amplification à partir de constructions plasmidiques disponibles au laboratoire en utilisant l'enzyme *Phusion Hot Start II* (*Thermoscientific*) et le tampon HF en suivant les instructions du fabricant. Les produits d'amplification sont ensuite purifiés soit en utilisant le kit *Nucleospin® Gel and PCR Clean-up* (*Macherey-Nagel*), soit par extraction au Phénol:Chloroforme et précipitation à l'éthanol. Cette procédure consiste à ajouter un volume de Phénol:Chloroforme:alcool Isoamylique 25:24:1 (PCI) aux échantillons, puis à les mélanger vigoureusement pendant 1 min et à les centrifuger pendant 1 min à 14 000 rpm. La phase aqueuse est récupérée puis complétée par 3 Volumes d'éthanol froid 100%, 300 mM NaAc pH 5,2 et 12,5 ng/µl glycogène. Après précipitation à -20°C sur la nuit, les échantillons sont centrifugés pendant 30 min à 14 000 rpm. Les culots ADN sont ensuite lavés avec de l'éthanol 80% froid, puis les échantillons sont centrifugés à nouveau, pendant 15 min à 14 000 rpm. Les culots ADN sont ensuite séchés à température ambiante pendant 15 min ou à l'aide d'une pompe à vide pendant 5 min, avant d'être remis en suspension dans de l'eau MilliQ. Les fragments d'amplification PCR et les plasmides hôtes digérés par les enzymes de restriction adéquates (*New England Biolabs*) sont ensuite déposés sur gel 1% agarose *Low-melting* (*SeaPlaque® Agarose*,

Lonza Rockland) dans du tampon de migration 1X TA (la composition des tampons est indiquée en paragraphe 4.18). Après migration, le gel est coloré avec 0,5 µg/ml bromure d'éthidium (BET) à l'abri de la lumière pendant 30 min. Les différents fragments sont ensuite révélés par transilluminateur UV, puis découpés du gel.

Les bandes d'agarose contenant les différents produits de digestion sont ensuite chauffées à 68°C pendant 10 min pour faire fondre l'agarose, puis transférées à 42°C. Par réaction, 5 µl de chaque bande d'intérêt sont ensuite mélangés, puis 1 volume de *T4 DNA ligase* (*New England Biolabs*) diluée à 20 U/µl dans du tampon *Ligase* est ajouté à chaque réaction. Les réactions de ligation sont ensuite incubées à 16°C sur la nuit.

Les réactions de ligation sont incubées à 68°C pendant 10 min, puis transférées à 42°C. La moitié de chaque réaction de ligation est ajoutée à 50 µl de 50 mM CaCl₂ puis laissée refroidir sur glace. 100 µl de bactéries compétentes MH1 sont ajoutés à chaque réaction, puis après incubation sur glace pendant 30 min, les bactéries subissent un choc thermique à 42°C pendant 90 sec, avant d'être replacées sur glace pendant 2 min. 1 ml de LB est ajouté avant 45 min d'incubation à 37°C, puis une fraction des bactéries est étalée sur milieu sélectif et incubée sur la nuit à 37°C.

4.7 Préparation d'ADN plasmidique :

Une colonie d'intérêt est incubée dans 2 à 50 ml de LB en présence d'antibiotiques et incubée sur la nuit à 37°C. La préparation d'ADN est ensuite réalisée par utilisation des kits *NucleoSpin® Plasmid EasyPure* (*Macherey-Nagel*) et *NucleoBond® Xtra Midi* (*Macherey-Nagel*).

4.8 Analyse de protéines par gel SDS-PAGE et western blot :

Les échantillons sont dénaturés pendant 5 min à 95°C dans du tampon de charge pour protéines avant d'être chargés sur gel SDS-PAGE et migrés dans un tampon Tris Glycine. Les protéines sont ensuite soit colorées au bleu de Coomassie avec une décoloration dans une solution contenant 20% d'acide acétique et 10% d'éthanol, soit transférées sur une membrane de Protran nitrocellulose (*Whatman* 10401180) afin d'être analysées par *western blot*. Le transfert est effectué dans du tampon 20% éthanol, 25 mM Tris Base, 190 mM Glycine pendant 2h à 80V en chambre froide. Après transfert, la membrane est bloquée pendant 1h à température ambiante, ou sur la nuit à 4°C, dans une solution de blocage PBS 1X, 5% poids/volume (p/v) lait écrémé (Régilait). Ensuite la membrane est incubée avec l'anticorps primaire dilué à 1/1000 dans une solution PBS 1X, 5% (p/v) lait pendant 1h à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite lavée trois fois

pendant 5 min à température ambiante sous agitation en présence de PBS 1X, ou de PBS 1X + 0,05% Tween, puis la membrane est incubée pendant 30 min avec l'anticorps secondaire GAMPO (*Goat Anti-Mouse IgG Poly-HRP, Pierce*) dilué au 1/5000 ou GARPO (*Goat anti-Rabbit IgG Poly-HRP, Pierce*) dilué au 1/1000 dans une solution PBS 1X, 5% (p/v) lait à température ambiante et sous agitation. Après trois lavages de 5 min à température ambiante sous agitation en présence de PBS 1X, ou de PBS 1X + 0,05% Tween, le signal est révélé avec soit le réactif chimio-luminescent *Luminata Crescendo (Millipore)*, *SuperSignal West Femto (Thermo Scientific)* ou *SuperSignal West Pico (Thermo Scientific)* à l'aide de l'appareil *ImageQuantTM LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences)*. Dans le cas d'une détection avec l'anticorps primaire anti-CNOT7, le kit *SuperSignal Western Blot Enhancer (Pierce)* a été utilisé.

4.9 Expériences de co-immunoprécipitation après transfection *in cellulo* :

4.9.1 Co-immunoprécipitation de protéines marquées HA :

Des cellules HEK293, préalablementensemencées dans des boîtes de pétri de 6 cm de diamètre, ont été transfectées à l'aide du réactif *Effectene Transfection Reagent (Qiagen)* avec différentes quantités de plasmide exprimant des constructions de la famille BTG/Tob étiquetées HA en C-terminal. Après 7h d'incubation, le milieu de transfection a ensuite été remplacé par du milieu de culture. 24h après transfection, les cellules ont été traitées, ou non, pendant 16h avec 500 nM de trichostatine A (*Sigma*) ou du DMSO (*Sigma*). Les cellules sont ensuite mises en suspension dans du PBS froid puis centrifugées à 200 g pendant 5 min et le culot est repris dans 400 µl de tampon de lyse IPP150++. Les cellules sont ensuite incubées 10 min sur glace, avant une dernière étape de centrifugation à 14 000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est ensuite récupéré pour chaque échantillon, un dosage protéique par Bradford est réalisé, puis 10 µl de billes d'agarose couplées à des anticorps monoclonaux anti-HA (*Sigma*), préalablement lavées avec du tampon de lyse IPP150++, sont ajoutés aux surnageants. Après incubation sur agitateur rotatif pendant 1 h à 4°C, les échantillons sont centrifugés à 500 g pendant 1 min à 4°C. Les billes sont ensuite séquentiellement lavées avec trois fois 1 ml de tampon IPP150++ froid. Une fois le surnageant éliminé, l'élution est effectuée par ajout de 30 µl de tampon de charge pour protéines et chauffe des échantillons à 85°C pendant 10 min sous agitation. Après centrifugation pendant 1 min à 500 g, l'éluat est récupéré et chargé sur gel SDS-PAGE, ainsi qu'un aliquote des lysats, pour une analyse par *western blot*.

4.9.2 Co-immunoprécipitation de protéines marquées GFP :

Des cellules HEK293 *Tet-Off*, préalablement ensemencées dans des plaques 12-puits ont été transfectées à l'aide du réactif *TurbofectTM* (*ThermoFisher*) selon les recommandations du fabricant avec diverses constructions exprimant des membres de la famille BTG/Tob. Après 7h d'incubation, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu de culture. Deux jours après transfection, les cellules sont reprises dans du PBS froid puis centrifugées à une vitesse de rotation de 1000 rpm pendant 5 min à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot de cellules est repris dans du tampon de lyse IPP150++. Les cellules sont ensuite incubées 20 min sur glace. Parallèlement, des billes GFP-Trap (*Chromotek*) sont lavées deux fois avec du PBS froid puis une fois avec de l'IPP150. Après remise en suspension des billes dans de l'IPP150 et centrifugation des lysats cellulaires à 14 000 rpm pendant 15 min à 4°C, les billes sont ajoutées aux surnageants cellulaires avant une incubation sur agitateur rotatif pendant 1h à 4°C. Après centrifugation à 1000 rpm pendant 1 min à 4°C, les billes sont lavées trois fois avec de l'IPP150 avant remise en suspension dans de l'IPP150 et complémentation avec du tampon de charge pour protéines. La composition protéique des échantillons est ensuite analysée par *western blot* après migration sur gel SDS-PAGE.

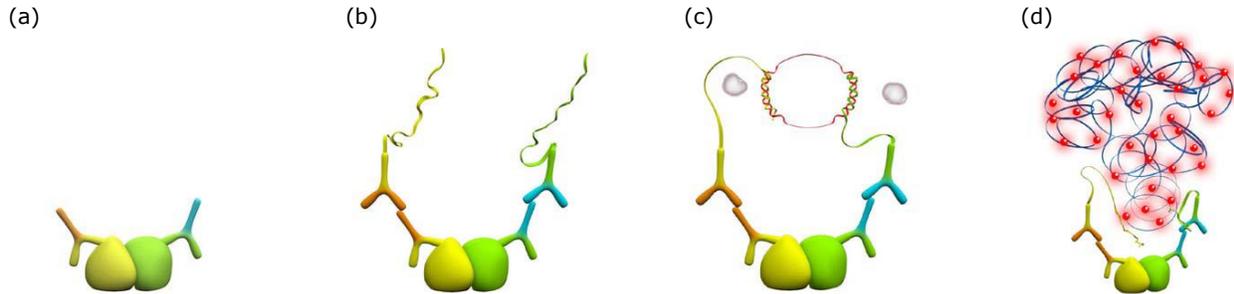
4.9.3 Co-immunoprécipitation après réticulation :

Des cellules HEK293, préalablement ensemencées dans des boîtes de pétri de diamètre 6 cm ou 10 cm, ont été transfectées en duplicata à l'aide d'*Effectene Transfection Reagent* (*Qiagen*) avec différentes quantités de plasmide exprimant soit la protéine GFP seule, soit diverses constructions de la famille BTG/Tob marquées en N-terminal à la GFP et présentant ou non une étiquette HA en C-terminal. Après 7h d'incubation, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu de culture. 24h après transfection, les cellules ont été traitées avec 0,25 mM Dithio-bis Succinimidyl Propionate (DSP) (*Pierce*) dissous dans du DMSO, ou avec du DMSO (*Sigma*) pendant 30 min à température ambiante. La réaction de réticulation a ensuite été arrêtée par ajout de PBS++ froid complétement avec 20 mM Tris pH 7,5. Puis, les cellules ont été reprises dans du PBS froid puis centrifugées à une vitesse de rotation de 1000 rpm pendant 5 min à 4°C et lysées en présence de RNaseA (*Macherey-Nagel*) dans 200 µl de tampon de lyse IPP150Triton +++. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 30 min sur glace avant centrifugation à 14 000 rpm pendant 5 min, puis, après ajout de 300 µl de tampon IPP150+, un dosage protéique par Bradford a été réalisé. Après cela, 10 µl de billes GFP-Trap (*Chromotek*) ont été ajoutées aux surnageants cellulaires puis ceux-ci ont été incubés sur agitateur rotatif pendant 1h à 4°C. Après centrifugation pendant 1 min

à 500 g, les billes ont été lavées trois fois avec de l'IPP 150+, puis du tampon de charge pour protéines a été ajouté aux billes avant incubation pendant 10 min à 95°C sous agitation. Après centrifugation à 500 g pendant 1 min, les surnageants ont été récupérés. La composition protéique de ces derniers a ensuite été analysée par *western blot* après migration sur gel SDS-PAGE.

4.10 Proximity ligation assay :

Cette expérience permet de visualiser si deux protéines sont présentes à moins de 40 nm l'une de l'autre dans la cellule. Des anticorps primaires vont d'abord reconnaître les deux protéines d'intérêt. Puis les sondes PLA, des anticorps secondaires couplés à des amorces ADN, vont reconnaître les anticorps primaires précédents. Durant une étape de ligation, des oligonucléotides ADN présents dans la solution de ligation vont s'hybrider aux amorces des sondes PLA, puis former une molécule d'ADN cyclique par ligation à condition que les deux protéines considérées soient présentes à moins de 40 nm l'une de l'autre. Finalement, la réaction d'amplification par l'ajout d'une polymérase va permettre la synthèse d'un concatémère par amplification cyclique, concatémère qui sera détecté par des oligonucléotides marqués avec des fluorophores présents dans la solution d'amplification (Figure M1).



(adapté de la notice d'utilisation *Duolink® In Situ - Fluorescence*)

Figure M1 : Représentation schématique du principe du *Proximity Ligation Assay*.
(a) Reconnaissance des protéines d'intérêt par les anticorps primaires. (b) Reconnaissance des anticorps primaires par les sondes PLA. (c) Étape de ligation, permettant la formation d'une molécule d'ADN cyclique à partir des amorces ADN des sondes PLA et d'oligonucléotides présents dans la solution de la ligation. (d) Génération d'un concatémère par amplification cyclique après ajout d'une polymérase, puis détection du concatémère à l'aide d'oligonucléotides marqués avec un fluorophore.

Pour ce faire 50 000 cellules U2OS ou 60 000 cellules HeLa W.S ont été préalablement ensemencées dans chacun des 8 puits d'une lame 177445 *Lab-Tek® Chamber Slide (Thermo Scientific Nunc®)* dans 200 µl de milieu de culture. Ces cellules ont ensuite été transfectées avec 0,2 µg de plasmide, exprimant une protéine n'étant pas censée interagir avec PABPC1 ou le

domaine APRO de BTG2 ou de Tob1 sauvage, à l'aide du réactif *TurbofectTM* (*ThermoFisher*) selon les recommandations du fabricant. Après 7h d'incubation, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu de culture.

24h après transfection, la réaction de *Proximity Ligation Assay* a pu être effectuée à l'aide du kit *Duolink® In Situ – Fluorescence* (*Olink Bioscience*). Les cellules ont été lavées deux fois avec 200 µl de PBS, puis fixées à la lame de verre de la plaque *Lab-Tek* par incubation avec 200 µl de ParaFormaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 min à température ambiante. Après deux lavages avec 200 µl de PBS, les cellules ont été perméabilisées par incubation pendant 10 min à température ambiante avec 200 µl de PBS/Triton 100X 0,5%. Après deux lavages de 5 min au PBS l'étape de blocage, consistant en l'ajout de solution de blocage dans chaque puits de manière à recouvrir toute la surface de croissance des cellules, a été effectuée. Après incubation pendant 30 min à 37°C en chambre humide, l'armature plastique délimitant les puits de la lame *Lab-Tek* a été retirée. Les anticorps primaires reconnaissant la protéine sur-exprimée et PABPC1 endogène ont été dilués au 1/500 dans la solution *Antibody diluent*, présente dans le kit, avant d'être ajoutés sur les cellules puis incubés 1h à température ambiante. La lame a ensuite été lavée deux fois pendant 5 min à l'aide du tampon de lavage A, avant d'être incubée 1h à 37°C en chambre humide en présence des deux sondes PLA préalablement diluées ensemble au 1/5 dans la solution *Antibody diluent*. La lame a été à nouveau lavée deux fois pendant 5 min avec le tampon de lavage A. Durant l'étape de ligation, la ligase du kit préalablement diluée à 0,025 U/µl dans la solution de ligation a été incubée sur les cellules pendant 30 min à 37°C en chambre humide. Après deux lavages de 2 min avec le tampon A, la polymérase fournie dans le kit et diluée à 0,125 U/µl dans la solution d'amplification a été ajoutée sur les cellules avant 1h40 d'incubation à 37°C en chambre humide à l'abri de la lumière. Après cette étape d'amplification et deux lavages de 2 min avec du tampon A, une incubation des cellules à température ambiante pendant 1h avec un anticorps secondaire dilué au 1/500 dans la solution *Antibody diluent* a pu être effectuée afin d'identifier les cellules transfectées. La dernière étape du PLA a été le marquage des noyaux des cellules avec 0,1 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) pendant 10 min à température ambiante. La lame a finalement été nettoyée deux fois pendant 10 min avec le tampon de lavage B, puis 1 min avec le tampon de lavage B dilué au 1/100. Une lamelle a ensuite été fixée sur la lame avec quelques gouttes de milieu de montage *Prolong® Gold antifade reagent* (*Life Technologies*) puis mise à sécher à température ambiante à

l'abri de la lumière pendant 24h. La lame obtenue a pu ensuite être observée par microscopie confocale.

4.11 Purifications de protéines :

4.11.1 Obtention de culots bactériens après transformation :

Des bactéries compétentes BL21-CodonPlus-RIL ont été transformées avec 1 µg de construction plasmidique pour 100 µl de bactéries. Pour cela, les bactéries ont été mises en présence des plasmides et incubées sur glace pendant 30 min. Les bactéries ont ensuite été soumises à un choc thermique de 42°C pendant 90 sec, puis déposées sur glace pendant 2 min. 900 µl de milieu de culture LB ont ensuite été ajoutés aux bactéries avant 1h d'incubation à 37°C. Les bactéries ont ensuite été centrifugées à 14 000 rpm pendant 1 min en chambre froide et étalées sur milieu sélectif avant incubation sur la nuit à 37°C. Une colonie obtenue à la suite de chaque transformation a ensuite étéensemencée dans du milieu d'auto-induction (*Formedium*), complété avec 25 µg/ml chloramphénicol et un ou plusieurs antibiotiques de sélection, puis incubée sous agitation pendant 6h à 37°C et sur la nuit à 25°C. Après centrifugation à 5 000 rpm pendant 20 min, les culots bactériens ont été lavés avec du PBS froid puis à nouveau centrifugés pendant 20 min à 5 000 rpm et congelés à -80°C.

4.11.2 Expériences de co-précipitation :

Les culots obtenus précédemment ont ensuite été repris dans du tampon de liaison, complété des inhibiteurs de protéases *cOmpleteTM EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)* et 1 mM PMSF (*Sigma*), puis lysés à l'aide d'un sonicateur durant 6 sessions de 10 secondes, avec des impulsions sonores de 2 sec d'une amplitude de 30%. Les lysats ont ensuite été centrifugés pendant 10 min à 14 000 rpm afin de débarrasser le lysat des débris cellulaires. Les surnageants contenant les protéines en suspension ont été récupérés puis incubés 1h à 4°C en présence soit d'une résine Glutathione Sépharose 4B (*GE Healthcare Life Sciences*) pour la purification de protéines marquées GST, soit d'une résine Nickel-NTA (*NitriloTriacetic Acid, Qiagen*) agarose pour la purification de protéines présentant un marquage polyhistidine. La résine a ensuite été récupérée par centrifugation à 500 g pendant 1 min, puis lavée deux fois avec 1 ml de tampon de liaison. L'élution a été effectuée à 4°C pendant 5 min en présence du tampon d'élution spécifique à chaque résine. Après centrifugation pendant 1 min à 500 g, les éluats contenant les protéines d'intérêt ont été récupérés puis complétés avec du tampon de charge pour protéines avant d'être migrés sur gel

SDS-PAGE en vue d'une coloration au bleu de Coomassie ou d'un transfert sur membrane de nitrocellulose afin d'analyser la composition protéique des éluats par *western blot*.

4.11.3 Purification de protéines recombinantes pour les tests *in vitro* :

4.11.3.1 Purification « à pression atmosphérique » de protéines de fusion GST :

Les culots bactériens obtenus précédemment ont été repris dans du tampon de lyse complété par des inhibiteurs de protéases *cOmpleteTM EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)* et 1 mM PMSF (*Sigma*), puis lysés à l'aide d'un appareil *Cell Disrupter (Constant Systems Ltd.)*. Les lysats ont ensuite été centrifugés pendant 30 min à 12 000 rpm afin de débarrasser les lysats des débris cellulaires. Une résine Glutathione Sépharose 4B (*GE Healthcare Life Sciences*) a été déposée sur des colonnes chromatographiques vides *Polyprep® Chromatography Column (Bio-Rad)*, puis rincée avec 10 ml de PBS 1X. Après filtration des lysats bactériens avec un filtre 0,45 µm (*MiniSart®*), les filtrats ont été déposés sur la résine des colonnes chromatographiques. Ces dernières ont ensuite été bouchées, puis incubées sur agitateur rotatif pendant 1h à 4°C. Les surnageants ont ensuite été laissés libres de s'écouler à travers les colonnes. Après un lavage de la résine avec du PBS, plusieurs étapes d'élution ont été réalisées par ajout de tampon d'élution spécifique à la résine. La concentration protéique de chaque fraction d'élution a ensuite évaluée par test de Bradford, puis les fractions d'élution les plus riches en protéines ont été mélangées. L'éluat reconstitué a ensuite été injecté dans un tube de dialyse *Mini Dialysis kit 8 kDa, 2 ml (GE Healthcare Life Sciences)*, puis dialysé sous agitation sur la nuit contre 1,75 l de PBS en chambre froide. La concentration protéique de l'éluat dialysé a finalement été mesurée par test de Bradford avant aliquotage et conservation à -80°C.

4.11.4 Purification de protéines par HPLC :

La plupart des protéines purifiées par HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ont été produites par la plateforme de Biologie et Génomique Structurale de l'IGBMC, exceptée la protéine 6His-PABPC1(FL) qui a été purifiée dans le laboratoire avec l'aide d'un de ses membres (O. KOLAJ-ROBIN). À cette fin, les culots bactériens ont été repris dans du PBS complété par des inhibiteurs de protéases *cOmpleteTM EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)* et 1 mM PMSF (*Sigma*), puis lysés à l'aide d'un appareil *Cell Disrupter (Constant Systems Ltd.)*. Les lysats ont ensuite été centrifugés pendant 30 min à 12 000 rpm afin de débarrasser les lysats des débris cellulaires. Les lysats ont ensuite été purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne

HisTrap FF (*GE Healthcare Life Sciences*) puis par une étape de chromatographie d'exclusion sur une colonne Superdex 75 (*GE Healthcare Life Sciences*) dans un tampon PBS.

4.12 Expériences de désadénylation *in vitro* :

4.12.1 Synthèse de substrats polyadénosines marqués en 5' par la fluorescéine :

Un ARN oligo(A) d'une taille de 20 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine (*Dharmacon*), l'ARN 96, a été ajouté à une concentration de 0,2 µg/µl à 4,5 mM ATP et 0,5 U/µl Poly(A) Polymérase (PAP) d'*E. coli* (*New England Biolabs*) dans du tampon *Poly(A) polymerase* fourni avec l'enzyme, pendant 40 min à 37°C à l'abri de la lumière. Un volume de tampon de charge ARN a ensuite été ajouté avant dénaturation pendant 5 min à 65°C. Les oligo(A) dénaturés ont été mis à migrer à 25W sur un gel d'acrylamide dénaturant 8% jusqu'à ce que le bleu de bromophénol contenu dans le tampon de charge ait migré hors du gel. Le gel a ensuite été révélé par *UV shadowing* avec une plaque fluorescente aux UV. Les produits d'élongation oligo(A) d'une taille avoisinant les 75 adénosines ont été récupérés par découpe des zones du gel correspondant à leur migration.

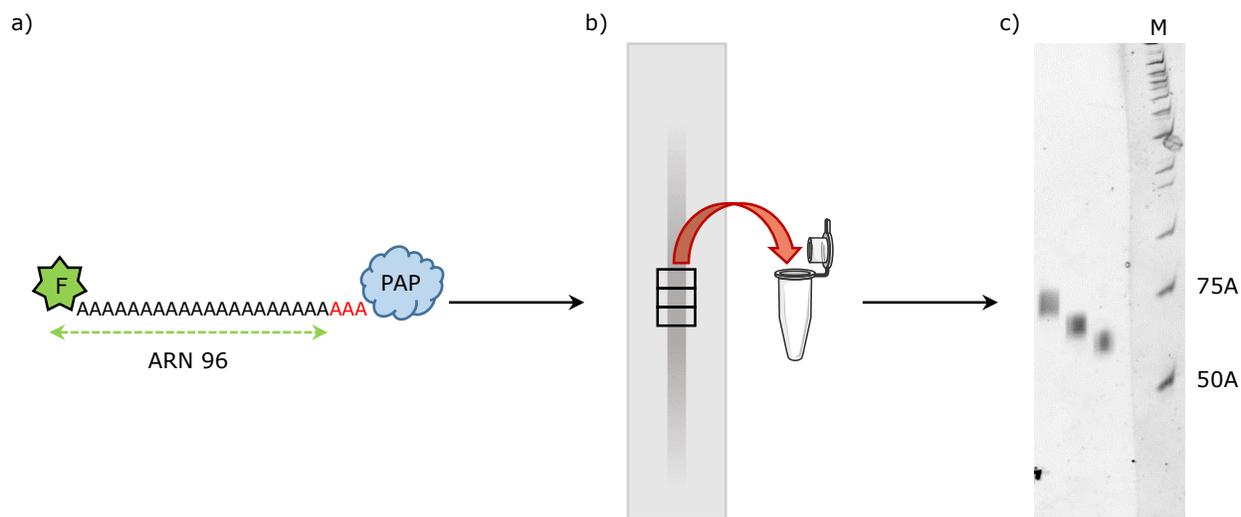


Figure M2 : Synthèse d'un substrat polyadénylé marqué en 5' à la fluorescéine.

(a) Synthèse d'un lot de substrat polyadénylé par la Poly(A) Polymérase (PAP) d'*E. coli* à partir de la matrice ARN 96 de 20 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine. (b) Purification des produits d'élongation d'une taille d'environ 75 adénosines sur gel d'acrylamide dénaturant 8% après visualisation avec une plaque fluorescente aux UV. (c) Vérification des produits d'élongation purifiés sur gel après migration sur gel d'acrylamide dénaturant 8%. Un marqueur ADN (M) a été migré simultanément. La portion du gel correspondante a été séparée du reste du gel puis révélée par incubation pendant 30 min dans 200 µl TBE 0,5X, SYBR® Green 1X (*ThermoFisher Scientific*) à l'abri de la lumière. Le gel reconstitué a ensuite été visualisé à l'aide de l'appareil *ImageQuant™ LAS4000* (*GE Healthcare Life Sciences*).

Les fragments de gel obtenus ont été recouverts de tampon protéinase K (PK) qui a permis, sous agitation à température ambiante, l'élution passive sur la nuit des ARN depuis les fragments de gel vers le tampon. Après récupération du liquide, un volume de PCI a été ajouté, puis les échantillons ont été mélangés vigoureusement avant centrifugation à 14 000 rpm pendant 1 min. Les phases aqueuses ont été récupérées, puis 2,5 volumes d'alcool froid 100% ont été ajoutés ainsi que 20 ng/μl de glycogène. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 30 min à 14 000 rpm à 4°C. Les culots obtenus ont été lavés avec de l'éthanol froid 80% avant une autre étape de centrifugation à 14 000 rpm pendant 15 min en chambre froide. Les culots ARN ont ensuite été séchés 5 min à l'aide d'une pompe à vide avant d'être remis en suspension dans 20 μl d'eau MilliQ. Un exemple de substrats obtenus est présenté en Figure M2.

4.12.2 Marquage d'oligonucléotides ARN à la fluorescéine :

L'ARN à marquer a été ajouté à une concentration finale de 60 μM en présence de 0,13 μg/μl ATP-γ-S et de 2U/μl T4 Polynucléotide Kinase (*ThermoFisher*) dans du tampon PNK A, fourni avec l'enzyme. Après 30 min d'incubation à 37°C, la fluorescéine maléimide a été ajoutée à la réaction à une concentration de 6,8 μg/μl. Après incubation pendant 30 min à 65°C, la réaction a été interrompue par ajout d'un volume de Phénol puis mélange vigoureux et centrifugation pendant 1 min à 14 000 rpm. La phase aqueuse a été récupérée puis purifiée par extraction au PCI et précipitation à l'éthanol comme décrit en 4.6. Le culot d'ARN marqué a finalement été remis en suspension dans 30 μl d'eau MilliQ.

4.12.3 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) :

Un substrat ARN marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM ou 800 nM) a été mis en présence de diverses concentrations de protéines PABPC1 et/ou BTG/Tob dans du tampon IIC. Après incubation 20 min à 23°C, les échantillons ont été complétés avec du tampon de charge EMSA, puis migrés sur gel natif acrylamide 6% pendant 2h à 3 W en chambre froide à 4°C. Le gel a ensuite été révélé à l'aide de l'appareil *ImageQuantTM LAS4000* (*GE Healthcare Life Sciences*).

4.12.4 Essai de désadénylation *in vitro* :

Un substrat ARN marqué en 5' à la fluorescéine (100 nM) a été mis en présence de quantités variables de diverses protéines BTG/Tob et/ou PABPC1 dans l'un des tampons II. Les échantillons ont été incubés ou non 10 min à 30°C à l'abri de la lumière avant l'ajout de quantités variables de CNOT7 et incubation pendant différents temps à 30°C. Après ajout d'un volume de tampon de

charge ARN, les échantillons ont été analysés par électrophorèse sur gel polyacrylamide dénaturant 8% ou 15% puis visualisés à l'aide d'un appareil *ImageQuantTM LAS4000* ou *Typhoon 8600* (*GE Healthcare Life Sciences*).

4.12.5 Essai de dégradation avec Nucléase P1 :

Un substrat de 17 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine a été incubé à 100 nM en présence de différentes concentrations de Nucléase P1 (*Sigma*) pendant 5 min à 50°C. En parallèle, un substrat de 20 adénosines a été incubé à 100 nM en présence de 1,8 µM 6His-CNOT7 dans du tampon IIC pendant différents temps. Après ajout d'un volume de tampon de charge ARN, les échantillons ont été analysés par électrophorèse sur gel polyacrylamide dénaturant 15% pendant 40 min à 20 W puis visualisés avec un appareil *Typhoon 8600* (*GE Healthcare Life Sciences*).

4.12.6 Essai de dégradation par RNase If :

Un substrat de 75 adénosines marqué en 5' à la fluorescéine a été incubé à 100 nM soit en présence de 0,7 µM 6His-PABPC1(1-190) dans du tampon IIC pendant 10 min à 30°C, soit en présence de 1,8 µM 6His-CNOT7(mut) inactive dans du tampon IIC pendant 10 min sur glace. Puis de la RNase If (*New England Biolabs*) a été ajoutée aux échantillons à une concentration de 0,0075 U/µl avant incubation à 30°C pendant différents temps. Puis, après ajout d'un volume de tampon de charge ARN, les produits de réaction ont été analysés par électrophorèse sur gel polyacrylamide dénaturant 8% qui a été révélé avec un appareil *Typhoon 8600* (*GE Healthcare Life Sciences*).

4.13 Test double-hybride chez la levure :

4.13.1 Transformation de levures :

La souche de levure BSY 2528 a d'abord été étalée sur boîte YPDA, puis incubée pendant 2 jours à 30°C. Une culture liquide a ensuite été effectuée en ensemençant une colonie de levure dans 2,5 ml de milieu YPDA. Après deux jours d'incubation à 30°C, trois autres cultures liquides ont été faites, en ensemençant 2 µl, 6 µl et 20 µl de la préculture dans 100 ml de milieu YPDA. Après incubation sur la nuit à 30°C, la densité optique d'une dilution au 1/10 de chaque culture a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm. La culture dont la dilution présentait une absorbance totale comprise entre 0,5 et 1,0 a ensuite été centrifugée à 3 000 rpm pendant 2 min. Le culot a ensuite été lavé avec 50 ml de 10 mM Tris-HCl pH 7,5 puis à nouveau centrifugé pendant 2 min à 3 000 rpm. Le culot obtenu a été à nouveau lavé, cette fois-ci avec 0,1 M LiT, puis centrifugé à 3 000 rpm pendant 2 min avant d'être remis en suspension dans

1,5 ml de 0,1 M LiT. De l'ADN de sperme de saumon (*Sigma*) a été dénaturé à 95°C pendant 5 min, puis 5 µl de cet ADN ont été ajoutés à 270 µl de solution PEG stérile et complétés à 300 µl de volume final avec de l'eau MilliQ. 0,1 à 1 µg d'un plasmide exprimant la protéine « appât », ici le domaine APRO de BTG2 sauvage ou un mutant de ce domaine fusionné au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription LexA par clonage dans le vecteur pB27 (*Hybrigenics*), et d'un autre plasmide exprimant la protéine « proie », ici PABPC1(1-146) ou CNOT7 fusionnées au domaine d'activation du facteur de transcription GAL4 par clonage dans le vecteur pP6 (*Hybrigenics*), ont ensuite été ajoutés au mélange précédent. La solution réactionnelle a finalement été complétée avec 50 µl des levures en suspension, puis mélangée vigoureusement. Après 30 min d'incubation à température ambiante, les levures ont été soumises à un choc thermique à 42°C pendant 20 min, puis centrifugées à 3 000 rpm pendant 2 min. Le culot de levures obtenu a ensuite été remis en suspension dans 500 µl de YPDA puis incubé à 30°C pendant 1h, avant d'être à nouveau centrifugé à 3 000 rpm pendant 1 min. Les levures ont finalement été remises en suspension dans 100 µl de 10 mM Tris-HCl pH 7,5 puis la moitié des levures a été étalée sur milieu sélectif YPDA-Leu-Trp et incubée pendant 48h à 30°C.

4.13.2 Essai enzymatique β -galactosidase :

Pour chaque réaction de transformation, quatre colonies ont été sous-clonées sur une nouvelle boîte de pétri de milieu sélectif YPDA-Leu-Trp qui a ensuite été incubée 48h à 30°C. Parmi ces quatre colonies, deux ont été incubées sur la nuit à 30°C en culture liquide dans 2 ml de milieu minimum -Leu-Trp complété avec du tampon Sorensen 1X et 2% Glucose. 100 µl de cultures diluées dix fois ont été disposés dans des puits de plaque 96-puits (*Perkin ElmerTM*) afin de mesurer leur densité optique à 600 nm. En parallèle, 5 µl de chaque culture ont été ajoutés à 45 µl de milieu minimum et 50 µl de réactif β -Glo (*Promega*) dans un puits de plaque 96-puits (*Perkin ElmerTM*) pour un essai d'activité β -galactosidase. Ces plaques ont été incubées 1h à température ambiante à l'abri de la lumière puis analysée à l'aide d'un luminomètre. La valeur donnée par le luminomètre pour chaque réaction a été pondérée par la densité optique de la culture correspondante.

4.14 Analyse par RACE-PAT (*Rapid Amplification of CDNA Ends Poly(A) Tail*) :

Diverses constructions de la famille BTG/Tob ont été exprimées dans des cellules HEK293 *Tet-Off*. Ces cellules expriment de manière constitutive une protéine de fusion contenant une portion de la partie N-terminale de la protéine répresseur de la tétracycline (TetR) d'*Escherichia coli*

fusionnée à la partie C-terminale du domaine d'activation VP16 du virus *Herpes simplex*. Cette protéine de fusion appelée « transactivateur contrôlé par la tétracycline » (tTA) va pouvoir, en absence de tétracycline, lier l'élément de réponse à la tétracycline (TRE) situé au niveau du promoteur d'un plasmide exprimant le rapporteur β -globine, permettant ainsi l'expression de ce dernier.

4.14.1 Transfections cellulaires :

Les cellules HEK293 *Tet-Off*,ensemencées dans des plaques 6-puits, ont été transfectées à l'aide d'*Effectene Transfection Reagent (Qiagen)* avec 0,4 μ g de plasmide encodant le rapporteur β -globine et des quantités variables de plasmides encodant diverses protéines de fusion BTG/Tob. 6-8h après, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu de culture. Deux jours après transfection, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS froid, puis réparties en deux fractions, l'une destinée à la préparation d'un lysat cellulaire pour migration sur gel SDS-PAGE et l'autre à l'extraction d'ARN total. Le lysat cellulaire a été préparé par lyse du culot de cellules dans du tampon IPP150++. Les cellules ont ensuite été incubées 10 min sur glace, centrifugées à 14 000 rpm pendant 5 min puis le surnageant a été récupéré et sa concentration protéique mesurée par test de Bradford afin de permettre un chargement homogène de protéines sur gel SDS-PAGE pour une évaluation de l'expression protéique par *western blot*. L'ARN total de la deuxième fraction a été extrait en suivant la procédure du kit *NucleoSpin RNA extraction kit (Macherey-Nagel)*.

4.14.2 Essai RACE-PAT :

Une première étape de ligation d'un oligonucléotide ARN en 3' des ARN totaux a été effectuée. Pour ce faire, 50 pmoles d'ARN R2 a été ajouté à 1 μ g de chaque échantillon d'ARN total en présence de 1U/ μ l de *T4 RNA ligase 1 (New England Biolabs)* et d'1 mM ATP dans du tampon *T4 RNA ligase* fourni avec l'enzyme dans un volume final de 10 μ l. Après 2h d'incubation à 37°C, l'enzyme a été inactivée par incubation pendant 10 min à 65°C. Les ARN totaux ligués à R2 ont ensuite été utilisés pour une réaction de transcription inverse. L'oligonucléotide OBS 4420, en partie complémentaire de l'ARN R2, a tout d'abord été incubé à 70°C pendant 2 min en présence de la moitié, en volume, de la réaction de ligation, puis du tampon *M-MuLV Reverse Transcriptase* complété par 0,5 mM dNTP, 2U/ μ l d'inhibiteurs de RNases RNasin (*Promega*) et 10U/ μ l *M-MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs)* a été ajouté. Après 1h de réaction à 42°C, la transcriptase inverse a été inactivée à 70°C pendant 10 min. Les fragments ADN ainsi obtenus ont

été finalement utilisés lors d'une réaction PCR. 1 µl de réaction de transcription inverse a été incubé avec 0,2 µM de OBS4069, une amorce spécifique du transcrit β-globine, et 0,2 µM de OBS 4437, une amorce partiellement complémentaire à OBS 4420 utilisé pour la transcription inverse, ainsi que 0,2 mM dNTP et 1,25 U/µl Taq Polymerase (*New England Biolabs*) dans du tampon *ThermoPol Reaction Buffer* fourni avec l'enzyme. Après une première étape de dénaturation de 30 sec à 94°C, la réaction PCR a suivi 30 cycles d'incubation à 94°C pendant 15 sec (dénaturation), 45°C pendant 15 sec (hybridation), 68°C pendant 15 sec (élongation) avant une étape d'élongation finale de 5 min à 68°C. Les produits PCR ainsi obtenus ont été mis à migrer sur un gel d'agarose 3%, 0,5 µg/ml BET durant 7h sous une tension de 90V. Le gel a finalement été observé à l'aide d'un appareil *Typhoon 8600 (GE Healthcare Life Sciences)*.

4.15 Essai de prolifération cellulaire :

Des cultures U2OS subconfluentes en boîte de pétri de diamètre 10 cm ont été lavées avec du PBS, puis marquées avec le marqueur de prolifération eFluor 670 (*eBioscience*) selon les recommandations du fabricant pendant 10 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été incubées 5 min sur glace en présence de milieu de culture froid pour arrêter le marquage, puis lavées trois fois avec du milieu de culture à température ambiante et incubées à 37°C pendant 8h. Les cellules U2OS marquées à l'eFluor 670 ont ensuite étéensemencées dans des plaques de culture 12-puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées à l'aide du réactif *DharmaFECT™ DUO (Dharmacon)* avec 1 µg de plasmides exprimant des protéines BTG/Tob fusionnées à la GFP en N-terminal puis incubées sur la nuit à 37°C. 16h après transfection, les cellules de chaque puits ont été réensemencées dans des boîtes de pétri de 6 cm de diamètre, avant incubation pendant 48h à 37°C. Passé ce délai, les différentes populations cellulaires obtenues ont été remises en suspension dans du PBS puis centrifugées à 200 g pendant 3 min. Les culots obtenus ont finalement été remis en suspension dans du PBS puis mis en présence de 5 µg/ml d'iodure de propidium avant analyse par *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* à l'aide d'un appareil *FACSCALIBUR (Becton Dickinson)*.

4.16 Induction de BTG2 endogène par différents traitements :

Des cellules humaines subconfluentes U2OS ou MCF7 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Ces cellules ont ensuite été soit carencées en sérum avant re-complémentation en sérum, soit traitées avec 5 µg/ml doxorubicine (*Sigma*), 1 µM acide rétinoïque (*MP Biomedicals, LLC*) ou du

TPA (*Sigma*) à 20 ng/ml ou 50 ng/ml pendant plusieurs heures. Après traitement, les ARN totaux de chaque population cellulaire ont été extraits à l'aide du kit *NucleoSpin RNA extraction kit* (*Macherey-Nagel*). 500 ng d'ARN totaux ont été mis en présence de 0,5 µg d'oligo dT18 (*Thermoscientific*) dans un volume final de 10 µl, puis les mélanges ont été dénaturés pendant 10 min à 65°C et incubés 1 min sur glace. Les réactions ont ensuite été complétées avec 1 mM dNTPs et 0,5 U/µl *Transcriptor Reverse Transcriptase* (*Roche*) dans du tampon *Transcriptor RT reaction buffer* fourni avec l'enzyme puis incubées pendant 30 min à 55°C. Les réactions ont ensuite été incubées 5 min à 85°C afin d'inactiver la transcriptase inverse. Les ADNc obtenus ont été dilués au 1/80 dans une solution de *480 Light Cycler SyberGreen I Master Mix* (*Roche*) contenant soit 300 nM d'amorces OBS 6692 et OBS 6693 pour l'amplification de BTG2 soit 300 nM d'amorces OBS 6712 et OBS 6713 pour l'amplification du contrôle RPLP0, puis déposés dans une plaque PCR 96 puits (*Roche*) avant centrifugation 2 min à 1000 rpm et amplification qPCR à l'aide d'un appareil *Light Cycler® 480 Real-Time PCR Instrument* (*Roche*). Le niveau de l'ARNm de BTG2 a été calculé par rapport à celui de l'ARNm du contrôle endogène RPLP0 par la méthode de calcul $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.17 Expériences de traduction *in vitro* :

4.17.1 Transcription *in vitro* et ajout de coiffe en 5' des ARN :

Trois plasmides exprimant la *Renilla* Luciférase ou la *Firefly* Luciférase ont été préalablement linéarisés par une étape de digestion avec des enzymes de restriction afin que chaque transcrit présente ou non une queue poly(A), de séquence ((A)₂₅GUUAAU(A)₂₅UUU), codée par les plasmides. Précisément, 50 µg de plasmide T7-*Renilla Luc-SV40 poly(A)* (pBS 4848), T7-*Firefly Luc-A50* (pBS 530) ou T7-*Renilla Luc-A50* (pBS 5502) ont été digérés par 250 U d'enzyme XbaI, 250 U d'enzyme BamHI (constructions sans poly(A)) ou 250 U d'enzyme DraI (constructions avec poly(A)) pendant 1h à 37°C dans un volume total de 500 µl de tampon *CutSmart* (*New England Biolabs*). Les produits de digestion ont ensuite été purifiés par extraction au PCI et précipitation à l'éthanol comme décrit en 4.6. 50 µg de plasmide digéré ont servi de matrice pour une réaction de transcription en présence de 0,4 U/µl *T7 RNA Polymerase* (*Promega*), 10 mM DTT, 1U/µl d'inhibiteurs de RNAses RNasin (*Promega*) et 0,5 mM rNTPs dans un volume final de 500 µl de *Transcription optimized buffer*. Trois incubations d'1h à 37°C ont été effectuées, en ajoutant 200 U de *T7 RNA Polymerase* (*Promega*) après la première et la deuxième incubation. Les 50 µg de plasmides matrices ont ensuite été digérés par 50 U de *RQ1 RNase-free Dnase* (*Promega*) pendant

30 min à 37°C. Les ARN ainsi transcrits ont été purifiés par extraction au PCI et précipitation à l'éthanol comme décrit en 4.6. 50 µg d'ARN ont ensuite été coiffés pendant 30 min à 37°C à l'aide de la *Vaccinia Capping Enzyme* (*New England Biolabs*) en présence de 0,5 mM GTP et de 0,1 mM SAM dans un volume total de 100 µl de tampon *Capping buffer*. Les ARN ainsi coiffés ont été purifiés à l'aide du protocole *RNA clean up from reaction* du kit *NucleoSpin RNA* (*Macherey-Nagel*). 1 µg des ARN obtenus ont été migrés pendant 90 min à 600V sur un gel d'acrylamide dénaturant 4%. Le gel a ensuite été révélé par incubation pendant 10 min sous agitation avec le réactif *Stains-All* (*Fisher*). Une étape de décoloration à la lumière du jour ou sous une lampe a ensuite permis l'acquisition de l'image du gel avec un scanner (Figure M3).

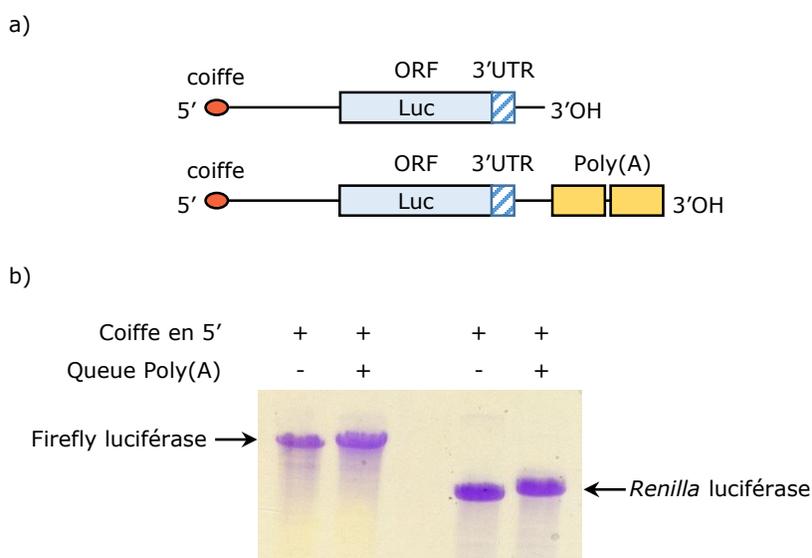


Figure M3 : Transcrits luciférase utilisés pour les essais de traduction *in vitro*.

(a) Représentation schématique des transcrits luciférase présentant ou non une queue poly(A) de séquence 25A-GUUUAU-25A-UUU. (b) Migration de 1 µg de chaque ARN purifié présentant une coiffe en 5' sur gel d'acrylamide dénaturant 4% coloré avec le réactif *Stains-All* (*Fisher*), capable de colorer aussi bien les ARN, l'ADN que les protéines. Les transcrits Firefly et *Renilla* ont été synthétisés en utilisant respectivement les vecteurs pBS530 et pBS5502. Après linéarisation par enzymes de restriction des plasmides codant pour les rapporteurs, ces derniers ont été transcrits avec la T7 RNA Polymérase (*Promega*). La coiffe en 5' a été ajoutée à l'aide de la *Vaccinia Capping Enzyme* (*New England Biolabs*), puis les ARN ont été purifiés à l'aide du kit *NucleoSpin RNA* (*Macherey-Nagel*).

4.17.2 Essai de dégradation d'un substrat luciférase par XRN1 après traitement apyrase :

Un transcrit luciférase (39 nM) a été mis en présence de 0,03 U/µl Apyrase (*New England Biolabs*) et de tampon NEB 3, durant 1h à 37°C. L'apyrase a ensuite été inactivée pendant 20 min à 65°C. La réaction a alors été complétée par 0,03 U/µl d'enzyme XRN1 (*New England Biolabs*) puis incubée pendant 1h à 37°C. La réaction a finalement été interrompue par l'ajout d'un volume de PCI. Les échantillons ont ensuite été purifiés par extraction au PCI et précipitation à l'éthanol

comme décrit en 4.6. Un volume de tampon de charge ARN a ensuite été ajouté avant dénaturation à 65°C pendant 5 min. Enfin, l'échantillon a été chargé et migré pendant 90 min à 600V sur un gel d'acrylamide dénaturant 4%. Le gel a ensuite été révélé par incubation pendant 10 min sous agitation avec le réactif *Stains-All* (Fisher). Une étape de décoloration à la lumière du jour ou sous une lampe a ensuite permis l'acquisition de l'image du gel avec un scanner.

4.17.3 Essai de traduction avec un lysat de réticulocytes de lapin :

75 nM d'un transcrite luciférase ont été incubés en présence de 10 µM d'un mélange d'acides aminés fourni avec le lysat de réticulocytes, de 0,8 U/µl d'inhibiteurs de RNAses RNasin (*Promega*), et de lysat de réticulocytes de lapins (*Promega*). Les réactions ont ensuite été incubées durant 90 min à 30°C, puis trois quarts de chaque réaction ont été répartis équitablement dans trois puits d'une plaque 96 puits (*Perkin ElmerTM*), auxquels sont ajoutés 50 µl de réactifs luciférases issus d'un des kits suivants : *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*, *Renilla Luciferase Assay System*, *Luciferase Assay system* (*Promega*). La plaque a ensuite été analysée par un lecteur de plaques, qui après injection et mélange de 50 µl de réactif, a permis une mesure de l'activité Firefly ou *Renilla* pendant 10 sec.

4.17.4 Préparation d'un extrait de cellules HeLa S3 permettant la traduction *in vitro* :

L'extrait a été obtenu en adaptant la méthode décrite dans *Current Protocols in Cell Biology* (Witherell, 2001). Une culture en suspension de 6l de cellules HeLa S3, présentant 430 000 cellules/ml avec 8% de cellules mortes, a été utilisée. Après centrifugation à 2 800 g pendant 10 min, les cellules ont été séquentiellement lavées au PBS froid et centrifugées 8 min à 640 g trois fois de suite. Le culot a ensuite été remis en suspension dans 1,5 volumes de tampon hypotonique, puis le gonflement des cellules a été permis par incubation sur glace pendant 10 min. Les cellules ont ensuite été lysées par 200 coups de piston A à l'aide d'un homogénéisateur Dounce de 40 ml. Une lyse de cellules supérieure à 95% a été vérifiée par addition de bleu de trypan à une fraction de l'extrait et observation au microscope optique à contraste de phase à un grossissement de 400 fois. L'extrait a ensuite été centrifugé consécutivement 5 min à 640 g (pour débarrasser l'extrait des débris cellulaires et des noyaux) puis 20 min à 10 400 g (pour débarrasser l'extrait des mitochondries). L'extrait a ensuite été dialysé durant 3h contre 4 litres de tampon de dialyse à l'aide de membranes de dialyse en collodion de 12 kDa. L'extrait ainsi dialysé a été centrifugé 10 min à 12 100 g avant aliquotage et stockage à -80°C.

4.17.5 Essai de traduction avec un extrait de cellules HeLa S3 :

L'extrait protéique obtenu précédemment a été traité ou non avec 0,005 KU/ μ l micrococcal nucléase (*New England Biolabs*) pendant divers temps à 37°C, puis complété avec 162,5 mM KOAc, 0,51 mM MgAc et du tampon de traduction. Diverses dilutions de protéines GST ou BTG2, réalisées dans 10 mM HEPES pH 7.5, 70 mM NaCl et 1 mM DTT, ont été ajoutées ou non à l'extrait ainsi que différentes concentrations de transcrit Firefly Luciférase et/ou de transcrit *Renilla* Luciférase polyadénylé ou non polyadénylé et présentant ou non une coiffe en 5'. Les réactions ont ensuite été incubées durant plusieurs heures à 30°C, puis trois quarts de chaque réaction ont été répartis équitablement dans trois puits d'une plaque 96 puits (*Perkin ElmerTM*), auxquels ont été ajoutés 50 μ l de réactifs issus d'un des kits cités précédemment. La plaque a ensuite été analysée par un lecteur de plaques, qui après injection et mélange de 50 μ l de réactif, a permis une mesure de l'activité Firefly ou *Renilla* pendant 10 sec.

4.17.6 Essai de dégradation d'un substrat luciférase dans l'extrait de traduction :

38,3 nM de transcrit luciférase ont été mis en présence d'extrait cellulaire d'HeLa S3 ainsi que de diverses concentrations de GST ou de domaine APRO de BTG2 sauvage purifiées. Les réactions ont été incubées à 30°C pendant une durée variable, puis complétées par du tampon PK et 0,30 μ g/ μ l protéinase K. Après 10 min de traitement à 37°C, un volume de PCI a été ajouté aux échantillons. Les échantillons ont été purifiés par extraction au PCI et précipitation à l'éthanol comme décrit en 4.6. Un volume de tampon de charge ARN a été ajouté aux échantillons puis, après dénaturation à 65°C pendant 5 min, les échantillons ont été finalement chargés et migrés sur gel d'acrylamide dénaturant 4%. Le gel a ensuite été révélé par incubation pendant 10 min sous agitation avec le réactif *Stains-All* (*Fisher*). Une étape de décoloration à la lumière du jour ou sous une lampe a permis l'acquisition de l'image du gel avec un scanner.

4.18 Tampons :

PBS : 137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 10 mM tampon Phosphate.

TBE : 89 mM Tris Base ; 89 mM Acide borique ; 2 mM EDTA.

Tampon Tris Glycine : 50 mM Tris Base ; 500 mM Glycine ; 0,1% SDS.

TA : 40 mM Tris base ; 0,114% acide acétique.

Tampon PK : 100 mM Tris-HCl pH 7.5 ; 10 mM EDTA ; 200 mM NaCl ; 1% SDS.

Tampon de traduction : 15,2 mM HEPES KOH pH 7.6 ; 8 mM Creatine Phosphate ; 20 µg/ml Creatine Phosphokinase ; 0,2 mM Spermidine ; 10 µM *Amino Acid Mix Complete (Promega)* ; 1,6 mM DTT ; 0,8 mM ATP ; 0,480 µM GTP.

Tampon de Dialyse de l'extrait de traduction : 10 mM HEPES pH 7.6 ; 90 mM KOAc ; 1,5 mM Mg(OAc)₂ pH 7.2 ; 1 mM DTT ajouté avant utilisation.

Tampon Hypotonique : 10 mM HEPES pH 7.6 ; 10 mM KOAc ; 1,5 mM Mg(OAc)₂ ajusté à pH 7.6 ; 2 mM DTT ajouté avant utilisation.

M-MuLV Reverse Transcriptase : 50 mM Tris-HCl ; 75 mM KCl ; 3 mM MgCl₂ ; 10 mM DTT pH 8,3.

Tampon IIA : 10 mM Tris-HCl pH8 ; 100 mM KCl ; 0,5 mM DTT ; 0,1% NP-40 ; 1 mM MgAc.

Tampon IIB : 20 mM HEPES KOH pH8 ; 100 mM KCl ; 10 mM DTT ; 0,1% NP-40 ; 1 mM MgAc.

Tampon IIC : 20 mM HEPES KOH pH8 ; 100 mM KCl ; 0,5 mM DTT ; 0,1% NP-40 ; 5 mM MgAc.

Tampon ICTris : 20 mM Tris-HCl pH8 ; 100 mM KCl ; 0,5 mM DTT ; 0,1% NP-40 ; 5 mM MgAc.

Tampon IID : 10 mM Tris-HCl pH8 ; 100 mM KCl ; 10 mM DTT ; 0,1% NP-40 ; 1 mM MgAc.

Tampon IIE : 20 mM HEPES KOH pH8 ; 100 mM KCl ; 10 mM DTT ; 0,1% NP-40 ; 5 mM MgAc.

Tampon IIF : 10 mM Tris pH8 ; 100 mM KCl ; 0,5 mM DTT ; 0,1% NP-40 ; 5 mM MgAc.

LiT 0,1 M : 100 mM LiAc ; 10 mM Tris-HCl pH 7,4.

Solution PEG : 1g/ml PEG4000 ; 0,1 M LiT.

Tampon de lavage A pour traitement PLA : 10 mM Tris ; 150 mM NaCl ; 0,05% Tween 20 ; pH 7,4 filtré à l'aide d'un filtre 0,22 µM.

Tampon de lavage B pour traitement PLA : 200 mM Tris ; 100 mM NaCl ; pH 7,5 filtré à l'aide d'un filtre 0,22 µM.

Tampon de charge ARN : 100 mM Tris-HCl pH 7.5 ; 1 mM EDTA ; 0,001% bleu de bromophérol ; 0,001% xylène cyanol ; 0,05% sodium dodecyl sulfate ; 92% formamide.

Tampon de charge pour EMSA 5X : 50% glycérol ; 1X bleu de bromophérol ; TBE 1X.

Tampon de charge pour protéines 3X : 0,05% bleu de bromophérol ; 50 mM Tris pH 6.8 ; 10% glycérol ; 2% SDS.

Tampon de lyse pour purification de protéines marquées polyhistidine : PBS ; 20 mM Imidazole ; 350 mM NaCl.

Tampon de lyse pour purification de protéines marquées GST : PBS.

Tampon de liaison pour co-précipitation avec protéines marquées polyhistidine : 50 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 40 mM Imidazole ; 300 mM NaCl ; 1 mM β -mercaptoéthanol ; 0,1% NP-40.

Tampon d'élution pour co-précipitation avec protéines marquées polyhistidine : 50 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 200 mM Imidazole ; 300 mM NaCl.

Tampon d'élution pour purification ou co-précipitation de protéines marquées GST : 10 mM glutathione réduite ; 50 mM Tris-HCl pH 8.0.

IPP150 : 10 mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 0,1% IGEPAL® CA-630 (*Sigma*).

IPP150++ : 10 mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 1% IGEPAL® CA-630 (*Sigma*).

IPP150Triton+++ : 10 mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 1% IGEPAL® CA-630 (*Sigma*) ; Triton100X 0,5% ; *cOmplete*TM EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (*Roche*) ; 1 mM PMSF (*Sigma*) ; 40,5 μ g/ml RNase A (*Macherey-Nagel*).

Bleu de Coomassie : 1 g/l Coomassie R-250 ; 45% éthanol ; 10% acide acétique.

Tableau 2 : Liste des plasmides utilisés.
La mention h indique qu'il s'agit de protéines humaines.

Plasmide	Vecteur	Insert	Marqueur de sélection
pBS 530	pBluescript	T7-LUC-(A)50	AmpR
pBS 2187	pEGFP-C3	eGFP	KanR
pBS 2189	pGEX-2T	/	AmpR
pBS 2280	pCIneo	/	AmpR
pBS 2517	pCIneo	hBTG2-HA	AmpR
pBS 2561	pET24-His	6His-hCNOT7	KanR
pBS 2894	pTet- β -globine	/	AmpR
pBS 2945	pOTB7	hPRMT1	ChlR
pBS 3164	pET24-His	6His-hPRMT1	KanR
pBS 3352	pGEX-2T	hBTG2(APRO)	AmpR
pBS 3415	pET24	6His-hPABPC1	KanR
pBS 3425	pCMV-SPORT6	hTob1	AmpR
pBS 3426	pBluescript	hBTG3(V1)	AmpR
pBS 3427	pCMV-SPORT6	hBTG3(V2)	AmpR
pBS 3499	pCIneo	hTob1(APRO)-HA	AmpR
pBS 3503	pGEX-2T	hTob1(APRO)	AmpR
pBS 3505	pCIneo	hBTG2(APRO)-HA	AmpR
pBS 4403	pP6	/	AmpR/LEU2
pBS 4406	pP6	hPABPC1(1-146)	AmpR/LEU2
pBS 4409	pP6	hCNOT7	AmpR/LEU2
pBS 4411	pB27	/	TetR/TRP1
pBS 4413	pB27	hBTG2(APRO) 1-126	TetR/TRP1
pBS 4568	pB27	hC2ORF29(61-282)	TetR/TRP1
pBS 4611	pET24-6His	6His-hPABPC1(1-190)	KanR
pBS 4848	pRL-TK	T7-RLUC-SV40 poly(A)	AmpR
pBS 4943	pET24-6His	6His-hPABPC1(1-99)	KanR
pBS 4959	pEGFP-N2	/	KanR
pBS 5027	pCIneo	hBTG2(APRO) 21+	AmpR
pBS 5028	pCIneo	hBTG2(APRO) 71+	AmpR
pBS 5067	pCIneo	hBTG2(APRO) mut4	AmpR
pBS 5073	pCIneo	hBTG2(APRO) mut1	AmpR
pBS 5078	pCIneo	hBTG2(APRO) mut3	AmpR
pBS 5079	pCIneo	hBTG2(APRO) mut6	AmpR
pBS 5080	pCIneo	hBTG2(APRO) mut7	AmpR
pBS 5189	pEGFP-C3	hBTG2(APRO)-HA	KanR
pBS 5191	pEGFP-C3	hBTG2(APRO) mut71+-HA	KanR
pBS 5192	pEGFP-C3	hBTG2(APRO) mut 3-HA	KanR

pBS 5193	pEGFP-C3	hBTG2(APRO) mut boxC-HA	KanR
pBS 5194	pEGFP-C3	hTob1(APRO)-HA	KanR
pBS 5295	pEGFP-C3	hBTG2-HA	KanR
pBS 5298	pGEX2T	hBTG2(APRO) mut boxC	AmpR
pBS 5335	pBluescriptR	hBTG4	AmpR
pBS 5340	pCIneo	hBTG3(V1)-HA	AmpR
pBS 5341	pCIneo	hBTG3(V2)-HA	AmpR
pBS 5342	pCIneo	hBTG4-HA	AmpR
pBS 5367	pEGFP-C3	hBTG3(V1)	KanR
pBS 5368	pEGFP-C3	hBTG3(V2)	KanR
pBS 5369	pEGFP-C3	hBTG4	KanR
pBS 5430	pEGFP-C3	hTob1	KanR
pBS 5498	pP6	hPRMT1	AmpR
pBS 5499	pCIneo	hBTG2(APRO) 71+boxC	AmpR
pBS 5502	pBluescript	T7-RLUC-(A)50 opti	AmpR

Tableau 3 : Séquences des oligonucléotides utilisés.

Oligo	Séquence
OBS 633	CCGCTCGAGACCATGAGCCACGGGAAGGGAA
OBS 668	GGATGCGGCCGCAATCATGAGCCACGGGAAGGGAAACCGA
OBS 1781	GGATCTCGAGCTAGCTGGAGACTGCCATCAC
OBS 2236	CTCCCAGTTCAATTACAGC
OBS 2237	TCTAGTTGTGGTTTGTCC
OBS 3233	GGCACATGTTGGCCTCCTCGTACAAGACGCAG
OBS 4069	AATTCACCTCCTCAGGTGCAG
OBS 4420	CTGGAATTCGCGGTTAAATTAATACGACTCACTATAGGT
OBS 4437	CTGGAATTCGCGGTTAAA
OBS 5270	GAATTCGGGGCCGGACGG
OBS 5271	CTGCAGGTCGAGGGGCCCCAG
OBS 5449	CCGCATTGGGGAGAAGGGCCCCGTCAAGGTCTTGTACGAGGAGGC
OBS 5450	GCCTCCTCGTACAAGACCTTGACGGGGCCCTTCTCCCAATGCGG
OBS 5921	ATCGGCCGGACGGGCCATGAGCCACGGGAAGGGA
OBS 5922	ATCGGCCCCAGTGGCCTCAGGCCTCCTCGTACAAGAC
OBS 6514	TTAAGGTCTTCAGCGAGGCGCTCGAGCGCGCACTCACAGAGCAC
OBS 6515	GTGCTCTGTGAGTGCGCGCTCGAGCGCCTCGCTGAAGACCTTAA
OBS 6516	AGCGAGCTGACCCTGGCCGTCGACCCCTATGAG
OBS 6517	CTCATAGGGGTGACGGCCAGGGTCAGCTCGCT
OBS 6556	AGGGAACCGACATGCAGCTGGAGATCCAGGCCGCCGTGGGCTTCC
OBS 6557	GGAAGCCCACGGCGGCCTGGATCTCCAGCTGCATGTCGGTTCCT
OBS 6558	ACCCGGGGCTGCGTGCCGCGGCGGAGGCTTAACGTCTTCAGCGGG
OBS 6559	CCCGCTGAAGACGTTAAGCCTCCGCCGCGGCACGCAGCCCCGGGT
OBS 6560	CCCCATCATCAGCCAGGTGGCCAAGGAGTCCGGACTCAGCCAGCC
OBS 6561	GGCTGGCTGAGTCCGGACTCCTTGGCCACCTGGCTGATGATGGGG
OBS 6562	CAGATCGGACTCAGCATCGACCAGCTCCGCGGGCTGCTGCCAGCGAG
OBS 6563	CTCGCTGGGCAGCAGCCCGCGGAGCTGGTCGATGCTGAGTCCGATCTG
OBS 6564	CCATCTGCGTCTTGTACGTGGACGACAATATGTACCCATACGAC
OBS 6565	GTCGTATGGGTACATATTGTCGTCCACGTACAAGACGCAGATGG
OBS 6692	GCGAGCAGAGGCTTAAGGT
OBS 6693	GGGAAACCAGTGGTGTGTTGTA
OBS 6712	GAAGTCACTGTGCCAGCCCA
OBS 6713	GAAGGTGTAATCCGTCTCCA
OBS 6895	TGCCTCGAGATGAAGAATGAAATTGCTG
OBS 6896	TGCGAATTCTTAGTGAGGTGCTAACATG
OBS 6897	TGCCCATGGCGTGAGGTGCTAACATGTG
OBS 6898	TGCCTCGAGATGAGAGATGAAATTGC
OBS 6899	TGCGAATTCCTACAGTTTTGTTCTTCC

OBS 6900	TGCACATGTGCAGTTTTGTTCTTTCCAT
OBS 7018	TGCCTCGAGATGCAGCTTGAAATCCAAGTA
OBS 7019	TGCGAATTCTTAGTTAGCCATAACAGGCTG
OBS 7170	CTGGGATCCTTATGGCGGCAGCCGAGGCC
OBS 7171	CTGCTCGAGTCAGCGCATCCGGTAGTCGG
OBS 7237	ATCGGCCGGACGGGCCATGAAGAATGAAATTGCT
OBS 7238	ATCGGCCCCAGTGGCCTTATTCTTCATCTGAAGAAGA
OBS 7239	ATCGGCCCCAGTGGCCTTAGCTGGCAACAATGAAT
OBS 7240	ATCGGCCCCAGTGGCCTTAGTGAGGTGCTAACAT
OBS 7241	CTGGGATCCTTATGAACCCCAAGTGCC
OBS 7242	CTGGGATCCTTCAGGAACCTTTGACTGCT
OBS 7243	CTGTCTAGATTAAACAGTTGGAACACC
OBS 7315	ATCGGATCCGCGGCCACCATGAGCCACGGGAAGGGA
OBS 7316	ATCCTCGAGGCTGGAGACTGCCATCACGT
Oligo R2	5'-CCUAUAGUGAGUCGUAUUA-3'

5. RÉFÉRENCES

5 RÉFÉRENCES :

- Ajima, R.**, Akiyama, T., Usui, M., Yoneda, M., Yoshida, Y., Nakamura, T., Minowa, O., Noda, M., Tanaka, S., Noda, T., *et al.* (2008). Osteoporotic bone formation in mice lacking *tob2*; involvement of *Tob2* in RANK ligand expression and osteoclasts differentiation. *FEBS Lett* 582, 1313-1318.
- Ajima, R.**, Ikematsu, N., Ohsugi, M., Yoshida, Y., and Yamamoto, T. (2000). Cloning and characterization of the mouse *tob2* gene. *Gene* 253, 215-220.
- Ajiro, M.**, Katagiri, T., Ueda, K., Nakagawa, H., Fukukawa, C., Lin, M.L., Park, J.H., Nishidate, T., Daigo, Y., and Nakamura, Y. (2009). Involvement of RQCD1 overexpression, a novel cancer-testis antigen, in the Akt pathway in breast cancer cells. *Int J Oncol* 35, 673-681.
- Alanazi, I.**, Hoffmann, P., and Adelson, D.L. (2015). MicroRNAs are part of the regulatory network that controls EGF induced apoptosis, including elements of the JAK/STAT pathway, in A431 cells. *PLoS One* 10, e0120337.
- Albert, T.K.**, Hanzawa, H., Legtenberg, Y.I., de Ruwe, M.J., van den Heuvel, F.A., Collart, M.A., Boelens, R., and Timmers, H.T. (2002). Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex. *EMBO J* 21, 355-364.
- Albert, T.K.**, Lemaire, M., van Berkum, N.L., Gentz, R., Collart, M.A., and Timmers, H.T. (2000). Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic Acids Res* 28, 809-817.
- Albrecht, M.**, and Lengauer, T. (2004). Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 129-138.
- Altaf, M.**, Auger, A., Monnet-Saksouk, J., Brodeur, J., Piquet, S., Cramet, M., Bouchard, N., Lacoste, N., Utley, R.T., Gaudreau, L., *et al.* (2010). NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex. *J Biol Chem* 285, 15966-15977.
- Alvarez-Saavedra, M.**, Antoun, G., Yanagiya, A., Oliva-Hernandez, R., Cornejo-Palma, D., Perez-Iratxeta, C., Sonenberg, N., and Cheng, H.Y. (2011). miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Hum Mol Genet* 20, 731-751.
- Anelli, T.**, Alessio, M., Bachi, A., Bergamelli, L., Bertoli, G., Camerini, S., Mezghrani, A., Ruffato, E., Simmen, T., and Sitia, R. (2003). Thiol-mediated protein retention in the endoplasmic reticulum: the role of ERp44. *EMBO J* 22, 5015-5022.
- Apponi, L.H.**, Leung, S.W., Williams, K.R., Valentini, S.R., Corbett, A.H., and Pavlath, G.K. (2010). Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Hum Mol Genet* 19, 1058-1065.
- Arribere, J.A.**, Doudna, J.A., and Gilbert, W.V. (2011). Reconsidering movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and P bodies. *Mol Cell* 44, 745-758.
- Aslam, A.**, Mittal, S., Koch, F., Andrau, J.C., and Winkler, G.S. (2009). The Ccr4-NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation. *Mol Biol Cell* 20, 3840-3850.
- Ayache, J.**, Benard, M., Ernoult-Lange, M., Minshall, N., Standart, N., Kress, M., and Weil, D. (2015). P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Mol Biol Cell* 26, 2579-2595.
- Baer, B.W.**, and Kornberg, R.D. (1983). The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J Cell Biol* 96, 717-721.
- Bakker, W.J.**, Blazquez-Domingo, M., Kolbus, A., Besooyen, J., Steinlein, P., Beug, H., Coffey, P.J., Lowenberg, B., von Lindern, M., and van Dijk, T.B. (2004). FoxO3a regulates erythroid

differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol* 164, 175-184.

Basquin, J., Roudko, V.V., Rode, M., Basquin, C., Seraphin, B., and Conti, E. (2012). Architecture of the nucleosome module of the yeast Ccr4-not complex: the Not1-Caf1-Ccr4 interaction. *Mol Cell* 48, 207-218.

Bawankar, P., Loh, B., Wohlbold, L., Schmidt, S., and Izaurralde, E. (2013). NOT10 and C2orf29/NOT11 form a conserved module of the CCR4-NOT complex that docks onto the NOT1 N-terminal domain. *RNA Biol* 10, 228-244.

Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* 334, 1524-1529.

Benoist, C., and Chambon, P. (1981). In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature* 290, 304-310.

Berndt, H., Harnisch, C., Rammelt, C., Stohr, N., Zirkel, A., Dohm, J.C., Himmelbauer, H., Tavanez, J.P., Huttelmaier, S., and Wahle, E. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA* 18, 958-972.

Berthet, C., Guehenneux, F., Revol, V., Samarut, C., Lukaszewicz, A., Dehay, C., Dumontet, C., Magaud, J.P., and Rouault, J.P. (2002). Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects. *Genes Cells* 7, 29-39.

Berthet, C., Morera, A.M., Asensio, M.J., Chauvin, M.A., Morel, A.P., Dijoud, F., Magaud, J.P., Durand, P., and Rouault, J.P. (2004). CCR4-associated factor CAF1 is an essential factor for spermatogenesis. *Mol Cell Biol* 24, 5808-5820.

Bhandari, D., Raisch, T., Weichenrieder, O., Jonas, S., and Izaurralde, E. (2014). Structural basis for the Nanos-mediated recruitment of the CCR4-NOT complex and translational repression. *Genes Dev* 28, 888-901.

Bhaskar, V., Roudko, V., Basquin, J., Sharma, K., Urlaub, H., Seraphin, B., and Conti, E. (2013). Structure and RNA-binding properties of the Not1-Not2-Not5 module of the yeast Ccr4-Not complex. *Nat Struct Mol Biol* 20, 1281-1288.

Bianchin, C., Mauxion, F., Sentis, S., Seraphin, B., and Corbo, L. (2005). Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *RNA* 11, 487-494.

Birot, A., Duret, L., Bartholin, L., Santalucia, B., Tigaud, I., Magaud, J., and Rouault, J. (2000). Identification and molecular analysis of BANP. *Gene* 253, 189-196.

Bober, J., Nguyen, T., Mahe, S., and Monget, P. (2008). In silico identification and molecular characterization of genes predominantly expressed in the fish oocyte. *BMC Genomics* 9, 499.

Boeck, R., Tarun, S., Jr., Rieger, M., Deardorff, J.A., Muller-Auer, S., and Sachs, A.B. (1996). The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *J Biol Chem* 271, 432-438.

Bogdan, J.A., Adams-Burton, C., Pedicord, D.L., Sukovich, D.A., Benfield, P.A., Corjay, M.H., Stoltenberg, J.K., and Dicker, I.B. (1998). Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1. *Biochem J* 336 (Pt 2), 471-481.

Boland, A., Chen, Y., Raisch, T., Jonas, S., Kuzuoglu-Ozturk, D., Wohlbold, L., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2013). Structure and assembly of the NOT module of the human CCR4-NOT complex. *Nat Struct Mol Biol* 20, 1289-1297.

Bradbury, A., Possenti, R., Shooter, E.M., and Tirone, F. (1991). Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3353-3357.

- Braun, J.E.,** Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol Cell* 44, 120-133.
- Braun, J.E.,** Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C.T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M., and Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1324-1331.
- Brengues, M.,** Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310, 486-489.
- Bresson, S.M.,** and Conrad, N.K. (2013). The human nuclear poly(a)-binding protein promotes RNA hyperadenylation and decay. *PLoS Genet* 9, e1003893.
- Buane, P.,** Corrente, G., Micheli, L., Palena, A., Lavia, P., Spadafora, C., Lakshmana, M.K., Rinaldi, A., Banfi, S., Quarto, M., *et al.* (2000). Cloning of PC3B, a novel member of the PC3/BTG/TOB family of growth inhibitory genes, highly expressed in the olfactory epithelium. *Genomics* 68, 253-263.
- Buchan, J.R.,** Muhlrad, D., and Parker, R. (2008). P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 183, 441-455.
- Burns, K.H.,** Owens, G.E., Ogbonna, S.C., Nilson, J.H., and Matzuk, M.M. (2003). Expression profiling analyses of gonadotropin responses and tumor development in the absence of inhibins. *Endocrinology* 144, 4492-4507.
- Buschmann, J.,** Moritz, B., Jeske, M., Lilie, H., Schierhorn, A., and Wahle, E. (2013). Identification of *Drosophila* and human 7-methyl GMP-specific nucleotidases. *J Biol Chem* 288, 2441-2451.
- Busson, M.,** Carazo, A., Seyer, P., Grandemange, S., Casas, F., Pessemeesse, L., Rouault, J.P., Wrutniak-Cabello, C., and Cabello, G. (2005). Coactivation of nuclear receptors and myogenic factors induces the major BTG1 influence on muscle differentiation. *Oncogene* 24, 1698-1710.
- Cabibbo, A.,** Pagani, M., Fabbri, M., Rocchi, M., Farmery, M.R., Bulleid, N.J., and Sitia, R. (2000). ERO1-L, a human protein that favors disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275, 4827-4833.
- Canzoniere, D.,** Farioli-Vecchioli, S., Conti, F., Ciotti, M.T., Tata, A.M., Augusti-Tocco, G., Mattei, E., Lakshmana, M.K., Krizhanovsky, V., Reeves, S.A., *et al.* (2004). Dual control of neurogenesis by PC3 through cell cycle inhibition and induction of Math1. *J Neurosci* 24, 3355-3369.
- Caponigro, G.,** and Parker, R. (1995). Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast. *Genes Dev* 9, 2421-2432.
- Carletti, M.Z.,** and Christenson, L.K. (2009). Rapid effects of LH on gene expression in the mural granulosa cells of mouse periovulatory follicles. *Reproduction* 137, 843-855.
- Carmel, J.B.,** Kakinohana, O., Mestrlil, R., Young, W., Marsala, M., and Hart, R.P. (2004). Mediators of ischemic preconditioning identified by microarray analysis of rat spinal cord. *Exp Neurol* 185, 81-96.
- Cevher, M.A.,** Zhang, X., Fernandez, S., Kim, S., Baquero, J., Nilsson, P., Lee, S., Virtanen, A., and Kleiman, F.E. (2010). Nuclear deadenylation/polyadenylation factors regulate 3' processing in response to DNA damage. *EMBO J* 29, 1674-1687.
- Chamieh, H.,** Ballut, L., Bonneau, F., and Le Hir, H. (2008). NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat Struct Mol Biol* 15, 85-93.
- Chang, H.,** Lim, J., Ha, M., and Kim, V.N. (2014). TAIL-seq: genome-wide determination of poly(A) tail length and 3' end modifications. *Mol Cell* 53, 1044-1052.

Chapat, C., Kolytcheff, C., Le Romancer, M., Auboeuf, D., De La Grange, P., Chettab, K., Sentis, S., and Corbo, L. (2013). hCAF1/CNOT7 regulates interferon signalling by targeting STAT1. *EMBO J* 32, 688-700.

Chekulaeva, M., Mathys, H., Zipprich, J.T., Attig, J., Colic, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2011). miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1218-1226.

Chen, C., Ito, K., Takahashi, A., Wang, G., Suzuki, T., Nakazawa, T., Yamamoto, T., and Yokoyama, K. (2011). Distinct expression patterns of the subunits of the CCR4-NOT deadenylase complex during neural development. *Biochem Biophys Res Commun* 411, 360-364.

Chen, J., Rappsilber, J., Chiang, Y.C., Russell, P., Mann, M., and Denis, C.L. (2001). Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex. *J Mol Biol* 314, 683-694.

Chen, X., Chen, G., Cao, X., Zhou, Y., Yang, T., and Wei, S. (2013). Downregulation of BTG3 in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 437, 173-178.

Chen, Y., Boland, A., Kuzuoglu-Ozturk, D., Bawankar, P., Loh, B., Chang, C.T., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2014). A DDX6-CNOT1 complex and W-binding pockets in CNOT9 reveal direct links between miRNA target recognition and silencing. *Mol Cell* 54, 737-750.

Chen, Y., Wang, C., Wu, J., and Li, L. (2015). BTG/Tob family members Tob1 and Tob2 inhibit proliferation of mouse embryonic stem cells via Id3 mRNA degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 462, 208-214.

Cheng, Y.C., Chen, P.H., Chiang, H.Y., Suen, C.S., Hwang, M.J., Lin, T.Y., Yang, H.C., Lin, W.C., Lai, P.L., and Shieh, S.Y. (2015). Candidate tumor suppressor B-cell translocation gene 3 impedes neoplastic progression by suppression of AKT. *Cell Death Dis* 6, e1584.

Cheng, Y.C., Lin, T.Y., and Shieh, S.Y. (2013). Candidate tumor suppressor BTG3 maintains genomic stability by promoting Lys63-linked ubiquitination and activation of the checkpoint kinase CHK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5993-5998.

Cheng, Z., Saito, K., Pisarev, A.V., Wada, M., Pisareva, V.P., Pestova, T.V., Gajda, M., Round, A., Kong, C., Lim, M., *et al.* (2009). Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev* 23, 1106-1118.

Chicoine, J., Benoit, P., Gamberi, C., Paliouras, M., Simonelig, M., and Lasko, P. (2007). Bicaudal-C recruits CCR4-NOT deadenylase to target mRNAs and regulates oogenesis, cytoskeletal organization, and its own expression. *Dev Cell* 13, 691-704.

Cho, B.O., Jeong, Y.W., Kim, S.H., Park, K., Lee, J.H., Kweon, G.R., and Park, J.C. (2008). Up-regulation of the BTG2 gene in TPA- or RA-treated HL-60 cell lines. *Oncol Rep* 19, 633-637.

Choi, J.A., and Lim, I.K. (2013). TIS21/BTG2 inhibits invadopodia formation by downregulating reactive oxygen species level in MDA-MB-231 cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 139, 1657-1665.

Choi, K.S., Kim, J.Y., Lim, S.K., Choi, Y.W., Kim, Y.H., Kang, S.Y., Park, T.J., and Lim, I.K. (2012). TIS21/(BTG2/PC3) accelerates the repair of DNA double strand breaks by enhancing Mre11 methylation and blocking damage signal transfer to the Chk2(T68)-p53(S20) pathway. *DNA Repair (Amst)* 11, 965-975.

Chou, C.F., Mulky, A., Maitra, S., Lin, W.J., Gherzi, R., Kappes, J., and Chen, C.Y. (2006). Tethering KSRP, a decay-promoting AU-rich element-binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay. *Mol Cell Biol* 26, 3695-3706.

Chu, T., Dufort, I., and Sirard, M.A. (2012). Effect of ovarian stimulation on oocyte gene expression in cattle. *Theriogenology* 77, 1928-1938.

Collart, M.A., and Struhl, K. (1994). NOT1(CDC39), NOT2(CDC36), NOT3, and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. *Genes Dev* 8, 525-537.

Coller, J., and Parker, R. (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122, 875-886.

Coppola, V., Musumeci, M., Patrizii, M., Cannistraci, A., Addario, A., Maugeri-Sacca, M., Biffoni, M., Francescangeli, F., Cordenonsi, M., Piccolo, S., *et al.* (2013). BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 32, 1843-1853.

Corrente, G., Guardavaccaro, D., and Tirone, F. (2002). PC3 potentiates NGF-induced differentiation and protects neurons from apoptosis. *Neuroreport* 13, 417-422.

Cortes, U., Moyret-Lalle, C., Falette, N., Duriez, C., Ghissassi, F.E., Barnas, C., Morel, A.P., Hainaut, P., Magaud, J.P., and Puisieux, A. (2000). BTG gene expression in the p53-dependent and -independent cellular response to DNA damage. *Mol Carcinog* 27, 57-64.

Corvol, J.C., Pelletier, D., Henry, R.G., Caillier, S.J., Wang, J., Pappas, D., Casazza, S., Okuda, D.T., Hauser, S.L., Oksenberg, J.R., *et al.* (2008). Abrogation of T cell quiescence characterizes patients at high risk for multiple sclerosis after the initial neurological event. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11839-11844.

Cougot, N., Babajko, S., and Seraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol* 165, 31-40.

Dagley, M.J., Gentle, I.E., Beilharz, T.H., Pettolino, F.A., Djordjevic, J.T., Lo, T.L., Uwamahoro, N., Rupasinghe, T., Tull, D.L., McConville, M., *et al.* (2011). Cell wall integrity is linked to mitochondria and phospholipid homeostasis in *Candida albicans* through the activity of the post-transcriptional regulator Ccr4-Pop2. *Mol Microbiol* 79, 968-989.

Deneberg, S., Kanduri, M., Ali, D., Bengtzen, S., Karimi, M., Qu, Y., Kimby, E., Mansouri, L., Rosenquist, R., Lennartsson, A., *et al.* (2014). microRNA-34b/c on chromosome 11q23 is aberrantly methylated in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics* 9, 910-917.

Deng, B., Zhao, Y., Gou, W., Chen, S., Mao, X., Takano, Y., and Zheng, H. (2013). Decreased expression of BTG3 was linked to carcinogenesis, aggressiveness, and prognosis of ovarian carcinoma. *Tumour Biol* 34, 2617-2624.

Deng, W., Malecova, B., Oelgeschlager, T., and Roberts, S.G. (2009). TFIIB recognition elements control the TFIIA-NC2 axis in transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* 29, 1389-1400.

Denis, C.L. (1984). Identification of new genes involved in the regulation of yeast alcohol dehydrogenase II. *Genetics* 108, 833-844.

Deo, R.C., Bonanno, J.B., Sonenberg, N., and Burley, S.K. (1999). Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* 98, 835-845.

Derry, M.C., Yanagiya, A., Martineau, Y., and Sonenberg, N. (2006). Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, 537-543.

Doidge, R., Mittal, S., Aslam, A., and Winkler, G.S. (2012). The anti-proliferative activity of BTG/TOB proteins is mediated via the Caf1a (CNOT7) and Caf1b (CNOT8) deadenylase subunits of the Ccr4-not complex. *PLoS One* 7, e51331.

Doma, M.K., and Parker, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440, 561-564.

Dong, W., Tu, S., Xie, J., Sun, P., Wu, Y., and Wang, L. (2009). Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of BTG4 gene in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 132-138.

- Douris, N., Kojima, S., Pan, X., Lerch-Gaggl, A.F., Duong, S.Q., Hussain, M.M., and Green, C.B.** (2011). Nocturnin regulates circadian trafficking of dietary lipid in intestinal enterocytes. *Curr Biol* *21*, 1347-1355.
- Draker, R., Ng, M.K., Sarcinella, E., Ignatchenko, V., Kislinger, T., and Cheung, P.** (2012). A combination of H2A.Z and H4 acetylation recruits Brd2 to chromatin during transcriptional activation. *PLoS Genet* *8*, e1003047.
- Du, Y., Liu, P., Zang, W., Wang, Y., Chen, X., Li, M., and Zhao, G.** (2015). BTG3 upregulation induces cell apoptosis and suppresses invasion in esophageal adenocarcinoma. *Mol Cell Biochem* *404*, 31-38.
- Durand, S., Cougot, N., Mahuteau-Betzer, F., Nguyen, C.H., Grierson, D.S., Bertrand, E., Tazi, J., and Lejeune, F.** (2007). Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J Cell Biol* *178*, 1145-1160.
- Duriez, C., Falette, N., Audouy, C., Moyret-Lalle, C., Bensaad, K., Courtois, S., Wang, Q., Soussi, T., and Puisieux, A.** (2002). The human BTG2/TIS21/PC3 gene: genomic structure, transcriptional regulation and evaluation as a candidate tumor suppressor gene. *Gene* *282*, 207-214.
- Eckmann, C.R., Rammelt, C., and Wahle, E.** (2011). Control of poly(A) tail length. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* *2*, 348-361.
- el-Ghissassi, F., Valsesia-Wittmann, S., Falette, N., Duriez, C., Walden, P.D., and Puisieux, A.** (2002). BTG2(TIS21/PC3) induces neuronal differentiation and prevents apoptosis of terminally differentiated PC12 cells. *Oncogene* *21*, 6772-6778.
- Elis, S., Batellier, F., Couty, I., Balzergue, S., Martin-Magniette, M.L., Monget, P., Blesbois, E., and Govoroun, M.S.** (2008). Search for the genes involved in oocyte maturation and early embryo development in the hen. *BMC Genomics* *9*, 110.
- Elkon, R., Ugalde, A.P., and Agami, R.** (2013). Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet* *14*, 496-506.
- Elmore, L.W., Di, X., Dumur, C., Holt, S.E., and Gewirtz, D.A.** (2005). Evasion of a single-step, chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells: implications for treatment response. *Clin Cancer Res* *11*, 2637-2643.
- Eystathioy, T., Jakymiw, A., Chan, E.K., Seraphin, B., Cougot, N., and Fritzler, M.J.** (2003). The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* *9*, 1171-1173.
- Ezzeddine, N., Chang, T.C., Zhu, W., Yamashita, A., Chen, C.Y., Zhong, Z., Yamashita, Y., Zheng, D., and Shyu, A.B.** (2007). Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *Mol Cell Biol* *27*, 7791-7801.
- Ezzeddine, N., Chen, C.Y., and Shyu, A.B.** (2012). Evidence providing new insights into TOB-promoted deadenylation and supporting a link between TOB's deadenylation-enhancing and antiproliferative activities. *Mol Cell Biol* *32*, 1089-1098.
- Fabian, M.R., Frank, F., Rouya, C., Siddiqui, N., Lai, W.S., Karetnikov, A., Blackshear, P.J., Nagar, B., and Sonenberg, N.** (2013). Structural basis for the recruitment of the human CCR4-NOT deadenylase complex by tristetraprolin. *Nat Struct Mol Biol* *20*, 735-739.
- Farber, V., Erben, E., Sharma, S., Stoecklin, G., and Clayton, C.** (2013). Trypanosome CNOT10 is essential for the integrity of the NOT deadenylase complex and for degradation of many mRNAs. *Nucleic Acids Res* *41*, 1211-1222.
- Farioli-Vecchioli, S., Cina, I., Ceccarelli, M., Micheli, L., Leonardi, L., Ciotti, M.T., De Bardi, M., Di Rocco, C., Pallini, R., Cavallaro, S., et al.** (2012a). Tis21 knock-out enhances the frequency

of medulloblastoma in Patched1 heterozygous mice by inhibiting the Cxcl3-dependent migration of cerebellar neurons. *J Neurosci* 32, 15547-15564.

Farioli-Vecchioli, S., Micheli, L., Sarauli, D., Ceccarelli, M., Cannas, S., Scardigli, R., Leonardi, L., Cina, I., Costanzi, M., Ciotti, M.T., *et al.* (2012b). Btg1 is Required to Maintain the Pool of Stem and Progenitor Cells of the Dentate Gyrus and Subventricular Zone. *Front Neurosci* 6, 124.

Farioli-Vecchioli, S., Sarauli, D., Costanzi, M., Leonardi, L., Cina, I., Micheli, L., Nutini, M., Longone, P., Oh, S.P., Cestari, V., *et al.* (2009). Impaired terminal differentiation of hippocampal granule neurons and defective contextual memory in PC3/Tis21 knockout mice. *PLoS One* 4, e8339.

Farioli-Vecchioli, S., Sarauli, D., Costanzi, M., Pacioni, S., Cina, I., Aceti, M., Micheli, L., Bacci, A., Cestari, V., and Tirone, F. (2008). The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. *PLoS Biol* 6, e246.

Farioli-Vecchioli, S., Tanori, M., Micheli, L., Mancuso, M., Leonardi, L., Saran, A., Ciotti, M.T., Ferretti, E., Gulino, A., Pazzaglia, S., *et al.* (2007). Inhibition of medulloblastoma tumorigenesis by the antiproliferative and pro-differentiative gene PC3. *FASEB J* 21, 2215-2225.

Feng, M., Li, Z., Aau, M., Wong, C.H., Yang, X., and Yu, Q. (2011). Myc/miR-378/TOB2/cyclin D1 functional module regulates oncogenic transformation. *Oncogene* 30, 2242-2251.

Fenger-Gron, M., Fillman, C., Norrild, B., and Lykke-Andersen, J. (2005). Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol Cell* 20, 905-915.

Ficazzola, M.A., Fraiman, M., Gitlin, J., Woo, K., Melamed, J., Rubin, M.A., and Walden, P.D. (2001). Antiproliferative B cell translocation gene 2 protein is down-regulated post-transcriptionally as an early event in prostate carcinogenesis. *Carcinogenesis* 22, 1271-1279.

Fiedler, F., Mallo, G.V., Bodeker, H., Keim, V., Dagorn, J.C., and Iovanna, J.L. (1998). Overexpression of the PC3/TIS21/BTG2 mRNA is part of the stress response induced by acute pancreatitis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 562-565.

Fletcher, B.S., Lim, R.W., Varnum, B.C., Kujubu, D.A., Koski, R.A., and Herschman, H.R. (1991). Structure and expression of TIS21, a primary response gene induced by growth factors and tumor promoters. *J Biol Chem* 266, 14511-14518.

Gamez, B., Rodriguez-Carballo, E., Bartrons, R., Rosa, J.L., and Ventura, F. (2013). MicroRNA-322 (miR-322) and its target protein Tob2 modulate Osterix (Osx) mRNA stability. *J Biol Chem* 288, 14264-14275.

Gandhi, R., Manzoor, M., and Hudak, K.A. (2008). Depurination of Brome mosaic virus RNA3 in vivo results in translation-dependent accelerated degradation of the viral RNA. *J Biol Chem* 283, 32218-32228.

Garapaty, S., Mahajan, M.A., and Samuels, H.H. (2008). Components of the CCR4-NOT complex function as nuclear hormone receptor coactivators via association with the NRC-interacting Factor NIF-1. *J Biol Chem* 283, 6806-6816.

Garces, R.G., Gillon, W., and Pai, E.F. (2007). Atomic model of human Rcd-1 reveals an armadillo-like-repeat protein with in vitro nucleic acid binding properties. *Protein Sci* 16, 176-188.

Gherzi, R., Lee, K.Y., Briata, P., Wegmuller, D., Moroni, C., Karin, M., and Chen, C.Y. (2004). A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell* 14, 571-583.

Gou, W.F., Yang, X.F., Shen, D.F., Zhao, S., Liu, Y.P., Sun, H.Z., Takano, Y., Su, R.J., Luo, J.S., and Zheng, H.C. (2015). The roles of BTG3 expression in gastric cancer: a potential marker for carcinogenesis and a target molecule for gene therapy. *Oncotarget* 6, 19841-19867.

Green, C.B., Douris, N., Kojima, S., Strayer, C.A., Fogerty, J., Lourim, D., Keller, S.R., and Besharse, J.C. (2007). Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 9888-9893.

Gronke, S., Bickmeyer, I., Wunderlich, R., Jackle, H., and Kuhnlein, R.P. (2009). Curled encodes the *Drosophila* homolog of the vertebrate circadian deadenylase Nocturnin. *Genetics* *183*, 219-232.

Guardavaccaro, D., Corrente, G., Covone, F., Micheli, L., D'Agnano, I., Starace, G., Caruso, M., and Tirone, F. (2000). Arrest of G(1)-S progression by the p53-inducible gene PC3 is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription. *Mol Cell Biol* *20*, 1797-1815.

Guehenneux, F., Duret, L., Callanan, M.B., Bouhas, R., Hayette, S., Berthet, C., Samarut, C., Rimokh, R., Birot, A.M., Wang, Q., *et al.* (1997). Cloning of the mouse BTG3 gene and definition of a new gene family (the BTG family) involved in the negative control of the cell cycle. *Leukemia* *11*, 370-375.

Gutierrez-Camino, A., Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Pinan, M.A., Garcia-Miguel, P., Sanchez-Toledo, J., Carbone Baneres, A., Uriz, J., Navajas, A., and Garcia-Orad, A. (2014). Noncoding RNA-related polymorphisms in pediatric acute lymphoblastic leukemia susceptibility. *Pediatr Res* *75*, 767-773.

Haas, M., Siegert, M., Schurmann, A., Sodeik, B., and Wolfes, H. (2004). c-Myb protein interacts with Rcd-1, a component of the CCR4 transcription mediator complex. *Biochemistry* *43*, 8152-8159.

Halter, D., Collart, M.A., and Panasencko, O.O. (2014). The Not4 E3 ligase and CCR4 deadenylase play distinct roles in protein quality control. *PLoS One* *9*, e86218.

Hanzawa, H., de Ruwe, M.J., Albert, T.K., van Der Vliet, P.C., Timmers, H.T., and Boelens, R. (2001). The structure of the C4C4 ring finger of human NOT4 reveals features distinct from those of C3HC4 RING fingers. *J Biol Chem* *276*, 10185-10190.

He, Z., Liu, Y., Xiao, B., and Qian, X. (2015). miR-25 modulates NSCLC cell radio-sensitivity through directly inhibiting BTG2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* *457*, 235-241.

Helms, M.W., Kemming, D., Contag, C.H., Pospisil, H., Bartkowiak, K., Wang, A., Chang, S.Y., Buerger, H., and Brandt, B.H. (2009). TOB1 is regulated by EGF-dependent HER2 and EGFR signaling, is highly phosphorylated, and indicates poor prognosis in node-negative breast cancer. *Cancer Res* *69*, 5049-5056.

Hiramatsu, Y., Kitagawa, K., Suzuki, T., Uchida, C., Hattori, T., Kikuchi, H., Oda, T., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Yamamoto, T., *et al.* (2006). Degradation of Tob1 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitination. *Cancer Res* *66*, 8477-8483.

Hiroi, N., Ito, T., Yamamoto, H., Ochiya, T., Jinno, S., and Okayama, H. (2002). Mammalian Rcd1 is a novel transcriptional cofactor that mediates retinoic acid-induced cell differentiation. *EMBO J* *21*, 5235-5244.

Ho, C.K., and Shuman, S. (1999). Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme. *Mol Cell* *3*, 405-411.

Ho, K.J., Do, N.L., Otu, H.H., Dib, M.J., Ren, X., Enjyoji, K., Robson, S.C., Terwilliger, E.F., and Karp, S.J. (2010). Tob1 is a constitutively expressed repressor of liver regeneration. *J Exp Med* *207*, 1197-1208.

Hong, J.W., Ryu, M.S., and Lim, I.K. (2005). Phosphorylation of serine 147 of tis21/BTG2/pc3 by p-Erk1/2 induces Pin-1 binding in cytoplasm and cell death. *J Biol Chem* *280*, 21256-21263.

Horiuchi, M., Takeuchi, K., Noda, N., Muroya, N., Suzuki, T., Nakamura, T., Kawamura-Tsuzuku, J., Takahashi, K., Yamamoto, T., and Inagaki, F. (2009). Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-hCaf1 complex. *J Biol Chem* *284*, 13244-13255.

Hosoda, N., Funakoshi, Y., Hirasawa, M., Yamagishi, R., Asano, Y., Miyagawa, R., Ogami, K., Tsujimoto, M., and Hoshino, S. (2011). Anti-proliferative protein Tob negatively regulates CPEB3 target by recruiting Caf1 deadenylase. *EMBO J* 30, 1311-1323.

Hu, G., Kim, J., Xu, Q., Leng, Y., Orkin, S.H., and Elledge, S.J. (2009). A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal. *Genes Dev* 23, 837-848.

Hug, N., and Caceres, J.F. (2014). The RNA helicase DHX34 activates NMD by promoting a transition from the surveillance to the decay-inducing complex. *Cell reports* 8, 1845-1856.

Huntzinger, E., Kashima, I., Fauser, M., Sauliere, J., and Izaurralde, E. (2008). SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA* 14, 2609-2617.

Ikematsu, N., Yoshida, Y., Kawamura-Tsuzuku, J., Ohsugi, M., Onda, M., Hirai, M., Fujimoto, J., and Yamamoto, T. (1999). Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 18, 7432-7441.

Imran, M., and Lim, I.K. (2013). Regulation of Btg2/(TIS21/PC3) expression via reactive oxygen species-protein kinase C-NuFkappaBeta pathway under stress conditions. *Cell Signal* 25, 2400-2412.

Ito, K., Takahashi, A., Morita, M., Suzuki, T., and Yamamoto, T. (2011). The role of the CNOT1 subunit of the CCR4-NOT complex in mRNA deadenylation and cell viability. *Protein Cell* 2, 755-763.

Ito, Y., Suzuki, T., Yoshida, H., Tomoda, C., Uruno, T., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Matsuzuka, F., Kuma, K., *et al.* (2005). Phosphorylation and inactivation of Tob contributes to the progression of papillary carcinoma of the thyroid. *Cancer Lett* 220, 237-242.

Ivanov, P.V., Gehring, N.H., Kunz, J.B., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J* 27, 736-747.

Iwai, K., Hirata, K., Ishida, T., Takeuchi, S., Hirase, T., Rikitake, Y., Kojima, Y., Inoue, N., Kawashima, S., and Yokoyama, M. (2004). An anti-proliferative gene BTG1 regulates angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 628-635.

Iwanaga, K., Sueoka, N., Sato, A., Sakuragi, T., Sakao, Y., Tominaga, M., Suzuki, T., Yoshida, Y., J, K.T., Yamamoto, T., *et al.* (2003). Alteration of expression or phosphorylation status of tob, a novel tumor suppressor gene product, is an early event in lung cancer. *Cancer Lett* 202, 71-79.

Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113-127.

Jalava, S.E., Urbanucci, A., Latonen, L., Waltering, K.K., Sahu, B., Janne, O.A., Seppala, J., Lahdesmaki, H., Tammela, T.L., and Visakorpi, T. (2012). Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene* 31, 4460-4471.

Jayne, S., Zwartjes, C.G., van Schaik, F.M., and Timmers, H.T. (2006). Involvement of the SMRT/NCOR-HDAC3 complex in transcriptional repression by the CNOT2 subunit of the human Ccr4-Not complex. *Biochem J* 398, 461-467.

Jin, M., Wang, X.M., Tu, Y., Zhang, X.H., Gao, X., Guo, N., Xie, Z., Zhao, G., Jing, N., Li, B.M., *et al.* (2005). The negative cell cycle regulator, Tob (transducer of ErbB-2), is a multifunctional protein involved in hippocampus-dependent learning and memory. *Neuroscience* 131, 647-659.

Jinek, M., Coyle, S.M., and Doudna, J.A. (2011). Coupled 5' nucleotide recognition and processivity in Xrn1-mediated mRNA decay. *Mol Cell* 41, 600-608.

Joly, W., Chartier, A., Rojas-Rios, P., Busseau, I., and Simonelig, M. (2013). The CCR4 deadenylase acts with Nanos and Pumilio in the fine-tuning of Mei-P26 expression to promote germline stem cell self-renewal. *Stem Cell Reports* *1*, 411-424.

Kamaid, A., and Giraldez, F. (2008). Btg1 and Btg2 gene expression during early chick development. *Dev Dyn* *237*, 2158-2169.

Kanda, M., Oya, H., Nomoto, S., Takami, H., Shimizu, D., Hashimoto, R., Sueoka, S., Kobayashi, D., Tanaka, C., Yamada, S., *et al.* (2015a). Diversity of clinical implication of B-cell translocation gene 1 expression by histopathologic and anatomic subtypes of gastric cancer. *Dig Dis Sci* *60*, 1256-1264.

Kanda, M., Sugimoto, H., Nomoto, S., Oya, H., Hibino, S., Shimizu, D., Takami, H., Hashimoto, R., Okamura, Y., Yamada, S., *et al.* (2015b). Bcell translocation gene 1 serves as a novel prognostic indicator of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* *46*, 641-648.

Karve, T.M., and Rosen, E.M. (2012). B-cell translocation gene 2 (BTG2) stimulates cellular antioxidant defenses through the antioxidant transcription factor NFE2L2 in human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* *287*, 31503-31514.

Kawahara, M., Pandolfi, A., Bartholdy, B., Barreyro, L., Will, B., Roth, M., Okoye-Okafor, U.C., Todorova, T.I., Figueroa, M.E., Melnick, A., *et al.* (2012). H2.0-like homeobox regulates early hematopoiesis and promotes acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* *22*, 194-208.

Kawakubo, H., Carey, J.L., Brachtel, E., Gupta, V., Green, J.E., Walden, P.D., and Maheswaran, S. (2004). Expression of the NF-kappaB-responsive gene BTG2 is aberrantly regulated in breast cancer. *Oncogene* *23*, 8310-8319.

Kawate, H., Wu, Y., Ohnaka, K., Nawata, H., and Takayanagi, R. (2005). Tob proteins suppress steroid hormone receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Cell Endocrinol* *230*, 77-86.

Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* *169*, 871-884.

Kennedy, K.A., Porter, T., Mehta, V., Ryan, S.D., Price, F., Peshdary, V., Karamboulas, C., Savage, J., Drysdale, T.A., Li, S.C., *et al.* (2009). Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative beta-catenin. *BMC Biol* *7*, 67.

Kerr, S.C., Azzouz, N., Fuchs, S.M., Collart, M.A., Strahl, B.D., Corbett, A.H., and Laribee, R.N. (2011). The Ccr4-Not complex interacts with the mRNA export machinery. *PLoS One* *6*, e18302.

Kerwitz, Y., Kuhn, U., Lilie, H., Knoth, A., Scheuermann, T., Friedrich, H., Schwarz, E., and Wahle, E. (2003). Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *EMBO J* *22*, 3705-3714.

Khodursky, A.B., and Bernstein, J.A. (2003). Life after transcription--revisiting the fate of messenger RNA. *Trends Genet* *19*, 113-115.

Kojima, S., Gendreau, K.L., Sher-Chen, E.L., Gao, P., and Green, C.B. (2015). Changes in poly(A) tail length dynamics from the loss of the circadian deadenylase Nocturnin. *Sci Rep* *5*, 17059.

Kolupaeva, V.G., Unbehauen, A., Lomakin, I.B., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2005). Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA* *11*, 470-486.

Konrad, M.A., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2005). The BTG/TOB family protein TIS21 regulates stage-specific proliferation of developing thymocytes. *Eur J Immunol* *35*, 3030-3042.

Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* *184*, 868-871.

Korner, C.G., Wormington, M., Muckenthaler, M., Schneider, S., Dehlin, E., and Wahle, E. (1998). The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 17, 5427-5437.

Kuhn, U., Gundel, M., Knoth, A., Kerwitz, Y., Rudel, S., and Wahle, E. (2009). Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *J Biol Chem* 284, 22803-22814.

Kuo, M.L., Duncavage, E.J., Mathew, R., den Besten, W., Pei, D., Naeve, D., Yamamoto, T., Cheng, C., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (2003). Arf induces p53-dependent and -independent antiproliferative genes. *Cancer Res* 63, 1046-1053.

Kuzuoglu-Ozturk, D., Huntzinger, E., Schmidt, S., and Izaurralde, E. (2012). The *Caenorhabditis elegans* GW182 protein AIN-1 interacts with PAB-1 and subunits of the PAN2-PAN3 and CCR4-NOT deadenylase complexes. *Nucleic Acids Res* 40, 5651-5665.

Lai, T., Cho, H., Liu, Z., Bowler, M.W., Piao, S., Parker, R., Kim, Y.K., and Song, H. (2012). Structural basis of the PNRC2-mediated link between mRNA surveillance and decapping. *Structure* 20, 2025-2037.

Lai, W.S., Carrick, D.M., and Blackshear, P.J. (2005). Influence of nonameric AU-rich tristetraprolin-binding sites on mRNA deadenylation and turnover. *J Biol Chem* 280, 34365-34377.

Lau, N.C., Kolkman, A., van Schaik, F.M., Mulder, K.W., Pijnappel, W.W., Heck, A.J., and Timmers, H.T. (2009). Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits. *Biochem J* 422, 443-453.

Lebreton, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Seraphin, B. (2008). Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* 456, 993-996.

Lee, A.S., Kranzusch, P.J., and Cate, J.H. (2015a). eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. *Nature* 522, 111-114.

Lee, S.E., Hwang, S.L., Jang, W.G., Chang, H.W., and Kim, Y.D. (2015b). B-cell translocation gene 2 promotes hepatic hepcidin production via induction of Yin Yang 1. *Biochem Biophys Res Commun* 460, 996-1001.

Lee, S.W., Kwak, H.B., Lee, H.C., Lee, S.K., Kim, H.H., and Lee, Z.H. (2002). The anti-proliferative gene TIS21 is involved in osteoclast differentiation. *J Biochem Mol Biol* 35, 609-614.

Lejeune, F., Li, X., and Maquat, L.E. (2003). Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol Cell* 12, 675-687.

Li, B.S., Zuo, Q.F., Zhao, Y.L., Xiao, B., Zhuang, Y., Mao, X.H., Wu, C., Yang, S.M., Zeng, H., Zou, Q.M., *et al.* (2015a). MicroRNA-25 promotes gastric cancer migration, invasion and proliferation by directly targeting transducer of ERBB2, 1 and correlates with poor survival. *Oncogene* 34, 2556-2565.

Li, R., Yue, J., Zhang, Y., Zhou, L., Hao, W., Yuan, J., Qiang, B., Ding, J.M., Peng, X., and Cao, J.M. (2008). CLOCK/BMAL1 regulates human nocturnin transcription through binding to the E-box of nocturnin promoter. *Mol Cell Biochem* 317, 169-177.

Li, W., Zou, S.T., Zhu, R., Wan, J.M., Xu, Y., and Wu, H.R. (2014a). Bcell translocation 1 gene inhibits cellular metastasis-associated behavior in breast cancer. *Mol Med Rep* 9, 2374-2380.

Li, W.Q., Yu, H.Y., Zhong, N.Z., Hou, L.J., Li, Y.M., He, J., Liu, H.M., Xia, C.Y., and Lu, Y.C. (2015b). miR27a suppresses the clonogenic growth and migration of human glioblastoma multiforme cells by targeting BTG2. *Int J Oncol* 46, 1601-1608.

Li, Y., Choi, P.S., Casey, S.C., Dill, D.L., and Felsher, D.W. (2014b). MYC through miR-17-92 suppresses specific target genes to maintain survival, autonomous proliferation, and a neoplastic state. *Cancer Cell* 26, 262-272.

Li, Y., Fan, L., Hu, J., Zhang, L., Liao, L., Liu, S., Wu, D., Yang, P., Shen, L., Chen, J., *et al.* (2015c). MiR-26a Rescues Bone Regeneration Deficiency of Mesenchymal Stem Cells Derived From Osteoporotic Mice. *Mol Ther* 23, 1349-1357.

Li, Y.J., Dong, B.K., Fan, M., and Jiang, W.X. (2015d). BTG2 inhibits the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by suppressing the PI3K/AKT pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 12410-12418.

Lim, J., Ha, M., Chang, H., Kwon, S.C., Simanshu, D.K., Patel, D.J., and Kim, V.N. (2014). Uridylation by TUT4 and TUT7 marks mRNA for degradation. *Cell* 159, 1365-1376.

Lim, S.K., Choi, Y.W., Lim, I.K., and Park, T.J. (2012). BTG2 suppresses cancer cell migration through inhibition of Src-FAK signaling by downregulation of reactive oxygen species generation in mitochondria. *Clin Exp Metastasis* 29, 901-913.

Lin, J., Fabian, M., Sonenberg, N., and Meller, A. (2012a). Nanopore detachment kinetics of poly(A) binding proteins from RNA molecules reveals the critical role of C-terminus interactions. *Biophys J* 102, 1427-1434.

Lin, T.Y., Cheng, Y.C., Yang, H.C., Lin, W.C., Wang, C.C., Lai, P.L., and Shieh, S.Y. (2012b). Loss of the candidate tumor suppressor BTG3 triggers acute cellular senescence via the ERK-JMJD3-p16(INK4a) signaling axis. *Oncogene* 31, 3287-3297.

Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., and Herschman, H.R. (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J Biol Chem* 271, 15034-15044.

Lipchina, I., Elkabetz, Y., Hafner, M., Sheridan, R., Mihailovic, A., Tuschl, T., Sander, C., Studer, L., and Betel, D. (2011). Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response. *Genes Dev* 25, 2173-2186.

Liu, C., Tao, T., Xu, B., Lu, K., Zhang, L., Jiang, L., Chen, S., Liu, D., Zhang, X., Cao, N., *et al.* (2015). BTG1 potentiates apoptosis and suppresses proliferation in renal cell carcinoma by interacting with PRMT1. *Oncol Lett* 10, 619-624.

Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X., and Kiledjian, M. (2002). The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J* 21, 4699-4708.

Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.

Liu, M., Wu, H., Liu, T., Li, Y., Wang, F., Wan, H., Li, X., and Tang, H. (2009). Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma. *Cell Res* 19, 828-837.

Liu, Q., Greimann, J.C., and Lima, C.D. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127, 1223-1237.

Liu, Y., Lu, X., Shi, J., Yu, X., Zhang, X., Zhu, K., Yi, Z., Duan, E., and Li, L. (2016). BTG4 is a key regulator for maternal mRNA clearance during mouse early embryogenesis. *J Mol Cell Biol*.

Loh, B., Jonas, S., and Izaurralde, E. (2013). The SMG5-SMG7 heterodimer directly recruits the CCR4-NOT deadenylase complex to mRNAs containing nonsense codons via interaction with POP2. *Genes Dev* 27, 2125-2138.

Lorda-Diez, C.I., Montero, J.A., Garcia-Porrero, J.A., and Hurle, J.M. (2016). The tumor suppressor BTG1 is expressed in the developing digits and regulates skeletogenic differentiation of limb mesodermal progenitors in high density cultures. *Cell Tissue Res* 364, 299-308.

Lorentzen, E., Basquin, J., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Conti, E. (2008). Structure of the active subunit of the yeast exosome core, Rrp44: diverse modes of substrate recruitment in the RNase II nuclease family. *Mol Cell* 29, 717-728.

Losson, R., and Lacroute, F. (1979). Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5134-5137.

Lowell, J.E., Rudner, D.Z., and Sachs, A.B. (1992). 3'-UTR-dependent deadenylation by the yeast poly(A) nuclease. *Genes Dev* 6, 2088-2099.

Lu, K., Liu, C., Tao, T., Zhang, X., Zhang, L., Sun, C., Wang, Y., Chen, S., Xu, B., and Chen, M. (2015). MicroRNA-19a regulates proliferation and apoptosis of castration-resistant prostate cancer cells by targeting BTG1. *FEBS Lett* 589, 1485-1490.

Lu, Y.F., Sun, G.G., Liu, Q., Yang, C.R., and Cheng, Y.J. (2014). BTG1 expression in thyroid carcinoma: diagnostic indicator and prognostic marker. *Int J Oncol* 45, 1574-1582.

Lv, Z., Zou, H., Peng, K., Wang, J., Ding, Y., Li, Y., Ren, X., Wang, F., Chang, R., Liang, L., *et al.* (2013). The suppressive role and aberrant promoter methylation of BTG3 in the progression of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 8, e77473.

Lykke-Andersen, J., Shu, M.D., and Steitz, J.A. (2000). Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 103, 1121-1131.

Maekawa, M., Nishida, E., and Tanoue, T. (2002). Identification of the Anti-proliferative protein Tob as a MAPK substrate. *J Biol Chem* 277, 37783-37787.

Maillet, L., Tu, C., Hong, Y.K., Shuster, E.O., and Collart, M.A. (2000). The essential function of Not1 lies within the Ccr4-Not complex. *J Mol Biol* 303, 131-143.

Majid, S., Dar, A.A., Ahmad, A.E., Hirata, H., Kawakami, K., Shahryari, V., Saini, S., Tanaka, Y., Dahiya, A.V., Khatri, G., *et al.* (2009). BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer. *Carcinogenesis* 30, 662-670.

Majid, S., Dar, A.A., Shahryari, V., Hirata, H., Ahmad, A., Saini, S., Tanaka, Y., Dahiya, A.V., and Dahiya, R. (2010). Genistein reverses hypermethylation and induces active histone modifications in tumor suppressor gene B-Cell translocation gene 3 in prostate cancer. *Cancer* 116, 66-76.

Maragozidis, P., Karangeli, M., Labrou, M., Dimoulou, G., Papaspyrou, K., Salataj, E., Pournaras, S., Matsouka, P., Gourgoulisanis, K.I., and Balatsos, N.A. (2012). Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)-specific ribonuclease as a potential biomarker. *Acta Haematol* 128, 39-46.

Matera, A.G., and Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 108-121.

Mathys, H., Basquin, J., Ozgur, S., Czarnocki-Cieciura, M., Bonneau, F., Aartse, A., Dziembowski, A., Nowotny, M., Conti, E., and Filipowicz, W. (2014). Structural and biochemical insights to the role of the CCR4-NOT complex and DDX6 ATPase in microRNA repression. *Mol Cell* 54, 751-765.

Matsuda, S., Kawamura-Tsuzuku, J., Ohsugi, M., Yoshida, M., Emi, M., Nakamura, Y., Onda, M., Yoshida, Y., Nishiyama, A., and Yamamoto, T. (1996). Tob, a novel protein that interacts with p185erbB2, is associated with anti-proliferative activity. *Oncogene* 12, 705-713.

Matsuda, S., Rouault, J., Magaud, J., and Berthet, C. (2001). In search of a function for the TIS21/PC3/BTG1/TOB family. *FEBS Lett* 497, 67-72.

Mauxion, F., Faux, C., and Seraphin, B. (2008). The BTG2 protein is a general activator of mRNA deadenylation. *EMBO J* 27, 1039-1048.

Mauxion, F., Preve, B., and Seraphin, B. (2013). C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 form a new module of the CCR4-NOT complex. *RNA Biol* 10, 267-276.

McGlinchy, N.J., and Smith, C.W. (2008). Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem Sci* 33, 385-393.

Melo, E.O., Dhalia, R., Martins de Sa, C., Standart, N., and de Melo Neto, O.P. (2003). Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. *J Biol Chem* 278, 46357-46368.

Mittal, S., Aslam, A., Doidge, R., Medica, R., and Winkler, G.S. (2011). The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4-Not complex contribute to the prevention of cell death and senescence. *Mol Biol Cell* 22, 748-758.

Miyata, S., Mori, Y., and Tohyama, M. (2008). PRMT1 and Btg2 regulates neurite outgrowth of Neuro2a cells. *Neurosci Lett* 445, 162-165.

Mollerstrom, E., Kovacs, A., Lovgren, K., Nemes, S., Delle, U., Danielsson, A., Parris, T., Brennan, D.J., Jirstrom, K., Karlsson, P., *et al.* (2010). Up-regulation of cell cycle arrest protein BTG2 correlates with increased overall survival in breast cancer, as detected by immunohistochemistry using tissue microarray. *BMC Cancer* 10, 296.

Montagnoli, A., Guardavaccaro, D., Starace, G., and Tirone, F. (1996). Overexpression of the nerve growth factor-inducible PC3 immediate early gene is associated with growth inhibition. *Cell Growth Differ* 7, 1327-1336.

Morel, A.P., Sentis, S., Bianchin, C., Le Romancer, M., Jonard, L., Rostan, M.C., Rimokh, R., and Corbo, L. (2003). BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell-cycle-regulated forms. *J Cell Sci* 116, 2929-2936.

Morita, M., Oike, Y., Nagashima, T., Kadomatsu, T., Tabata, M., Suzuki, T., Nakamura, T., Yoshida, N., Okada, M., and Yamamoto, T. (2011). Obesity resistance and increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in Cnot3^{+/-} mice. *EMBO J* 30, 4678-4691.

Morita, M., Suzuki, T., Nakamura, T., Yokoyama, K., Miyasaka, T., and Yamamoto, T. (2007). Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth. *Mol Cell Biol* 27, 4980-4990.

Morris, J.Z., Hong, A., Lilly, M.A., and Lehmann, R. (2005). twin, a CCR4 homolog, regulates cyclin poly(A) tail length to permit Drosophila oogenesis. *Development* 132, 1165-1174.

Moura, R., Pontillo, A., D'Adamo, P., Pirastu, N., Campos Coelho, A., and Crovella, S. (2014). Exome analysis of HIV patients submitted to dendritic cells therapeutic vaccine reveals an association of CNOT1 gene with response to the treatment. *J Int AIDS Soc* 17, 18938.

Mulder, K.W., Brenkman, A.B., Inagaki, A., van den Broek, N.J., and Timmers, H.T. (2007). Regulation of histone H3K4 tri-methylation and PAF complex recruitment by the Ccr4-Not complex. *Nucleic Acids Res* 35, 2428-2439.

Mulder, K.W., Winkler, G.S., and Timmers, H.T. (2005). DNA damage and replication stress induced transcription of RNR genes is dependent on the Ccr4-Not complex. *Nucleic Acids Res* 33, 6384-6392.

Mullen, T.E., and Marzluff, W.F. (2008). Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5'. *Genes Dev* 22, 50-65.

Muniz, L., Davidson, L., and West, S. (2015). Poly(A) Polymerase and the Nuclear Poly(A) Binding Protein, PABPN1, Coordinate the Splicing and Degradation of a Subset of Human Pre-mRNAs. *Mol Cell Biol* 35, 2218-2230.

Nahta, R., Yuan, L.X., Fiterman, D.J., Zhang, L., Symmans, W.F., Ueno, N.T., and Esteva, F.J. (2006). B cell translocation gene 1 contributes to antisense Bcl-2-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5, 1593-1601.

Nakamura, T., Yao, R., Ogawa, T., Suzuki, T., Ito, C., Tsunekawa, N., Inoue, K., Ajima, R., Miyasaka, T., Yoshida, Y., *et al.* (2004). Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking Cnot7, a regulator of retinoid X receptor beta. *Nat Genet* *36*, 528-533.

Neef, D.W., and Thiele, D.J. (2009). Enhancer of decapping proteins 1 and 2 are important for translation during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* *73*, 1032-1042.

Neely, G.G., Kuba, K., Cammarato, A., Isobe, K., Amann, S., Zhang, L., Murata, M., Elmen, L., Gupta, V., Arora, S., *et al.* (2010). A global in vivo *Drosophila* RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell* *141*, 142-153.

Ng, C.K., Shboul, M., Taverniti, V., Bonnard, C., Lee, H., Eskin, A., Nelson, S.F., Al-Raqad, M., Altawalbeh, S., Seraphin, B., *et al.* (2015). Loss of the scavenger mRNA decapping enzyme DCPS causes syndromic intellectual disability with neuromuscular defects. *Hum Mol Genet* *24*, 3163-3171.

O'Malley, S., Su, H., Zhang, T., Ng, C., Ge, H., and Tang, C.K. (2009). TOB suppresses breast cancer tumorigenesis. *Int J Cancer* *125*, 1805-1813.

Ogami, K., Hosoda, N., Funakoshi, Y., and Hoshino, S. (2014). Antiproliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. *Oncogene* *33*, 55-64.

Okazaki, N., Okazaki, K., Watanabe, Y., Kato-Hayashi, M., Yamamoto, M., and Okayama, H. (1998). Novel factor highly conserved among eukaryotes controls sexual development in fission yeast. *Mol Cell Biol* *18*, 887-895.

Okochi, K., Suzuki, T., Inoue, J., Matsuda, S., and Yamamoto, T. (2005). Interaction of anti-proliferative protein Tob with poly(A)-binding protein and inducible poly(A)-binding protein: implication of Tob in translational control. *Genes Cells* *10*, 151-163.

Olsen, D.S., Savner, E.M., Mathew, A., Zhang, F., Krishnamoorthy, T., Phan, L., and Hinnebusch, A.G. (2003). Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo. *EMBO J* *22*, 193-204.

Ou, Y.H., Chung, P.H., Hsu, F.F., Sun, T.P., Chang, W.Y., and Shieh, S.Y. (2007). The candidate tumor suppressor BTG3 is a transcriptional target of p53 that inhibits E2F1. *EMBO J* *26*, 3968-3980.

Panasenko, O.O., and Collart, M.A. (2011). Not4 E3 ligase contributes to proteasome assembly and functional integrity in part through Ecm29. *Mol Cell Biol* *31*, 1610-1623.

Panasenko, O.O., and Collart, M.A. (2012). Presence of Not5 and ubiquitinated Rps7A in polysome fractions depends upon the Not4 E3 ligase. *Mol Microbiol* *83*, 640-653.

Panasenko, O.O., David, F.P., and Collart, M.A. (2009). Ribosome association and stability of the nascent polypeptide-associated complex is dependent upon its own ubiquitination. *Genetics* *181*, 447-460.

Park, J.I., Kim, S.G., Baek, M.W., Park, T.J., Lim, I.K., Seo, Y.W., and Chun, S.Y. (2013). B-cell translocation gene 2: expression in the rat ovary and potential association with adenine nucleotide translocase 2 in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* *367*, 31-40.

Park, S., Lee, Y.J., Lee, H.J., Seki, T., Hong, K.H., Park, J., Beppu, H., Lim, I.K., Yoon, J.W., Li, E., *et al.* (2004). B-cell translocation gene 2 (Btg2) regulates vertebral patterning by modulating bone morphogenetic protein/smud signaling. *Mol Cell Biol* *24*, 10256-10262.

Park, T.J., Kim, J.Y., Oh, S.P., Kang, S.Y., Kim, B.W., Wang, H.J., Song, K.Y., Kim, H.C., and Lim, I.K. (2008). TIS21 negatively regulates hepatocarcinogenesis by disruption of cyclin B1-Forkhead box M1 regulation loop. *Hepatology* *47*, 1533-1543.

Passeri, D., Marcucci, A., Rizzo, G., Billi, M., Panigada, M., Leonardi, L., Tirone, F., and Grignani, F. (2006). Btg2 enhances retinoic acid-induced differentiation by modulating histone H4 methylation and acetylation. *Mol Cell Biol* 26, 5023-5032.

Passos, D.O., Doma, M.K., Shoemaker, C.J., Muhlrad, D., Green, R., Weissman, J., Hollien, J., and Parker, R. (2009). Analysis of Dom34 and its function in no-go decay. *Mol Biol Cell* 20, 3025-3032.

Peng, J., Murray, E.L., and Schoenberg, D.R. (2008). In vivo and in vitro analysis of poly(A) length effects on mRNA translation. *Methods Mol Biol* 419, 215-230.

Pennetier, S., Uzbekova, S., Guyader-Joly, C., Humblot, P., Mermillod, P., and Dalbies-Tran, R. (2005). Genes preferentially expressed in bovine oocytes revealed by subtractive and suppressive hybridization. *Biol Reprod* 73, 713-720.

Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E., and Hellen, C.U. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403, 332-335.

Petit, A.P., Wohlbold, L., Bawankar, P., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E., and Weichenrieder, O. (2012). The structural basis for the interaction between the CAF1 nuclease and the NOT1 scaffold of the human CCR4-NOT deadenylase complex. *Nucleic Acids Res* 40, 11058-11072.

Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309, 1573-1576.

Pisareva, V.P., Pisarev, A.V., Komar, A.A., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2008). Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* 135, 1237-1250.

Pisareva, V.P., Skabkin, M.A., Hellen, C.U., Pestova, T.V., and Pisarev, A.V. (2011). Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J* 30, 1804-1817.

Prevot, D., Morel, A.P., Voeltzel, T., Rostan, M.C., Rimokh, R., Magaud, J.P., and Corbo, L. (2001). Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway. *J Biol Chem* 276, 9640-9648.

Prevot, D., Voeltzel, T., Birot, A.M., Morel, A.P., Rostan, M.C., Magaud, J.P., and Corbo, L. (2000). The leukemia-associated protein Btg1 and the p53-regulated protein Btg2 interact with the homeoprotein Hoxb9 and enhance its transcriptional activation. *J Biol Chem* 275, 147-153.

Proudfoot, N.J. (2011). Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev* 25, 1770-1782.

Putnik, M., Zhao, C., Gustafsson, J.A., and Dahlman-Wright, K. (2012). Global identification of genes regulated by estrogen signaling and demethylation in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 426, 26-32.

Quy, L.N., Choi, Y.W., Kim, Y.H., Chwae, Y.J., Park, T.J., and Lim, I.K. (2013). TIS21(BTG2/PC3) inhibits interleukin-6 expression via downregulation of STAT3 pathway. *Cell Signal* 25, 2391-2399.

Rabani, M., Levin, J.Z., Fan, L., Adiconis, X., Raychowdhury, R., Garber, M., Gnirke, A., Nusbaum, C., Hacohen, N., Friedman, N., *et al.* (2011). Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 29, 436-442.

Rahmani, Z. (2006). APRO4 negatively regulates Src tyrosine kinase activity in PC12 cells. *J Cell Sci* 119, 646-658.

Raisch, T., Bhandari, D., Sabath, K., Helms, S., Valkov, E., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2016). Distinct modes of recruitment of the CCR4-NOT complex by *Drosophila* and vertebrate Nanos. *EMBO J* 35, 974-990.

Ramirez, C.V., Vilela, C., Berthelot, K., and McCarthy, J.E. (2002). Modulation of eukaryotic mRNA stability via the cap-binding translation complex eIF4F. *J Mol Biol* 318, 951-962.

Rampalli, S., Pavithra, L., Bhatt, A., Kundu, T.K., and Chattopadhyay, S. (2005). Tumor suppressor SMAR1 mediates cyclin D1 repression by recruitment of the SIN3/histone deacetylase 1 complex. *Mol Cell Biol* 25, 8415-8429.

Raouf, A., and Seth, A. (2002). Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. *Bone* 30, 463-471.

Ren, X.L., Zhu, X.H., Li, X.M., Li, Y.L., Wang, J.M., Wu, P.X., Lv, Z.B., Ma, W.H., Liao, W.T., Wang, W., et al. (2015). Down-regulation of BTG3 promotes cell proliferation, migration and invasion and predicts survival in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 141, 397-405.

Reverdatto, S.V., Dutko, J.A., Chekanova, J.A., Hamilton, D.A., and Belostotsky, D.A. (2004). mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA* 10, 1200-1214.

Rimokh, R., Rouault, J.P., Wahbi, K., Gadoux, M., Lafage, M., Archimbaud, E., Charrin, C., Gentilhomme, O., Germain, D., Samarut, J., et al. (1991). A chromosome 12 coding region is juxtaposed to the MYC protooncogene locus in a t(8;12)(q24;q22) translocation in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 3, 24-36.

Rissland, O.S., and Norbury, C.J. (2009). Decapping is preceded by 3' uridylation in a novel pathway of bulk mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 16, 616-623.

Rodier, A., Marchal-Victorion, S., Rochard, P., Casas, F., Cassar-Malek, I., Rouault, J.P., Magaud, J.P., Mason, D.Y., Wrutniak, C., and Cabello, G. (1999). BTG1: a triiodothyronine target involved in the myogenic influence of the hormone. *Exp Cell Res* 249, 337-348.

Rogers, G.W., Jr., Richter, N.J., Lima, W.F., and Merrick, W.C. (2001). Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem* 276, 30914-30922.

Rouault, J.P., Falette, N., Guehenneux, F., Guillot, C., Rimokh, R., Wang, Q., Berthet, C., Moyret-Lalle, C., Savatier, P., Pain, B., et al. (1996). Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat Genet* 14, 482-486.

Rouault, J.P., Prevot, D., Berthet, C., Birot, A.M., Billaud, M., Magaud, J.P., and Corbo, L. (1998). Interaction of BTG1 and p53-regulated BTG2 gene products with mCaf1, the murine homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional regulatory complex. *J Biol Chem* 273, 22563-22569.

Rouault, J.P., Rimokh, R., Tessa, C., Paranhos, G., Ffrench, M., Duret, L., Garoccio, M., Germain, D., Samarut, J., and Magaud, J.P. (1992). BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. *EMBO J* 11, 1663-1670.

Rouget, C., Papin, C., Boureux, A., Meunier, A.C., Franco, B., Robine, N., Lai, E.C., Pelisson, A., and Simonelig, M. (2010). Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 467, 1128-1132.

Ruan, L., Osawa, M., Hosoda, N., Imai, S., Machiyama, A., Katada, T., Hoshino, S., and Shimada, I. (2010). Quantitative characterization of Tob interactions provides the thermodynamic basis for translation termination-coupled deadenylase regulation. *J Biol Chem* 285, 27624-27631.

Ryu, M.S., Lee, M.S., Hong, J.W., Hahn, T.R., Moon, E., and Lim, I.K. (2004). TIS21/BTG2/PC3 is expressed through PKC-delta pathway and inhibits binding of cyclin B1-Cdc2 and its activity, independent of p53 expression. *Exp Cell Res* 299, 159-170.

- Sachs**, A.B., and Deardorff, J.A. (1992). Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* *70*, 961-973.
- Safaei**, N., Kozlov, G., Noronha, A.M., Xie, J., Wilds, C.J., and Gehring, K. (2012). Interdomain allostery promotes assembly of the poly(A) mRNA complex with PABP and eIF4G. *Mol Cell* *48*, 375-386.
- Saito**, S., Hosoda, N., and Hoshino, S. (2013). The Hbs1-Dom34 protein complex functions in non-stop mRNA decay in mammalian cells. *J Biol Chem* *288*, 17832-17843.
- Saka**, Y., Tada, M., and Smith, J.C. (2000). A screen for targets of the *Xenopus* T-box gene Xbra. *Mech Dev* *93*, 27-39.
- Sakai**, A., Chibazakura, T., Shimizu, Y., and Hishinuma, F. (1992). Molecular analysis of POP2 gene, a gene required for glucose-derepression of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* *20*, 6227-6233.
- Sandler**, H., Kreth, J., Timmers, H.T., and Stoecklin, G. (2011). Not1 mediates recruitment of the deadenylase Caf1 to mRNAs targeted for degradation by tristetraprolin. *Nucleic Acids Res* *39*, 4373-4386.
- Santarasci**, V., Maggi, L., Mazzoni, A., Capone, M., Querci, V., Rossi, M.C., Beltrame, L., Cavalieri, D., De Palma, R., Liotta, F., *et al.* (2014). IL-4-induced gene 1 maintains high Tob1 expression that contributes to TCR unresponsiveness in human T helper 17 cells. *Eur J Immunol* *44*, 654-661.
- Sasajima**, H., Nakagawa, K., Kashiwayanagi, M., and Yokosawa, H. (2012). Polyubiquitination of the B-cell translocation gene 1 and 2 proteins is promoted by the SCF ubiquitin ligase complex containing betaTrCP. *Biol Pharm Bull* *35*, 1539-1545.
- Sasajima**, H., Nakagawa, K., and Yokosawa, H. (2002). Antiproliferative proteins of the BTG/Tob family are degraded by the ubiquitin-proteasome system. *Eur J Biochem* *269*, 3596-3604.
- Schulze-Toppoff**, U., Casazza, S., Varrin-Doyer, M., Pekarek, K., Sobel, R.A., Hauser, S.L., Oksenberg, J.R., Zamvil, S.S., and Baranzini, S.E. (2013). Tob1 plays a critical role in the activation of encephalitogenic T cells in CNS autoimmunity. *J Exp Med* *210*, 1301-1309.
- Schwartz**, D.C., and Parker, R. (2000). mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol* *20*, 7933-7942.
- Schwede**, A., Ellis, L., Luther, J., Carrington, M., Stoecklin, G., and Clayton, C. (2008). A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells. *Nucleic Acids Res* *36*, 3374-3388.
- Seiden-Long**, I.M., Brown, K.R., Shih, W., Wigle, D.A., Radulovich, N., Jurisica, I., and Tsao, M.S. (2006). Transcriptional targets of hepatocyte growth factor signaling and Ki-ras oncogene activation in colorectal cancer. *Oncogene* *25*, 91-102.
- Seo**, M.S., Lee, M.S., and Lim, I.K. (1999). Expression of rat BTG(3) gene, Rbtg3, is regulated by redox changes. *Gene* *240*, 165-173.
- Shandilya**, J., and Roberts, S.G. (2012). The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim Biophys Acta* *1819*, 391-400.
- Sheth**, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* *300*, 805-808.
- Sheth**, U., and Parker, R. (2006). Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* *125*, 1095-1109.
- Shi**, K., Zhang, L., and Meng, A. (2004). Cloning and expression analysis of zebrafish tob1 gene. *Dev Genes Evol* *214*, 309-311.
- Shi**, Y., and Manley, J.L. (2015). The end of the message: multiple protein-RNA interactions define the mRNA polyadenylation site. *Genes Dev* *29*, 889-897.

Shoemaker, C.J., and Green, R. (2011). Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, E1392-1398.

Siddiqui, N., Mangus, D.A., Chang, T.C., Palermino, J.M., Shyu, A.B., and Gehring, K. (2007). Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* *282*, 25067-25075.

Simon, E., and Seraphin, B. (2007). A specific role for the C-terminal region of the Poly(A)-binding protein in mRNA decay. *Nucleic Acids Res* *35*, 6017-6028.

Singh, K.K., Wachsmuth, L., Kulozik, A.E., and Gehring, N.H. (2013). Two mammalian MAGOH genes contribute to exon junction complex composition and nonsense-mediated decay. *RNA Biol* *10*, 1291-1298.

Singh, S., Dev, A., Verma, R., Pradeep, A., Sathyanarayana, P., Green, J.M., Narayanan, A., and Wojchowski, D.M. (2012). Defining an EPOR- regulated transcriptome for primary progenitors, including Tnfr-sf13c as a novel mediator of EPO- dependent erythroblast formation. *PLoS One* *7*, e38530.

Smolle, M., and Workman, J.L. (2013). Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochim Biophys Acta* *1829*, 84-97.

Song, H., Mugnier, P., Das, A.K., Webb, H.M., Evans, D.R., Tuite, M.F., Hemmings, B.A., and Barford, D. (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* *100*, 311-321.

Song, M.G., and Kiledjian, M. (2007). 3' Terminal oligo U-tract-mediated stimulation of decapping. *RNA* *13*, 2356-2365.

Struckmann, K., Schraml, P., Simon, R., Elmenhorst, K., Mirlacher, M., Kononen, J., and Moch, H. (2004). Impaired expression of the cell cycle regulator BTG2 is common in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* *64*, 1632-1638.

Sugimoto, K., Hayata, T., and Asashima, M. (2005). XBtg2 is required for notochord differentiation during early *Xenopus* development. *Dev Growth Differ* *17*, 435-443.

Sugimoto, K., Okabayashi, K., Sedohara, A., Hayata, T., and Asashima, M. (2007). The role of XBtg2 in *Xenopus* neural development. *Dev Neurosci* *29*, 468-479.

Suk, K., Sipes, D.G., and Erickson, K.L. (1997). Enhancement of B-cell translocation gene-1 expression by prostaglandin E2 in macrophages and the relationship to proliferation. *Immunology* *91*, 121-129.

Sun, G., Liu, Q., Cheng, Y., and Hu, W. (2015a). B cell translocation gene 1 reduces the biological outcome of kidney cancer through induction of cell proliferation, cell cycle arrest, cell apoptosis and cell metastasis. *Int J Mol Med* *35*, 777-783.

Sun, H.Y., Kim, N., Hwang, C.S., and Yoo, J.Y. (2015b). Protein Degradation of RNA Polymerase II-Association Factor 1(PAF1) Is Controlled by CNOT4 and 26S Proteasome. *PLoS One* *10*, e0125599.

Suzuki, A., Saba, R., Miyoshi, K., Morita, Y., and Saga, Y. (2012). Interaction between NANOS2 and the CCR4-NOT deadenylation complex is essential for male germ cell development in mouse. *PLoS One* *7*, e33558.

Suzuki, T., J, K.T., Ajima, R., Nakamura, T., Yoshida, Y., and Yamamoto, T. (2002). Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation. *Genes Dev* *16*, 1356-1370.

Takahashi, A., Kikuguchi, C., Morita, M., Shimodaira, T., Tokai-Nishizumi, N., Yokoyama, K., Ohsugi, M., Suzuki, T., and Yamamoto, T. (2012a). Involvement of CNOT3 in mitotic progression through inhibition of MAD1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* *419*, 268-273.

Takahashi, A., Morita, M., Yokoyama, K., Suzuki, T., and Yamamoto, T. (2012b). Tob2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 expression by sequestering Smads and C/EBPalpha during adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 32, 5067-5077.

Takahashi, F., Chiba, N., Tajima, K., Hayashida, T., Shimada, T., Takahashi, M., Moriyama, H., Brachtel, E., Edelman, E.J., Ramaswamy, S., *et al.* (2011). Breast tumor progression induced by loss of BTG2 expression is inhibited by targeted therapy with the ErbB/HER inhibitor lapatinib. *Oncogene* 30, 3084-3095.

Taverniti, V., and Seraphin, B. (2015). Elimination of cap structures generated by mRNA decay involves the new scavenger mRNA decapping enzyme Aph1/FHIT together with DcpS. *Nucleic Acids Res* 43, 482-492.

Tay, Y., Kats, L., Salmena, L., Weiss, D., Tan, S.M., Ala, U., Karreth, F., Poliseno, L., Provero, P., Di Cunto, F., *et al.* (2011). Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell* 147, 344-357.

Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M., and Parker, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11, 371-382.

Temme, C., Zhang, L., Kremmer, E., Ihling, C., Chartier, A., Sinz, A., Simonelig, M., and Wahle, E. (2010). Subunits of the Drosophila CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation. *RNA* 16, 1356-1370.

Terra, R., Luo, H., Qiao, X., and Wu, J. (2008). Tissue-specific expression of B-cell translocation gene 2 (BTG2) and its function in T-cell immune responses in a transgenic mouse model. *Int Immunol* 20, 317-326.

Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., and Tokino, T. (2008). Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 68, 4123-4132.

Tsai, M.H., Chen, X., Chandramouli, G.V., Chen, Y., Yan, H., Zhao, S., Keng, P., Liber, H.L., Coleman, C.N., Mitchell, J.B., *et al.* (2006). Transcriptional responses to ionizing radiation reveal that p53R2 protects against radiation-induced mutagenesis in human lymphoblastoid cells. *Oncogene* 25, 622-632.

Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., and Inada, T. (2012). Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol Cell* 46, 518-529.

Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L., and Parker, R. (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104, 377-386.

Tzachanis, D., Freeman, G.J., Hirano, N., van Puijenbroek, A.A., Delfs, M.W., Berezovskaya, A., Nadler, L.M., and Boussiotis, V.A. (2001). Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. *Nat Immunol* 2, 1174-1182.

Uchida, N., Hoshino, S., Imataka, H., Sonenberg, N., and Katada, T. (2002). A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem* 277, 50286-50292.

Uchida, N., Hoshino, S., and Katada, T. (2004). Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* 279, 1383-1391.

Vadgama, J.V., Scuric, Z., Chakrabarti, R., Marzo, E., Shen, D., and Wu, Y. (2006). Insulin-like growth factor I differentially regulates the expression of HIRF1/hCAF1 and BTG1 genes in human MCF-7 breast cancer cells. *Int J Mol Med* 18, 129-139.

Vallee, M., Gravel, C., Palin, M.F., Reghenas, H., Stothard, P., Wishart, D.S., and Sirard, M.A. (2005). Identification of novel and known oocyte-specific genes using complementary DNA subtraction and microarray analysis in three different species. *Biol Reprod* *73*, 63-71.

van den Elzen, A.M., Henri, J., Lazar, N., Gas, M.E., Durand, D., Lacroute, F., Nicaise, M., van Tilbeurgh, H., Seraphin, B., and Graille, M. (2010). Dissection of Dom34-Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways. *Nat Struct Mol Biol* *17*, 1446-1452.

van den Elzen, A.M., Schuller, A., Green, R., and Seraphin, B. (2014). Dom34-Hbs1 mediated dissociation of inactive 80S ribosomes promotes restart of translation after stress. *EMBO J* *33*, 265-276.

van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., and Parker, R. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* *295*, 2262-2264.

Varnum, B.C., Reddy, S.T., Koski, R.A., and Herschman, H.R. (1994). Synthesis, degradation, and subcellular localization of proteins encoded by the primary response genes TIS7/PC4 and TIS21/PC3. *J Cell Physiol* *158*, 205-213.

Waanders, E., Scheijen, B., van der Meer, L.T., van Reijmersdal, S.V., van Emst, L., Kroeze, Y., Sonneveld, E., Hoogerbrugge, P.M., van Kessel, A.G., van Leeuwen, F.N., *et al.* (2012). The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet* *8*, e1002533.

Wagener, N., Bulkescher, J., Macher-Goeppinger, S., Karapanagiotou-Schenkel, I., Hatiboglu, G., Abdel-Rahim, M., Abol-Enein, H., Ghoneim, M.A., Bastian, P.J., Muller, S.C., *et al.* (2013). Endogenous BTG2 expression stimulates migration of bladder cancer cells and correlates with poor clinical prognosis for bladder cancer patients. *Br J Cancer* *108*, 973-982.

Wang, H., Morita, M., Yang, X., Suzuki, T., Yang, W., Wang, J., Ito, K., Wang, Q., Zhao, C., Bartlam, M., *et al.* (2010). Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *EMBO J* *29*, 2566-2576.

Wang, X.M., Gao, X., Zhang, X.H., Tu, Y.Y., Jin, M.L., Zhao, G.P., Yu, L., Jing, N.H., and Li, B.M. (2006). The negative cell cycle regulator, Tob (transducer of ErbB-2), is involved in motor skill learning. *Biochem Biophys Res Commun* *340*, 1023-1027.

Wang, Z., Jiao, X., Carr-Schmid, A., and Kiledjian, M. (2002). The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 12663-12668.

Washio-Oikawa, K., Nakamura, T., Usui, M., Yoneda, M., Ezura, Y., Ishikawa, I., Nakashima, K., Noda, T., Yamamoto, T., and Noda, M. (2007). Cnot7-null mice exhibit high bone mass phenotype and modulation of BMP actions. *J Bone Miner Res* *22*, 1217-1223.

Watanabe, C., Morita, M., Hayata, T., Nakamoto, T., Kikuguchi, C., Li, X., Kobayashi, Y., Takahashi, N., Notomi, T., Moriyama, K., *et al.* (2014). Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via CNOT3. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 2692-2697.

Wessely, O., Kim, J.I., Tran, U., Fuentealba, L., and De Robertis, E.M. (2005). xBtg-x regulates Wnt/beta-Catenin signaling during early *Xenopus* development. *Dev Biol* *283*, 17-28.

Wheaton, K., Muir, J., Ma, W., and Benchimol, S. (2010). BTG2 antagonizes Pin1 in response to mitogens and telomere disruption during replicative senescence. *Aging cell* *9*, 747-760.

Witherell, G. (2001). In Vitro Translation Using HeLa Extract. *Curr Protoc Cell Biol* *6*, 11.18:11.18.11-11.18.10.

Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E., and Song, H. (2005). Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J* *24*, 4082-4093.

Wu, X., Ding, N., Hu, W., He, J., Xu, S., Pei, H., Hua, J., Zhou, G., and Wang, J. (2014). Down-regulation of BTG1 by miR-454-3p enhances cellular radiosensitivity in renal carcinoma cells. *Radiat Oncol* *9*, 179.

Xiao, F., Deng, J., Yu, J., Guo, Y., Chen, S., and Guo, F. (2016). A novel function of B-cell translocation gene 1 (BTG1) in the regulation of hepatic insulin sensitivity in mice via c-Jun. *FASEB J* 30, 348-359.

Xiong, B., Rui, Y., Zhang, M., Shi, K., Jia, S., Tian, T., Yin, K., Huang, H., Lin, S., Zhao, X., et al. (2006). Tob1 controls dorsal development of zebrafish embryos by antagonizing maternal beta-catenin transcriptional activity. *Dev Cell* 11, 225-238.

Xu, K., Bai, Y., Zhang, A., Zhang, Q., and Bartlam, M.G. (2014). Insights into the structure and architecture of the CCR4-NOT complex. *Front Genet* 5, 137.

Yamamoto, N., Uzawa, K., Yakushiji, T., Shibahara, T., Noma, H., and Tanzawa, H. (2001). Analysis of the ANA gene as a candidate for the chromosome 21q oral cancer susceptibility locus. *Br J Cancer* 84, 754-759.

Yamashita, A., Chang, T.C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1054-1063.

Yamashita, A., Izumi, N., Kashima, I., Ohnishi, T., Saari, B., Katsuhata, Y., Muramatsu, R., Morita, T., Iwamatsu, A., Hachiya, T., et al. (2009). SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 23, 1091-1105.

Yanagida, S., Taniue, K., Sugimasa, H., Nasu, E., Takeda, Y., Kobayashi, M., Yamamoto, T., Okamoto, A., and Akiyama, T. (2013). ASBEL, an ANA/BTG3 antisense transcript required for tumorigenicity of ovarian carcinoma. *Sci Rep* 3, 1305.

Yang, X., Morita, M., Wang, H., Suzuki, T., Yang, W., Luo, Y., Zhao, C., Yu, Y., Bartlam, M., Yamamoto, T., et al. (2008). Crystal structures of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity. *Nucleic Acids Res* 36, 6872-6881.

Yoneda, M., Suzuki, T., Nakamura, T., Ajima, R., Yoshida, Y., Kakuta, S., Katsuko, S., Iwakura, Y., Shibutani, M., Mitsumori, K., et al. (2009). Deficiency of antiproliferative family protein Ana correlates with development of lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 100, 225-232.

Yoshida, N.L., Miyashita, T., U, M., Yamada, M., Reed, J.C., Sugita, Y., and Oshida, T. (2002). Analysis of gene expression patterns during glucocorticoid-induced apoptosis using oligonucleotide arrays. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1254-1261.

Yoshida, Y., Hosoda, E., Nakamura, T., and Yamamoto, T. (2001). Association of ANA, a member of the antiproliferative Tob family proteins, with a Caf1 component of the CCR4 transcriptional regulatory complex. *Jpn J Cancer Res* 92, 592-596.

Yoshida, Y., Matsuda, S., Ikematsu, N., Kawamura-Tsuzuku, J., Inazawa, J., Umemori, H., and Yamamoto, T. (1998). ANA, a novel member of Tob/BTG1 family, is expressed in the ventricular zone of the developing central nervous system. *Oncogene* 16, 2687-2693.

Yoshida, Y., Nakamura, T., Komoda, M., Satoh, H., Suzuki, T., Tsuzuku, J.K., Miyasaka, T., Yoshida, E.H., Umemori, H., Kunisaki, R.K., et al. (2003a). Mice lacking a transcriptional corepressor Tob are predisposed to cancer. *Genes Dev* 17, 1201-1206.

Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T., et al. (2000). Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* 103, 1085-1097.

Yoshida, Y., von Bubnoff, A., Ikematsu, N., Blitz, I.L., Tsuzuku, J.K., Yoshida, E.H., Umemori, H., Miyazono, K., Yamamoto, T., and Cho, K.W. (2003b). Tob proteins enhance inhibitory Smad-receptor interactions to repress BMP signaling. *Mech Dev* 120, 629-637.

- Yu, B.L., Peng, X.H., Zhao, F.P., Liu, X., Lu, J., Wang, L., Li, G., Chen, H.H., and Li, X.P.** (2014). MicroRNA-378 functions as an onco-miR in nasopharyngeal carcinoma by repressing TOB2 expression. *Int J Oncol* 44, 1215-1222.
- Yu, C., Ji, S.Y., Sha, Q.Q., Dang, Y., Zhou, J.J., Zhang, Y.L., Liu, Y., Wang, Z.W., Hu, B., Sun, Q.Y., et al.** (2016). BTG4 is a meiotic cell cycle-coupled maternal-zygotic-transition licensing factor in oocytes. *Nat Struct Mol Biol* 23, 387-394.
- Yu, J., Liu, P., Cui, X., Sui, Y., Ji, G., Guan, R., Sun, D., Ji, W., Liu, F., Liu, A., et al.** (2011). Identification of novel subregions of LOH in gastric cancer and analysis of the HIC1 and TOB1 tumor suppressor genes in these subregions. *Mol Cells* 32, 47-55.
- Zhang, H., Tang, J., Li, C., Kong, J., Wang, J., Wu, Y., Xu, E., and Lai, M.** (2015). MiR-22 regulates 5-FU sensitivity by inhibiting autophagy and promoting apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Lett* 356, 781-790.
- Zhang, L., Huang, H., Wu, K., Wang, M., and Wu, B.** (2010). Impact of BTG2 expression on proliferation and invasion of gastric cancer cells in vitro. *Mol Biol Rep* 37, 2579-2586.
- Zhang, Y.W., Nasto, R.E., Varghese, R., Jablonski, S.A., Serebriiskii, I.G., Surana, R., Calvert, V.S., Bebu, I., Murray, J., Jin, L., et al.** (2016). Acquisition of estrogen independence induces TOB1-related mechanisms supporting breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 35, 1643-1656.
- Zhao, Y., Gou, W.F., Chen, S., Takano, Y., Xiu, Y.L., and Zheng, H.C.** (2013). BTG1 expression correlates with the pathogenesis and progression of ovarian carcinomas. *Int J Mol Sci* 14, 19670-19680.
- Zhu, R., Zou, S.T., Wan, J.M., Li, W., Li, X.L., and Zhu, W.** (2013). BTG1 inhibits breast cancer cell growth through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Oncol Rep* 30, 2137-2144.
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S.** (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456, 125-129.
- Zuo, Y., and Deutscher, M.P.** (2001). Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res* 29, 1017-1026.

FONCTION DES PROTÉINES BTG/TOB DANS LA DÉSADÉNYLATION DES ARN MESSAGERS EUCARYOTES

Résumé

Une détérioration des ARNm, le vecteur de l'information génétique, ou une altération des mécanismes régulant leur synthèse, leur traduction, ou leur dégradation peut être responsable de l'apparition d'une maladie. Ainsi, il est important de comprendre les mécanismes affectant les ARNm et notamment leur dégradation. Cette dernière est initiée par la réaction de désadénylation caractérisée par le raccourcissement progressif de la queue poly(A) de l'ARNm. Un complexe responsable de la désadénylation est CCR4-NOT. Les protéines BTG/Tob lient la désadénylase CAF1 de CCR4-NOT via leur domaine APRO. Dans cette thèse, l'interaction de BTG2 avec PABPC1, la protéine liant la queue poly(A), a été étudiée. Cette association augmente l'activité désadénylase de CAF1 *in vitro* et *in cellulo*. Le rôle de cette liaison sur les propriétés antiprolifératives de BTG2 et l'impact de BTG2 sur la traduction ont aussi été analysés. Un modèle expliquant l'activation de la désadénylation par BTG2 est proposé.

Mots-clés : BTG/Tob, désadénylation, CAF1, PABPC1

Résumé en anglais

Damaging mRNA, the molecules carrying the genetic information, or altering the mechanisms responsible for their synthesis, their translation or their degradation can be responsible for initiating diseases. It is thus important to understand the mechanisms impacting mRNA, especially their degradation. The latter is initiated by the deadenylation reaction characterized by the progressive shortening of the mRNA 3' poly(A) tail. One of the complexes responsible for deadenylation is CCR4-NOT. BTG/Tob proteins are able to bind the CAF1 deadenylase of CCR4-NOT via their APRO domain. In this thesis, interaction of BTG2 with PABPC1, the factor binding poly(A) tail, was analyzed. This binding stimulates CAF1 deadenylase activity *in vitro* and *in cellulo*. The role of this interaction on the antiproliferative properties of BTG2 and the impact of BTG2 on translation were also investigated. A model explaining deadenylation activation by BTG2 is proposed.

Keywords: BTG/Tob, deadenylation, CAF1, PABPC1