



**HAL**  
open science

# Reconnaissance structurale des microARN par les protéines de liaison à l'ARN dans les cancers - Etude de l'interaction entre miR-21 et HuR

Virginie Bernard

► **To cite this version:**

Virginie Bernard. Reconnaissance structurale des microARN par les protéines de liaison à l'ARN dans les cancers - Etude de l'interaction entre miR-21 et HuR. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL142 . tel-04431534

**HAL Id: tel-04431534**

**<https://theses.hal.science/tel-04431534v1>**

Submitted on 1 Feb 2024

**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.

# Reconnaissance structurale des microARN par les protéines de liaison à l'ARN dans les cancers – Etude de l'interaction entre miR-21 et HuR

*Structural recognition of microRNA by RNA-binding proteins in cancers –  
study of miR-21 and HuR interaction*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577 : Structure et Dynamique des Systèmes vivants (SDSV)  
Spécialité de doctorat : Biochimie et Biologie Structurale  
Graduate School : Life Science and Health  
Référent : Université d'Evry Val d'Essonne

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Structure-Activité des Biomolécules  
Normales et Pathologiques (Université Paris-Saclay, Inserm, Univ Evry)**.  
Sous la direction de **David PASTRE**, Professeur  
et de le co-encadrement de **Emilie STEINER**, Maître de Conférences.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 13 décembre 2023, par

**Virginie BERNARD**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

<b>Ewen LESCOP</b> Directeur de recherche, Université Paris- Saclay	Président
<b>Bruno KIEFFER</b> Professeur, Strasbourg ESBS	Rapporteur & Examineur
<b>Anne-Catherine PRATS</b> Directrice de recherche, Université Toulouse III	Rapporteur & Examinatrice
<b>Marina PINSKAYA</b> Maître de Conférences, Sorbonne Université	Examinatrice

**Titre :** Reconnaissance structurale des microARN par les protéines de liaison à l'ARN dans les cancers - Etude de l'interaction entre miR-21 et HuR.

**Mots clés :** protéine, miARN, interaction, structure, dynamique, cancer

**Résumé :** Comprendre les mécanismes post-transcriptionnels conduisant à l'inflammation chronique et au cancer est crucial pour la prévention et le développement de thérapies. Au cours des dix dernières années, un intérêt particulier s'est porté vers deux classes de molécules régulatrices, représentées par les protéines de liaison à l'ARN (RBP) et les microARN (miARN). Bien que ces régulateurs soient impliqués dans la réponse inflammatoire et la tumorigenèse, des études récentes ont mis en évidence le rôle central d'interactions fonctionnelles entre miARN et RBP lors desquelles ils coopèrent ou s'opposent lors de la régulation d'ARN messager (ARNm) communs. Parmi les RBPs identifiées dans la littérature, la protéine Human Antigen R (HuR/ELAVL1) apparaît comme un marqueur protéique prometteur dans la recherche sur le cancer. En effet, exprimée de façon ubiquitaire, elle s'impose comme un acteur important de la régulation de la stabilité et de la traduction d'ARNm codant pour des protéines responsables de la progression tumorale et des métastases. En interagissant avec des séquences riches en Adénine et Uracile (ARE) situées dans la région 3' non traduite (3'-UTR) des ARNm, HuR entre alors en compétition avec des miARN, inhibant leurs fonctions de répression. Plus intéressant encore, HuR est la première RBP reportée ayant la capacité de se lier directement aux miARN matures ajoutant un nouveau niveau de complexité à la régulation de l'expression génique. En effet, il a été montré, qu'en réponse à un stimulus inflammatoire, HuR est transporté du noyau vers le cytoplasme où il se lie directement à miR-21, un miARN oncogène mature, le séquestrant et empêchant ainsi la répression de la traduction de son gène cible PDCD4 (Programmed Cell Death 4), qui contrôle l'apoptose pendant l'inflammation. Ces observations ont conduit à qualifier HuR 'd'éponge' à miARN. Néanmoins, aucun détail mécanistique conduisant à ce mode de régulation combinatoire n'a encore été établi.

En utilisant une approche intégrative, l'objectif général a consisté à élucider les signatures structurales menant à la reconnaissance spécifique de miR-21 par HuR. Structuralement, HuR est constituée de trois motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM1, 2 et 3) pouvant chacun se lier à des ARE. Dans le cas du recrutement de miR-21 par HuR, les résultats obtenus ont indiqué que la liaison est menée par le tandem RRM1-2. Outre l'élucidation des résidus d'acides aminés responsables de la liaison, les expériences conduites ont montré que HuR dimérise le long de miR-21 en ciblant des séquences nucléotidiques spécifiques, critiques pour l'accroche et pour le maintien du dimère. L'investigation comparative de la protéine HuR pleine longueur et du fragment RRM1-2 a permis de mettre en évidence l'impact du RRM3 sur l'augmentation drastique de la stabilité et de l'affinité du complexe HuR-miR-21. Une étude approfondie a démontré que le RRM3 entraîne à travers sa propre homodimérisation une contrainte liant davantage les deux tandems RRM1-2 sur miR-21 et qu'il participe à la multimerisation lorsque les concentrations en ARN le permettent. Les empreintes structurales associées au mécanisme de séquestration de miR-21 par HuR ont été testées par des mutations in vitro et in cellulo, confirmant le rôle spécifique de chacun des RRM lors du recrutement de miR-21 par HuR.

Finalement, l'ensemble des résultats obtenus a permis de conduire à la proposition d'un modèle d'interaction HuR-miR-21 ouvrant la voie à la recherche de molécules à visée thérapeutique ciblant la réponse cellulaire à l'inflammation. D'autres miARN partenaires de HuR ont déjà été identifiés indiquant que les données spécifiques à la séquestration de miR-21 par HuR pourront servir de base à la compréhension de l'interactome HuR-miARN.

**Title :** Structural recognition of microRNA by RNA-binding proteins in cancers - Study of miR-21 and HuR interaction

**Keywords :** protein, miRNA, interaction, structure, dynamics, cancer

**Abstract :** Understanding post-transcriptional mechanisms leading to chronic inflammation and cancer is crucial for prevention and therapies to be developed. Over the last decade, interest has grown towards two classes of regulatory molecules represented by RNA-binding proteins (RBP) and microRNA (miRNA). While these regulators have shown to be involved in inflammatory response and tumorigenesis, recent studies have highlighted a functional interplay among themselves, where miRNA and RBP either cooperate or counteract in the regulation of shared messenger RNA (mRNA). Among reported RBP, the protein Human Antigen R (HuR/ELAVL1) appears as a promising protein biomarker in cancer research. In fact, ubiquitously expressed, this protein appears as a key regulator in the stability and the translation of mRNA coding for proteins implicated in tumor progression and metastases. When binding to Adenine and Uracil rich sequences (ARE) located in the 3' Untranslated Region (UTR) of mRNA, HuR competes with miRNA, inhibiting their repressive function. More interestingly, HuR is the first reported RBP with the ability to bind directly to mature miRNA adding a new layer of complexity in the regulation of gene expression. Indeed, it has been shown that, in response to inflammatory stimulus, HuR undergoes nuclear-cytoplasmic shuttling where it binds to miR-21, a mature oncogenic miRNA, sequestering it and thus preventing the translation repression of PDCD4, a gene which controls apoptosis during inflammation. These observations have led to the proposition of HuR acting as a 'miRNA sponge'. Nevertheless, no mechanistic details leading to this mode of combinatorial regulation have been established yet.

By using an integrative approach, the general objective was to elucidate the structural signatures leading to specific recognition of miR-21 by HuR. Structurally, HuR consists of three RNA Recognition Motifs (RRM1, 2 and 3), each of them binding to ARE. In the case of miR-21 recruitment by HuR, the results obtained indicated that the tandem RRM1-2 drives the binding. Besides the elucidation of the amino acid residues responsible for the binding, experiments showed that HuR dimerizes along miR-21, targeting specific nucleotide sequences, critical for the dimer establishment and holding onto miR-21. The comparative investigation of HuR full-length and RRM1-2 fragment highlighted the impact of RRM3 on the drastic increase in the stability and the affinity of HuR-miR-21 complex. An in-depth study has shown that RRM3 leads, through its own homodimerization, to a more constrained fixation of the two RRM1-2 tandems on miR-21 and that it can be part of multimerization processes depending on the local RNA concentrations. Structural fingerprints linked to the sequestration mechanism of miR-21 by HuR were tested by in vitro and in cellulo mutations, confirming the specific role of each RRM during the recruitment of miR-21 by HuR.

Finally, the results obtained led to the proposal of a HuR-miR-21 interaction model which could open the way to the search for therapeutic molecules targeting the cellular response to inflammation. Other miRNA partners of HuR have already been identified, indicating that data specific to miR-21 sequestration by HuR could provide a basis for understanding HuR-miRNA interactome.

## TABLE DES MATIERES

---

<b>Table des matières</b> .....	<b>4</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>8</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>10</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>15</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>18</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>19</b>
<b>I. Protéines de liaison à l'ARN</b> .....	<b>22</b>
I.1 Rôle dans le métabolisme des ARN .....	23
I.1.1 Pendant l'épissage alternatif.....	23
I.1.2 Dans le transport et la localisation .....	24
I.1.3 Dans la traduction .....	25
I.1.4 Dans la stabilisation et la dégradation des ARNm.....	26
I.2 Principaux domaines de liaisons .....	28
I.2.1 Domaines de « choc au froid » .....	29
I.2.2 Domaines à doigt de Zinc.....	30
I.2.3 Domaines à Homologies K .....	31
I.2.4 Domaines de reconnaissance à l'ARN double brin .....	32
I.2.5 Motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM) .....	33
I.3 Implications dans des pathologies .....	35
I.3.1 Maladies neurodégénératives .....	36
I.3.2 Diabète .....	37
I.3.3 Cancers .....	37
<b>II. Micro-ARN (miARN)</b> .....	<b>39</b>
II.1 Biogenèse, production et régulation .....	39
II.2 Rôles des miARN dans la régulation des gènes.....	42
II.3 Implications pathologiques .....	44
II.3.1 Neurologiques.....	44
II.3.2 Cancers .....	45
<b>III. Interactions fonctionnelles entre RBP et miARN</b> .....	<b>49</b>
III.1 Interactions compétitives .....	50
III.2 Interactions synergiques.....	50
III.3 Interactions par médiation.....	51

<b>IV. Human Antigen R (HuR/ELAVL1)</b>	<b>52</b>
IV.1	Présentation de la famille ELAVL.....52
IV.2	La structure de HuR.....53
IV.3	Expression de HuR.....57
IV.4	Distribution subcellulaire de HuR.....57
IV.5	Régulation transcriptionnelle.....58
IV.6	Modifications post-traductionnelles.....59
IV.6.1	Les phosphorylations.....60
IV.6.2	Les ubiquitinations.....63
IV.6.3	Les méthylations.....64
IV.6.4	La protéolyse.....65
IV.7	Fonctions de HuR.....66
IV.7.1	Stabilisation des ARNm.....66
IV.7.2	Activation de la traduction.....67
IV.7.3	Répression de la traduction.....68
IV.8	Implication de HuR dans les cancers.....68
IV.8.1	Développement et croissance des cellules tumorales.....69
IV.8.2	La survie cellulaire.....70
IV.8.3	Invasion et métastases.....71
IV.8.4	Angiogenèse.....72
IV.8.5	Inflammation tumorale.....73
IV.8.6	Les réponses aux traitements.....74
<b>V. Micro-ARN-21 (miR-21)</b>	<b>76</b>
V.1	Biogénèse.....76
V.2	Les fonctions de miR-21.....79
V.2.1	Dans le développement embryonnaire.....79
V.2.2	Dans le système immunitaire.....80
V.2.3	Dans la fibrose.....81
V.2.4	Dans les cancers.....82
V.3	Propriétés oncogènes.....83
V.3.1	Expression de miR-21 dans les cancers.....83
V.3.2	Fonctions dans les cancers.....84
V.3.3	Un biomarqueur potentiel ?.....87
V.3.4	Une cible thérapeutique.....87
<b>VI. Interaction fonctionnelle entre HuR et miR-21 dans les cancers</b>	<b>88</b>

<b>Objectifs</b> .....	<b>91</b>
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>93</b>
<b>I. Préparation des plasmides et clonages</b> .....	<b>93</b>
I.1 Pour la biochimie (RMN et ITC) .....	93
I.2 Pour la technologie Microtubule Bench.....	94
I.3 Mutations du gène <i>hur</i> .....	95
<b>II. Méthodes de biochimie</b> .....	<b>98</b>
II.1 Production et purification de protéine .....	98
II.1.1 Protéines utilisées en RMN.....	98
II.1.2 Protéines utilisées en ITC .....	101
II.1.3 Protéines pour les expériences RMN PRE.....	101
II.2 Oligonucléotides utilisés en ITC et RMN.....	102
II.3 Titration Calorimétrique Isotherme .....	104
II.3.1 Principe général .....	104
II.3.2 Applications.....	105
<b>III. Résonance Magnétique Nucléaire</b> .....	<b>106</b>
III.1 Principe .....	107
III.2 Acquisition des spectres 2D .....	108
III.3 Phénomènes d'échange.....	110
III.4 Perturbations des déplacements chimiques.....	111
III.5 Mesure des temps de relaxation $R_1$ et $R_2$ .....	112
III.6 Expériences PRE .....	115
<b>IV. Technique de la Microtubule Bench</b> .....	<b>116</b>
IV.1 Principe de la technique .....	116
IV.2 Culture cellulaire et co-transfection.....	117
IV.3 Acquisition et analyse des images.....	118
IV.4 Analyse automatique du score d'auto-association.....	119
<b>Résultats</b> .....	<b>120</b>
<b>I. Etudes in vitro du tandem RRM1-2 de HuR</b> .....	<b>120</b>
I.1 Identification des résidus d'acides aminés de HuR interagissant avec miR-21.....	121
I.2 Elucidation de la stœchiométrie du complexe HuR-ADN-21 .....	125
I.3 Caractérisation thermodynamique et structurale de la formation du dimère de HuR le long d'ADN-21 .....	129
I.4 Détermination des nucléotides d'ADN-21 ciblés par HuR.....	132

I.5	Identification de la proximité spatiale entre unités monomériques .....	137
<b>II.</b>	<b>Etude in vitro de HuR pleine longueur .....</b>	<b>141</b>
II.1	Dimérisation coopérative de HuR sur ADN-21.....	143
II.2	Rôle du RRM3 .....	146
<b>III.</b>	<b>Etude de mutants de HuR dans un contexte cellulaire .....</b>	<b>152</b>
	<b>Discussion .....</b>	<b>157</b>
	<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>162</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>166</b>



## REMERCIEMENTS

---

En préambule, je voudrais d'abord citer une phrase célèbre de Philippe Pollet-Villard : "dans un voyage ce n'est pas la destination qui compte mais toujours le chemin parcouru et les détours surtout."

Mon voyage a duré trois belles années et mon chemin, bien que semé parfois d'embûches, m'a amené à rencontrer de formidables personnes.

Permettez-moi par conséquent de prendre le temps de remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnée et soutenue tout au long de ces trois intenses années de doctorat.

En premier lieu, Je remercie mon directeur de thèse David Pastré de m'avoir accordée sa confiance pour mener à bien ce projet. Ses conseils professionnels et nos discussions lors de surveillance de TP m'ont été très utiles, m'ont confortée dans mes choix, et me serviront pour le futur j'en suis certaine.

De même, je tiens tout particulièrement à remercier Emilie Steiner pour son implication et son soutien sans faille tout au long de ce projet qui nous en aura fait voir de toutes les couleurs ("Pour le plaisir !"). Son expertise et ses connaissances m'ont permis de découvrir et d'apprécier la technique RMN qui m'était jusqu'alors inconnue. Ces trois ans passés à ses côtés, toujours dans la bonne humeur, m'ont sans nul doute fait évoluer tant professionnellement que personnellement.

Je remercie ensuite Juan-Carlos Rengifo pour son aide précieuse ("attention tu coules à côté !") lors de mes expériences et ses idées pour résoudre les différents problèmes que j'ai rencontrés durant ces trois années.

Je tiens aussi à remercier Naëlle Nzamba (maitre de l'ITC) pour son implication dans ce projet lors de son stage et pour son aide lors de mes derniers mois de thèse. Merci aussi à Pierrick Craveur pour son investissement et sa contribution dans la compréhension d'un projet complexe.

Je remercie de même Vandana Joshi pour m'avoir aidée et transmis son savoir-faire en biologie cellulaire et moléculaire. Merci aussi à Olek Maciejak d'avoir partagé son savoir pour la RMN et Ahmed Boush pour m'avoir formée aux techniques de biochimie.

Puis, je remercie tous les doctorants pour l'entraide et les bons moments passés dans les laboratoires et en particulier Célia Rabhi, Diane Valenti, Kimberley Gargoly et

Evgeniia Mamontova pour les nombreuses sessions karaokés (la team "confession nocturne").

Merci à tous les membres du laboratoire SABNP pour leur accueil et leur contribution au bon déroulement de ma thèse, en particulier Lydia Lebouil (la super secrétaire, "moi je l'ai vu !") et Jean Salone, sans qui le laboratoire ne fonctionnerait sûrement pas aussi bien !

Merci à tous pour les moments de convivialité partagés pendant les pique-niques, les anniversaires et les sorties restaurants. Ces moments et votre présence à mes côtés ont rendu le chemin moins escarpé !

Je remercie les collaborateurs de l'Institut IISER, plus spécialement Partho Ray et Binita Goswani avec qui j'ai pu échanger et discuter de ce projet lors de leurs visites au sein du laboratoire.

Je souhaite également remercier les membres du jury, Ewen Lescop qui a présidé ce jury, les rapporteurs Anne-Catherine Prats et Bruno Keiffer, et l'examinatrice Marina Pinskaya pour avoir consacré de leur temps à la relecture de ce travail, ainsi que pour les discussions et les conseils qui ont suivis ma soutenance.

Un grand merci aux membres de mon comité de thèse Benjamin Cressiot et Ewen Lescop pour leurs conseils avisés et leurs implications dans le suivi de ce projet.

Merci aux personnels de l'école doctorale SDSV, de l'Université d'Evry-Val-d'Essonne et de l'Université Paris-Saclay que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces trois années.

Et enfin, merci à ma famille qui s'est toujours intéressée et a cherché à comprendre mon projet même si parfois c'était loin d'être simple pour eux ! merci.

Je suis reconnaissante envers mes parents qui m'ont poussée à entreprendre une thèse, m'ont toujours épaulée, mais surtout pour leur soutien et leur réconfort dans les moments difficiles. Merci à ma sœur Julie et à mon frère Victor pour leurs constants encouragements. Je remercie également les Bergiasol, ma deuxième famille de toujours être là pour moi.

Pour finir, c'est avec beaucoup d'émotion, de respect et d'amour que je dédie ce travail de thèse à mon grand-père Papounet et ma tante Armonie, Hasta siempre.

## ABREVIATIONS

---

- ActB** : Actin beta
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AGO** : Argonaute
- ALS** : Amyotrophic lateral sclerosis
- AP-1** : Activator protein 1
- ARE** : AU-rich elements
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNInc** : ARN long non-codant
- ARNm** : ARN messenger
- AUF1** : AU-rich factor 1
- AZA-9** : Azaphilone-9
- Bcl-2** : B-cell leukemia/lymphoma 2
- Bcl-x** : Bcl-2-like protein 1
- BDNF** : Brain-derived neurotrophic factor
- BMP4** : Bone morphogenetic protein 4
- CAF1** : Chromatin assembly factor 1
- CCNA2** : Cyclin A2
- CCND1** : Cyclin D1
- CCR4** : C-C motif chemokine receptor 4
- CDK** : Cyclin-dependant kinase
- CEBPA** : CCAAT/enhancer-binding protein alpha
- CHK2** : Checkpoint kinase 2
- COX-2** : Cyclooxygénase 2
- cPLA2 $\alpha$**  : Cytosolic phospholipase A2
- CRD-BP** : Coding region determinant-binding protein
- CSD** : Cold shock domain
- CYP2E1** : Cytochrome P450 2E1
- DAXX** : Death domain-associated protein 6

**DCP** : Decapping protein

**DDX5** : Dead box protein 5

**DGCR8** : Di George syndrome critical region 8

**dsRBD** : double-stranded RNA-binding domain

**E.coli** : Escherichia coli

**E2F8** : E2F transcription Factor 8

**ECRG2** : Esophageal cancer-related gene 2

**eEF** : Eukaryotic elongation translational factor

**EGF** : Epidermal growth factor

**eIF** : Eukaryotic initiation translational factor

**ELAVL** : Embryonic Lethal Abnormal Visual system Like

**ERK** : Extracellular signal-regulated kinase

**eTF** : Eukaryotic termination translational factor

**Ets** : Erythroblast transformation specific

**FMRP** : Fragile X mental retardation protein

**FOX** : Forkhead box

**FUS** : Fused in sarcoma

**FXR1** : Fragile x-mental retardation related protein 1

**G3BP1** : Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein 1

**hnRNP** : Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein

**HNS** : HuR nuclear-cytoplasmic shuttling

**HuR** : Human antigen R

**IGF2BP** : Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein

**IL-13** : Interleukin-13

**IRES** : Internal ribosome entry site

**JAK3** : Janus kinase 3

**JMY** : Junction mediating and regulatory protein

**KH** : K homology domain

**LARP** : La-related protein

**Lin28b** : Lin-28 homolog B

**LMA** : Leucémie myéloïde aiguë

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase

**METTL3** : Méthyltransférase like 3

**MEX67P** : Messenger RNA export factor of 67kDa

**miARN** : micro-ARN

**MKP** : MAP kinase phosphatase

**MMP** : Métalloprotéase matricielle

**MRE** : miARN response element

**Myc** : Myelocytomatosis oncogene

**Nanog** : Homeobox protein NANOG

**NEDD8** : Neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8

**NES** : Nuclear export signal

**NFI** : Nuclear factor I

**NF-κB** : Nuclear factor kappa B

**NLGN1** : Neuroligin 1

**NLS**: Nuclear localization signal

**NONO** : Non-POU domain-containing octamer binding

**NOVA** : Neuro-oncological ventral antigen

**Oct4** : Octamer-binding transcription factor 4

**P2RY12** : Purinergic receptor P2Y12

**PABP** : Poly(A)-binding protein

**P-bodies** : Processing-Podies

**PDCD4** : Programmed cell death 4

**PKB** : Protein kinase B

**PKC** : Protein kinase C

**Pré-miARN**: miARN précurseur

**Pri-miARN** : miARN primaire

**PRMT** : Protéines arginine méthyltransférase

**PTEN** : Phosphatase and tensin homolog

**PTM** : Modification post-traductionnelle

**PUM1** : Pumilio homolog 1

**PURB** : Purine rich element binding protein B

**QKI-7** : Quaking-7

**RBD** : RNA-binding domain

**RBFOX2** : RNA-binding Fox-1 homolog 2

**RBP** : RNA-binding protein

**RECK** : Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs

**REGNASE-1** : Regulatory RNase 1

**REST** : Repressor element 1-silencing transcription factor

**RhoB** : Ras homolog gene family member B

**RISC** : RNA-induced silencing complex

**RNP** : Ribonucléoprotéines

**RRM** : RNA recognition motif

**SAM** : S-adenosylméthionine

**SAM68** : Src associated in mitosis of 68 kDA

**siARN** : ARN interférant

**SIRT1** : Silent mating type information regulator two homolog 1

**SKP2** : S-phase kinase-associated protein-2

**SMAD** : Komologie en référence à SMA "small" worm phenotype et MAD "Mothers Against Decapentaplegic"

**Sox2** : SRY-box transcription factor 2

**Spry1** : Sprouty homolog 1

**SPRY2** : Sprouty RTK signaling antagonist 2

**STAT3** : Signal transducer and activator of transcription 3

**STAU** : STAUFEN

**SXL** : Sex-lethal

**TDP-43** : TAR DNA-binding protein 43

**TEM** : Transition épithélio-mésenchymateuse

**TFIIIA** : Transcription factor IIIA

**TGF-β** : Transforming growth factor β

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

**TIMP3** : Tissue inhibitor metalloproteinase 3  
**TIS11d** : TPA-induced sequence 11  
**TMEM49** : protéine transmembranaire 49  
**TNF- $\alpha$**  : Tumor necrosis factor- $\alpha$   
**TOP** : Terminal oligopyrimidine  
**TPM1** : Tropomyosin 1  
**TRA2 $\beta$**  : Splicing factor transformer 2  
**TSG-6** : TNF- $\alpha$ -stimulated gene/protein 6  
**TSP-1** : Thrombospondine-1  
**TSS** : Transcription start site  
**TUBB3** : Tubulin beta 3 class III  
**uPA** : Urokinase  
**UTR** : Untranslated region  
**UVC** : UV à courte longueur d'onde  
**VEGF** : Vascular endothelial growth factor  
**XRN1** : 5'-3' exoribonuclease 1  
**YB-1** : Y box binding protein 1  
**YRAP** : Yeast hnRNP-like protein 1  
**ZF** : Zinc finger  
 **$\beta$ TrCP1** : Beta-transducin repeats-containing protein

## LISTE DES FIGURES

---

### Introduction

Figure 1 : Évolution de l'incidence et de la mortalité des cancers du sein .....	19
Figure 2 : Rôles des RBP dans le métabolisme des ARN.....	22
Figure 3 : Étapes de la dégradation des ARNm .....	28
Figure 4 : Structure 3D du CSD de la protéine CspA chez E.coli .....	30
Figure 5 : Structure 3D du domaine ZF 31 de la protéine Xfin chez le Xenopus .....	31
Figure 6 : Illustration des deux topologies de domaines KH possibles. ....	32
Figure 7 : Liaison du dsRBD1 de la protéine ADAR2 avec un ARN tige-boucle .....	33
Figure 8 : Structure du RRM1 canonique de la protéine SXL interagissant avec un triplet de nucléotides UUU .....	34
Figure 9 : Schéma montrant les différentes étapes de la biogenèse des miARNs .....	40
Figure 10 : Diversité des interactions fonctionnelles entre miARN et RBP .....	49
Figure 11 : Structure de HuR.....	53
Figure 12 : Structures 3D du tandem constitué de RRM1 et RRM2.....	54
Figure 13 : Structures 3D du RRM3 de HuR .....	55
Figure 14 : Alignement de la séquence de HuR.....	56
Figure 15 : Résidus subissant des PTM et leurs impacts sur HuR .....	60
Figure 16 : HuR dans divers mécanismes de développement des cancers.....	69
Figure 17 : Séquence de la région promotrice putative de miR-21 .....	78
Figure 18 : Mécanisme de l'équilibre dynamique entre miR 21, HuR et l'ARNm PDCD4 ainsi que de la fonction éponge de HuR .....	90

### Matériels et méthodes

Figure 19 : Etapes de préparation du plasmide HuR-GFP-MBD.....	95
Figure 20 : Programme PCR utilisé pour générer les mutants de HuR.....	96
Figure 21 : Réaction chimique conduisant au greffage du MTSL sur la fonction thiol d'une Cystéine.....	102
Figure 22 : Principe général de l'ITC.....	105
Figure 23 : Séquence d'impulsion $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC utilisée .....	109
Figure 24 : Séquence d'impulsion de l'expérience SOFAST-HMQC utilisée.....	110



Figure 25 : Phénomènes d'échange en RMN.....	111
Figure 26 : Echelle de temps des mouvements moléculaires pouvant être étudiés par RMN.....	113
Figure 27 : Schéma des séquences d'impulsion utilisées pour la mesure des temps de relaxation $T_1$ et $T_2$ dans le cadre des travaux présentés.....	114
Figure 28 : Illustration des effets PRE intermoléculaires entre deux protéines induits par la présence d'une sonde MTSL .....	116
Figure 29 : Schéma de la méthode MT Bench .....	117

## Résultats

Figure 30 : Implication des RRM dans la liaison à miR-21 .....	120
Figure 31 : Résidus d'acides aminés de RRM1-2 critiques dans la liaison à miR-21.....	122
Figure 32 : Comparaison de la liaison de RRM1-2 avec miR-21 ou ADN-21. ....	123
Figure 33 : Résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison à ADN-21 .....	125
Figure 34 : Effets de la liaison de RRM1-2 à ADN-21 sur les intensités et les CSP.....	126
Figure 35 : Etude de la dynamique du complexe RRM1-2 : ADN-21.. .....	127
Figure 36 : Expériences ITC en fonction du ratio molaire [ADN]/[RRM1-2].....	128
Figure 37 : Effet de l'allongement des nucléotides sur la structure de RRM1-2. ....	130
Figure 38 : Schéma du positionnement des deux unités monomériques RRM2-RRM1-RRM2'-RRM1' selon la direction 5'-3' d'ADN21. ....	132
Figure 39 : Expérience EMSA.....	133
Figure 40 : CSP obtenus pour les mutations ponctuelles d'ADN-21.....	135
Figure 41 : Schéma du positionnement potentiel des deux unités monomériques sur ADN-21 et mise en évidence des résidus d'acides aminés impactés par les différentes mutations ponctuelles d'ADN-21. ....	136
Figure 42 : Position dans la structure 3D 4ED5 des mutants sélectionnés pour les expériences RMN PRE et leurs effets supposés. ....	137
Figure 43 : Proximité entre les deux unités monomériques.....	138
Figure 44 : Schéma représentant les différents types d'interactions (intra et intermoléculaire) liées à la présence de la sonde MTSL sur un résidu d'acide aminé.....	139
Figure 45 : Etude du complexe RRM1-2 : ADN-CG3 par RMN .....	140
Figure 46 : Schéma représentant le dimère RRM1-2 sur ADN-21 indiquant la proximité entre RRM1 et RRM2' . ....	141

Figure 47 : HuR-FL.....	142
Figure 48 : Liaison de HuR-FL à ADN-21 .....	143
Figure 49 : Expériences ITC en fonction du ratio molaire [ADN]/[HuR-FL].....	144
Figure 50 : Equilibre entre monomères et dimères de tandems RRM1-2.....	145
Figure 51 : Etude de RRM3 .....	146
Figure 52 : Spectres 2D <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC de HuR-FL complexée à ADN-21 .....	147
Figure 53 : Populations en équilibre dans HuR-FL.....	148
Figure 54 : Analyse des populations HuR-FL-W261E sur ADN-21.....	149
Figure 55 : Schéma représentant le complexe B constitué du positionnement de deux monomères RRM1-2 maintenus via l'interaction W261-W261 entre RRM3. ....	150
Figure 56 : Analyse du mutant HuR-FL-W261E en présence d'ADN-21.....	150
Figure 57 : Schéma représentant le complexe A dans lequel la position du RRM3 en 5' d'ADN-21 est suggérée.....	151
Figure 58 : Sélection des mutants MT Bench.....	153
Figure 59 : Image de cellules HeLa co-transfectées acquises sur l'imager HCS.....	154
Figure 60 : Résultats des mutants de HuR étudiés par MT Bench.....	155
Figure 61 : Rôle de la Lysine K182.....	156
Figure 62 : Superposition des spectres <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HuR-FL en présence d'ADN-21.....	160
Figure 63 : Schéma représentant le complexe C dans lequel des dimères de tandem RRM1-2 et de RRM3 se lient indépendamment à ADN-21, provoquant une multimérisation en excès d'ADN.....	161
Figure 64 : Schéma représentant les différentes conformations résultant de l'interaction HuR : miR-21 possiblement en échange dans les cellules.....	164

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Amorces utilisées pour le clonage de HuR-RRM3.....	93
Tableau 2 : Amorces utilisées pour générer les mutants de HuR .....	98
Tableau 3 : Composition des différents tampons .....	100
Tableau 4 : Séquences nucléotidiques des oligonucléotides utilisés .....	104
Tableau 5 : Protéines utilisées pour les expériences ITC .....	106
Tableau 6 : Récapitulatif des plasmides utilisés pour la MT Bench .....	118
Tableau 7 : Résidus d'acides aminés de RRM1-2 en interaction .....	124
Tableau 8 : Paramètres ITC obtenus lors de la titration de RRM1-2 par les ADN-12 à ADN-21. .....	130
Tableau 9 : Paramètres ITC obtenus lors de la titration de RRM1-2 par ADN-21 et ses mutants CG .....	134
Tableau 10 : Liste des résidus impactés par les mutants MTSL à une distance supérieure à 20 Å .....	139
Tableau 11 : Paramètres ITC obtenus lors de la titration de RRM1-2 et RRM3 par ADN-11 et ADN-12.....	151

## INTRODUCTION

Ces 30 dernières années ont laissé apparaître une recrudescence des cas de cancers dans le monde en faisant l'une des principales causes de mortalité, représentant près de 1 décès sur 6 (Figure 1). Cet accroissement est associé à l'augmentation d'une population vieillissante mais également à l'amélioration des techniques de dépistage. D'autres facteurs liés à des changements comportementaux ou socio-économiques peuvent permettre de comprendre l'évolution croissante du nombre de cas de certains cancers, comme le cancer du poumon chez la femme (+ 71% entre 2000 et 2014, *source CNCT*), conséquence d'une augmentation de tabagisme entre autres. Cette maladie, pouvant toucher des personnes de tout âge, se développe dans n'importe quelle partie de l'organisme et est caractérisée par une croissance anarchique et une multiplication rapide de cellules envahissant son voisinage et allant même jusqu'à migrer vers d'autres organes.

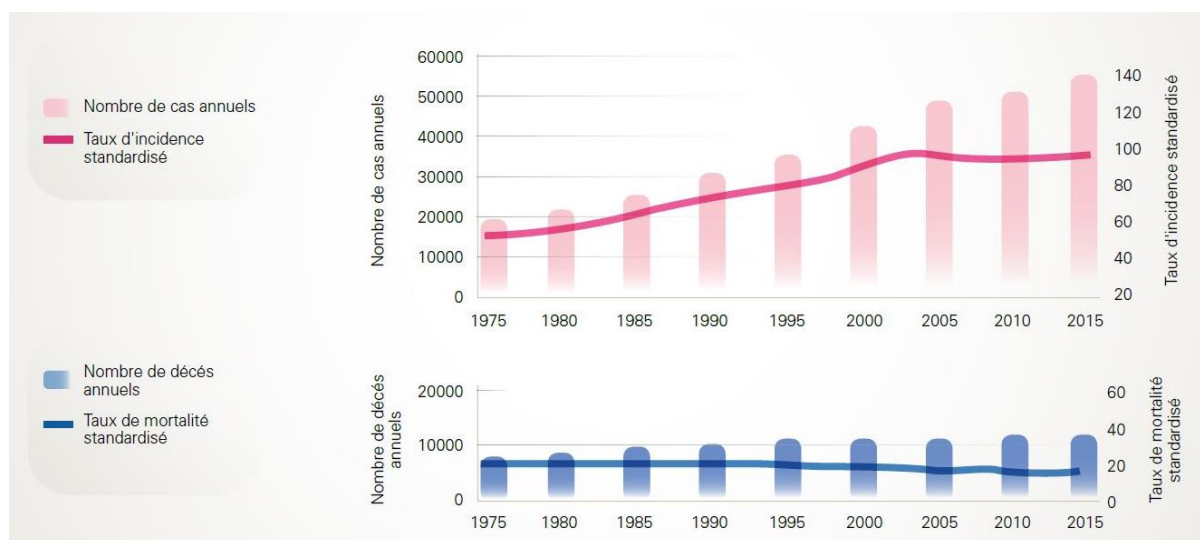


Figure 1 : Évolution de l'incidence et de la mortalité des cancers du sein entre 1975 et 2015, source : données Francim.

Une cellule saine peut devenir cancéreuse à la suite de modifications génétiques comme des mutations ou à la suite d'une dérégulation de la modulation de l'expression

génique. La variation dans l'expression de gènes est possible grâce à la régulation post-transcriptionnelle, un mécanisme essentiel ayant lieu après la transcription de l'ADN en ARNm (ARN messenger). Bien que la transcription génétique initiale soit un processus crucial pour la production d'ARNm correspondant, la régulation post-transcriptionnelle, intervenant par la suite, l'est tout autant puisqu'elle influence la localisation, la stabilité et la traduction de l'ARNm, assurant la précision et la flexibilité de l'expression génique et permettant ainsi aux cellules de répondre de manière adaptative aux stimuli internes et externes. De ce fait, la régulation post-transcriptionnelle joue un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques, tels que le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la réponse immunitaire, la régulation de l'homéostasie cellulaire ou encore le développement de pathologies complexes telles que le cancer (Corbett 2018; Nguyen-Chi et Morello 2008). Au cours de la régulation, plusieurs acteurs moléculaires vont interagir avec l'ARNm pour contrôler son destin. Ces régulateurs clé sont représentés par les protéines de liaison à l'ARN, appelées RBP (*RNA-binding proteins*), et par les miARN (micro-ARN), dont l'implication dans de nombreuses pathologies humaines suscite un véritable intérêt pharmaceutique.

Les RBP, tout comme les miARN, régulent l'expression des gènes en interagissant avec l'ARNm à différentes étapes de sa maturation et de sa traduction. Mais récemment, plusieurs études ont démontré la possibilité d'un niveau supplémentaire de régulation impliquant des interactions fonctionnelles entre RBP et miARN menant à un effet antagoniste ou coopératif lors du ciblage d'ARNm partagés (Ciafrè et Galardi 2013; Zealy et al. 2017; Connerty et al. 2015). Plus intéressant encore, un nouveau mécanisme de médiation dans lequel un miARN est privé de sa cible ARNm par l'interaction directe avec une RBP a été décrit. Bien que l'existence de ce type de mécanisme soit prouvée, aucun détail mécanistique conduisant à la reconnaissance spécifique entre miARN et RBP n'a été élucidé à ce jour. De ce fait, ce manuscrit de thèse porte sur la caractérisation des empreintes structurales conduisant aux interactions directes entre RBP et miARN.

L'étude implique ici HuR (*Human Antigen R*), souvent retrouvée dans les cancers à des niveaux d'expression anormaux, une RBP capable de séquestrer des miARN. En effet, HuR a été identifiée comme un régulateur génique favorisant un processus pathologique inflammatoire via son interaction directe avec miR-21, un oncomiR fréquemment surexprimé dans les cellules cancéreuses (Poria et al. 2016, Feng et Tsao 2016). Afin d'élucider les mécanismes responsables de la séquestration des miARN par les RBP, le complexe HuR-miR-21 a servi de complexe modèle aux travaux présentés dans cette thèse.

Ainsi, pour comprendre la relation structure-fonction existant entre HuR et miR-21, deux régulateurs majeurs de l'expression génique dans les cancers, l'introduction de ce manuscrit de thèse exposera dans un premier temps le rôle général des RBP et des miARN dans la régulation des gènes et leurs implications pathologiques. Puis, une seconde partie, spécifiquement dédiée à HuR et miR-21, sera consacrée à leurs aspects génétiques, structuraux et fonctionnels respectifs. Leurs relations aux cancers et leur impact commun lors de la régulation d'un gène pro-apoptotique clôtureront cette introduction. Par la suite, ce manuscrit détaillera les objectifs de cette thèse ainsi que la méthodologie suivie. Finalement, les résultats de cette étude seront présentés et discutés afin de mettre en lumière l'importance de motifs structuraux au sein de HuR et de miR-21 pouvant être à l'origine de leur reconnaissance spécifique.

Un modèle d'interaction traduisant l'ensemble des résultats structuraux et fonctionnels obtenus tout au long de ce travail de thèse pourra ainsi servir de base à l'illustration de ce nouveau mode de régulation des gènes modulée par des interactions directes RBP-miARN pouvant être attrayantes pour de nouvelles thérapies conduisant à l'inhibition de voies oncogéniques.

## I. Protéines de liaison à l'ARN

Un nombre élevé de protéines ont des capacités à se lier à l'ARN et à former des complexes transitoires ou stables. Ces protéines de liaison à l'ARN, appelées RBP, forment ainsi des complexes ARN/protéine, connus sous le nom de RNP (Ribonucléoprotéines). Les RBP, très conservées entre les espèces et représentant près de 7,5% du protéome chez l'humain (Hentze et al. 2018), sont des régulateurs clés qui interviennent lors d'événements post-transcriptionnels, c'est-à-dire lors de mécanismes essentiels permettant aux cellules de moduler l'expression des gènes après la transcription de l'ADN en ARNm. Les RBP possèdent des fonctions diversifiées et importantes pour le métabolisme des ARN, où elles vont jouer un rôle lors de l'épissage alternatif ou du transport des ARN mais également lors de la traduction, de la stabilité ou encore de la dégradation des ARNm (Figure 2). Les parties suivantes seront dédiées à la description des différents rôles pouvant être exercés par les RBP ainsi que la présentation de plusieurs exemples de leurs implications dans des pathologies.

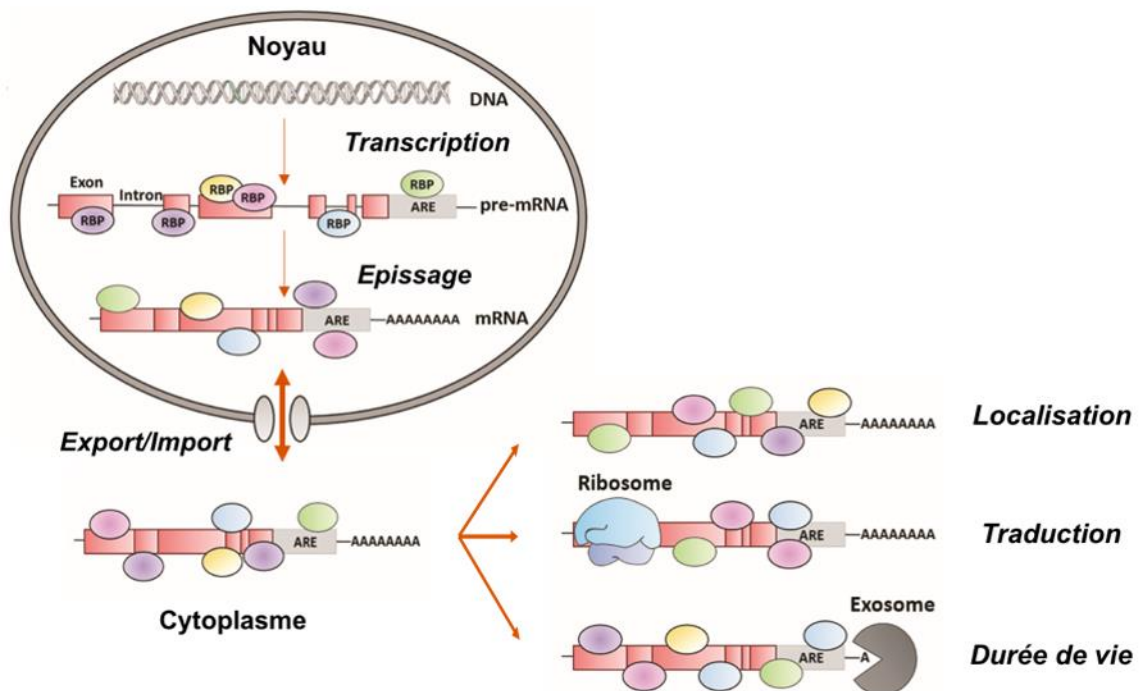


Figure 2 : Rôles des RBP dans le métabolisme des ARN (adapté de García-Mauriño et al. 2017).

## I.1 Rôle dans le métabolisme des ARN

### I.1.1 Pendant l'épissage alternatif

La diversité protéomique est en grande partie possible grâce à l'épissage alternatif qui permet la traduction d'ARNm en diverses protéines à partir d'un pré-ARNm. Même s'il existe un grand nombre de mécanismes contrôlant l'épissage alternatif, les interactions protéines-ARN sont considérées comme pivotales (Witten et Ule 2011). Des études sur le génome entier ont permis d'identifier la présence de certains motifs spécifiquement reconnus par les RBP aux alentours d'exons alternatifs, entraînant ainsi la découverte de nouvelles fonctions pour les RBP. Par exemple, l'implication de la protéine FOX (*Forkhead box*) dans l'épissage alternatif tissus spécifiques a été mis en évidence après la découverte d'un enrichissement de ses motifs de liaisons (U)GCAUG autour d'exons subissant un épissage alternatif spécifique dans le cerveau ou dans les muscles (Wang et al. 2008; Castle et al. 2008). L'interaction RBP-préARNm entraîne alors deux réponses : cette interaction peut conduire à l'exclusion d'exons lors de l'épissage ou à l'inclusion d'exons. Cette différence de mécanisme, dictée par la nature même de la RBP, peut également être conditionnée par le positionnement particulier de la protéine. En effet, la protéine NOVA (*Neuro-oncological ventral antigen*) peut conduire à l'inclusion ou à l'exclusion de certains exons : seul le positionnement de son site d'interaction sur le pré-ARNm suffit à définir l'issue de l'épissage alternatif (Ule et al. 2006). Le même type d'action a été mis en évidence pour la protéine hnRNP L (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L*). La liaison de la protéine sur des répétitions CA (Cytosine et Adénine) proches du site d'épissage 5' empêche la reconnaissance de ce site par les protéines responsables de l'épissage excluant l'exon. A l'inverse, lorsque hnRNP L se lie proche du site d'épissage en 3', l'exon se retrouve inclus (Heiner et al. 2010). A ce jour, les RBP ayant un rôle dans l'épissage d'ARNm ont toujours été étudiées individuellement or certaines RBP agissent sur le même pré-ARNm évoquant la possibilité d'interactions conjointes ou



de compétitions. Des études combinant plusieurs RBP pourraient augmenter la compréhension de ces interactions régulatrices vis-à-vis de l'épissage alternatifs.

### I.1.2 Dans le transport et la localisation

La localisation des ARNm joue un rôle important dans le maintien de l'asymétrie de distribution des protéines dans les cellules permettant ainsi la polarité de celles-ci. Le contrôle de localisation spécifique est crucial. Il permet l'élaboration de procédés essentiels dans le développement embryonnaire, comme l'axe de détermination chez la Drosophile, mais également d'assurer la spécificité de certaines cellules comme la plasticité des synapses des cellules neuronales, par exemple (Abouward et Schiavo 2021). Pour certaines cellules, la localisation spécifique des ARN est assurée par des granules de transport dont la composition reste encore floue. Même si certaines RPB comme G3BP1 (*ras-GTPase-activating Protéine SH3-Domain-Binding Protéine 1*) ou encore FMRP (*Fragile X mental retardation protein*) y ont été identifiées (Sahoo et al. 2018; Chu et al. 2019), leur rôle reste encore indéterminé. Certaines RBP, dont YRA1P (*Yeast hnRNP-like protein 1*), sont nécessaires pour l'export vers le cytoplasme de l'ARNm mature. En effet, YRA1P est principalement nucléaire mais semble intervenir dans le transport d'ARNm du noyau vers le cytoplasme. Pour cela, YRA1P s'associe avec la protéine MEX67P (*Messenger RNA export factor of 67 kDa*), elle-même associée aux pores nucléaires et à la queue poly(A) des ARNm, formant un complexe essentiel pour l'export des ARNm (Sträßer et Hurt 2000). Plusieurs protéines de la famille hnRNP semblent aussi être impliquées dans l'export d'ARNm telles que hnRNP A1 (Izaurralde et al. 1997) ou bien hnRNP L (Piñol-Roma et al. 1989). A contrario, les protéines hnRNP A2 et hnRNP U sont respectivement impliquées dans la localisation des ARNm (Hoek et al. 1998) ou dans la retenue des ARNm dans le noyau, indiquant les diversités de fonctions des RBP au sein d'une même famille (Dreyfuss et al. 2002).

### I.1.3 Dans la traduction

La traduction est l'étape cruciale à la synthèse des protéines à partir d'ARNm. Cette étape a lieu dans le cytoplasme et nécessite le bon déroulement des étapes d'épissage dans le noyau et d'export vers le cytoplasme. La traduction se fait en plusieurs étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation de la traduction fait intervenir les facteurs eucaryotiques d'initiation (eIF) responsables de la reconnaissance de l'ARNm et du recrutement des ribosomes. L'étape d'élongation débute seulement lorsque les ribosomes se trouvent sur le codon de départ (codon *start*) relâchant alors les protéines eIF et recrutant les facteurs eucaryotiques d'élongation (eEF) aidant pour le positionnement des acides aminés. Les facteurs eucaryotiques de terminaison (eTF) reconnaissent le codon de terminaison (codon *stop*) entraînant l'arrêt de la traduction et le relargage de la protéine nouvellement synthétisée. La présence de différentes RBP sur les ARNm, due à la structure de l'ARNm ou à des stimuli divers, permet une traduction sélective (Sossin et DesGroseillers 2006). Certaines RBP vont faciliter la traduction comme le facteur d'initiation eIF4E (*Eukaryotic translation initiation factor 4E*) qui, en se liant à la coiffe 5' de l'ARNm dans le cytoplasme, aide ainsi au recrutement du ribosome. Il a été montré que la surexpression de ce facteur a un effet positif sur la traduction d'ARNm possédant une extrémité 5' très structurée (Koromilas et al. 1992). Il en va de même pour la RBP PABP (*poly(A)-binding protein*) qui, en interagissant avec eIF4G, participe à la circularisation de l'ARNm lors de la phase d'initiation et donc favorise la traduction consécutive. En effet, lors de déplétion de PABP, une nette baisse de traduction générale dans les cellules est observée (Kahvejian et al. 2005). En plus de la machinerie traductionnelle canonique évoquée précédemment, des RBP inhibent ou activent la traduction en se comportant comme des facteurs de régulation *trans*. Ces RBP interagissent avec des séquences ou des éléments structuraux spécifiques dans les régions 5' et 3' non traduites UTR (*Untranslated region*) ou parfois dans des régions codantes. La protéine LARP1 (*La-related protein 1*) est un *trans-acting* facteur

reconnaissant les séquences cis-régulatrices TOP (*Terminal oligopyrimidine*) se trouvant en 5' juste en aval de la coiffe de l'ARNm. LARP1 se lie directement à la séquence TOP ainsi qu'à la coiffe 5' empêchant l'accès au facteur eIF4E et la formation du complexe eIF4F inhibant alors la traduction de l'ARNm (Lahr et al. 2017). Une cinquantaine de RBP ont été identifiées comme capables de se lier à des cis-éléments IRES (*Internal ribosome entry site*), des séquences permettant l'initiation de la traduction sans nécessité de reconnaissance de la coiffe 5' par les facteurs eIF. De façon générale, la liaison de ces RBP, comme par exemple YB-1 (*Y box binding protein 1*) ou encore FUS (*Fused in sarcoma*), aux régions IRES active la traduction de leurs ARNm cibles (Godet et al. 2019). Les séquences riches en Adénine et Uracile ARE (*AU-rich elements*), présentes dans 5-8% des gènes humains, sont aussi un élément cible des RBP régulant la traduction (García-Mauriño et al. 2017). La protéine HuR reconnaît une séquence ARE en 3'-UTR de l'ARNm cytochrome c facilitant sa traduction. À l'inverse, la protéine TIA-1 (*T-cell-restricted intracellular antigen 1*) agit comme un inhibiteur de traduction en se liant sur une séquence ARE proche de la séquence codante de l'ARNm cytochrome c (Kawai et al. 2006). Beaucoup de RBP sont capables d'influencer les niveaux de traduction des ARNm en participant à leur stabilisation ou à leur dégradation.

#### I.1.4 Dans la stabilisation et la dégradation des ARNm

Les ARNm ont une durée de vie limitée, conditionnée par la cellule, son cycle et l'état de stress qu'elle subit. Certains ARNm codant pour des protéines nécessaires dans des conditions de stress voient, par exemple, leur temps de vie diminuer dans des conditions physiologiques normales. Les ARNm vont alors être régulés par les RBP qui, en les stabilisant, vont prolonger leur durée de vie ou, en les déstabilisant, vont induire leur dégradation précoce. Par exemple, PABP, en se liant à la queue poly(A) des ARNm,

les protège des dégradations par les ribonucléases (Mangus et al. 2003) ou encore les RBP de la famille IGF2BP (*Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein*) qui, en participant à la stabilisation des ARNm, facilitent par la suite leur traduction. En effet, pour exercer leurs fonctions stabilisatrices, les IGF2BP vont reconnaître les modifications m<sup>6</sup>A (N6-méthyladénosines) sur les parties simple brin d'ARNm comme Myc (*Myelocytomatosis oncogene*), ActB (*Actin beta*), Lin28b (*Lin-28 Homolog B*) et bien sur Igf2. Il a été démontré que la demi-durée de vie des ARNm ciblés par les RBP IGF2BP est plus longue et que leur *knockdown* réduit l'expression de leurs gènes cibles (Huang et al. 2018). Parfois les RBP peuvent aussi déstabiliser leurs ARNm cibles. En effet, AUF1 (*AU-rich binding Factor 1*) déstabilise l'ARNm *bcl-2* (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) en se liant à sa région 3'-UTR qui contient une séquence ARE reconnue par AUF1 (Ishimaru et al. 2010). A l'inverse, il a été démontré que AUF1 peut aussi stabiliser certains de ses ARNm cibles, principalement des ARNm codants pour des cytokines mais que cette fonction est au tissu considéré spécifique (Xu et al. 2001). L'un des moyens les plus employés pour réguler la traduction et activer la dégradation consiste à raccourcir la queue poly(A) des ARNm se trouvant en 3' UTR. Cette étape est effectuée par un groupe spécifique des protéines 3'-exonucléases possédant une fonction déadénylase (Zhang et al. 2023). Le complexe CCR4-CAF1 (*C-C motif chemokine receptor 4 - Chromatin assembly factor-1*) est le complexe principalement responsable d'une déadénylation. Ce processus s'enchaîne par la perte de la coiffe en 5', effectuée par le complexe DCP1-DCP2 (*Decapping protein 1 – Decapping protein 2*), permettant ainsi d'initier la dégradation dans le sens 5'-3' de l'ARNm par la protéine XRN1 (*5'-3' Exoribonuclease 1*). Parfois la dégradation dans le sens 5'-3' n'est pas enclenchée après la déadénylation résultant en une dégradation dans le sens 3'-5' effectuée par le complexe exosome (Figure 3) (Chen et Shyu 2011). Dans de rares cas, la dégradation peut se faire par une coupe interne à l'ARNm, ce processus est pris en charge par des endonucléases comme la protéine REGNASE-1 (*Regulatory RNase 1*). Cette RBP reconnaît des structures tige-boucle au sein de l'ARNm, clivant l'ARNm grâce à son domaine RNase et entraînant par la suite la dégradation de l'ARNm (Yang et al. 2015).

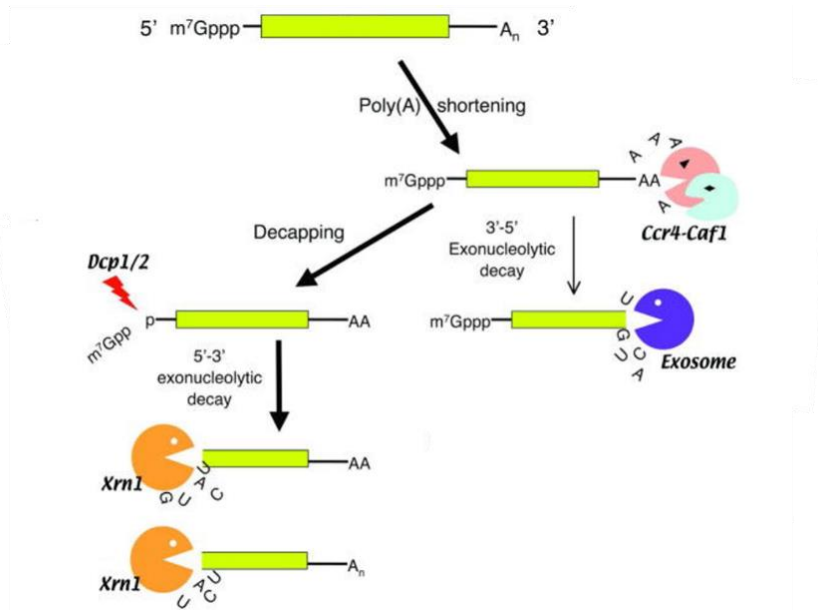


Figure 3 : Étapes de la dégradation des ARNm (adapté de Chen et Shyu 2011).

Comme illustré durant cette première partie, les RBP possèdent plusieurs fonctions capables d’agir sur la régulation des gènes. Cette pluralité de fonctions, adaptatives aux ARNm ciblés, peut s’expliquer également par la structure des RBP, c’est-à-dire la nature des domaines de liaison les constituant.

## I.2 Principaux domaines de liaisons

Les structures des RBPs sont variées, ce qui illustre la diversité de fonctions exposées ci-dessus (I.1). Les RBP sont divisées en catégories selon des motifs structuraux, appelés RBD (*RNA-binding domains*) les constituant. Les RBD semblent définir la nature de la cible ARN, le mode de liaison à cette cible ainsi que le procédé cellulaire dans lequel les RBP sont impliquées (Lunde et al. 2007). Elles peuvent posséder un ou plusieurs RBD, de nature similaire ou différente, au sein même de leur structure. A ce jour, plus d’une quinzaine de RBD ont été caractérisés mais sur

l'ensemble des RBP identifiées, les RBD d'une centaine d'entre-elles n'ont pas encore été classifiés, leurs structures étant inconnues ou trop hétérogènes (Castello et al. 2016; Gerstberger et Tuschl. 2014). Dans cette partie, seuls les domaines les plus fréquemment rencontrés seront détaillés.

### 1.2.1 Domaines de « choc au froid »

Le domaine de « choc au froid » CSD (*Cold shock domain*) a été découvert chez *E.coli* (*Escherichia coli*) dans la protéine CSPA qui, lors d'une chute de température soudaine, voit son expression augmentée (Jones et al. 1987). Ce domaine étant très conservé, il est aussi présent dans de nombreuses protéines eucaryotiques qui se lient à des ARN ou des ADN simple brin. Structuralement, les CSD sont caractérisés par une structure en tonneau  $\beta$  constituée de 5 brins anti-parallèles, reliés par des boucles. Le site de liaison est structuré d'un feuillet  $\beta$  à trois brins permettant la reconnaissance des acides nucléiques (Figure 4) (Graumann et Marahiel 1998). Les RBP à CSD sont impliquées dans la régulation de la transcription de gènes, dans l'épissage de l'ARNm, dans la traduction mais peuvent exercer aussi des fonctions chaperonnes sur l'ARN, comme YB-1, une RBP essentielle au développement embryonnaire qui, grâce à sa plasticité structurale, linéarise des ARNm structurés (Kretov et al. 2019). Un autre exemple concerne la protéine LIN28, impliquée dans la dédifférenciation des cellules en cellules pluripotentes, qui est constituée d'un CSD structuralement similaire à celui de YB-1 combiné à un autre RBD de type doigt de Zinc ZF (*Zinc Finger*) (Yu et al. 2007). Ces deux protéines, YB-1 et LIN28, sont aussi associées au développement de certains cancers (Lindquist et Mertens 2018).



Figure 4 : Structure 3D du CSD de la protéine CspA chez *E.coli* (PDB : 1MJC)(Schindelin et al. 1994).

## I.2.2 Domaines à doigt de Zinc

Les domaines ZF se lient principalement aux ARN simple brin via de nombreuses interactions électrostatiques assurant la stabilité de la liaison. L'affinité de ces RBD pour des ARN dépend de la séquence nucléotidique dont les bases vont pouvoir interagir principalement par empilement  $\pi$ - $\pi$  avec les chaînes latérales aromatiques des acides aminés. Les ZF sont classifiés en fonction des résidus coordonnant l'ion métallique  $Zn^{2+}$  définis par les enchainements Cystéine<sub>2</sub>Histidine<sub>2</sub> CCHH, CCCH ou encore CCHC, qui permettent la formation de structures stables et rigides constituées d'un feuillet  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$ . Les domaines de type CCHH ont été identifiés pour la première fois dans TFIIIA (*Transcription factor IIIA*) chez *Xenopus laevis* (Figure 5) (Clemens et al. 1993). Les domaines de type CCCH semblent se lier à des ARE à travers une reconnaissance de séquence spécifique se faisant principalement par le squelette protéique grâce à des liaisons hydrogènes, comme pour la protéine TIS11d (*TPA-induced sequence 11*) (Hudson et al. 2004). Ils interagissent principalement avec l'ADN mais peuvent aussi se lier à l'ARN sous réserve d'un arrangement structural du ZF (Fu et Blackshear 2017). Chez la protéine LIN28, le ZF de type CCHC permet la régulation des facteurs d'épissage en se liant spécifiquement aux motifs GGAGA des ARNm (Wilbert et al. 2012).

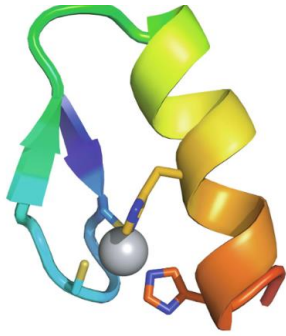


Figure 5 : Structure 3D du domaine ZF 31 de la protéine Xfin chez le *Xenopus* (PDB : 1ZNF). Issu de (Neuhaus 2022)

### I.2.3 Domaines à Homologies K

Les domaines à homologie K, KH (*K homology domain*), sont observés dans près de 40 RBP humaines et sont composés d'environ 70 résidus d'acides aminés. Identifiés pour la première fois chez hnRNP K humaine (Siomi et al. 1993), les domaines KH possèdent au centre d'un cœur hydrophobe une séquence particulière : (I/L/V)-I-G-X-X-G-X-X-(I/L/V). Leur structure est caractérisée par 3 brins  $\beta$  appuyés contre 3 hélices  $\alpha$  donnant lieu à deux topologies différentes  $\beta\alpha\alpha\beta\alpha$  et  $\alpha\beta\beta\alpha\alpha\beta$  (Grishin 2001) (figure 6). Seulement quatre nucléotides sont reconnus par le domaine dans un creux formé par une boucle GXXG et les hélices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ainsi que le brins  $\beta_2$ . La particularité de ce domaine vient du fait qu'aucun résidu aromatique n'intervient dans la liaison avec l'ARN, celle-ci se fait alors par des liaisons hydrogènes, des interactions électrostatiques et des complémentarités de structure. Ce domaine semble être souvent associé avec des modifications post-traductionnelles de l'ARN.



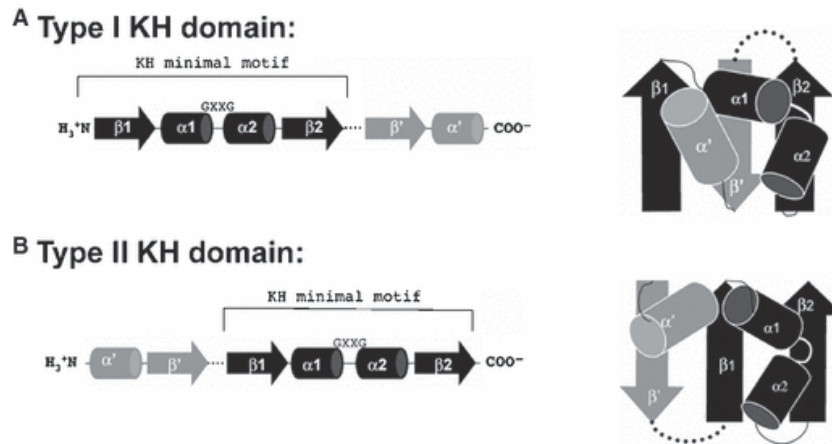
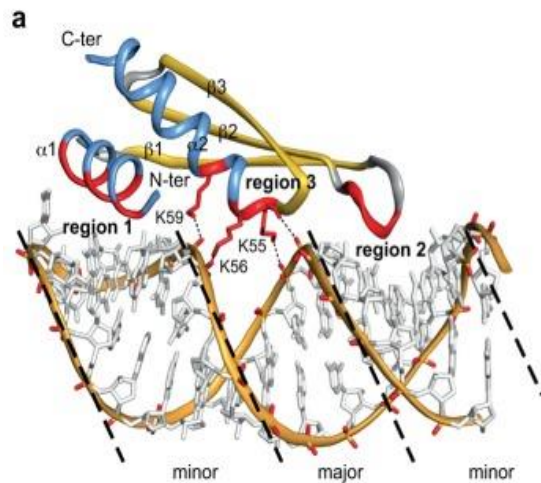


Figure 6 : Illustration des deux topologies de domaines KH possibles. A : le type 1 avec 3 brins  $\beta$  têtes-bèches de topologie  $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ , majoritairement retrouvé chez les eucaryotes. B : le type 2 constitué de deux brins parallèles et un brin antiparallèle de topologie  $\alpha\beta\beta\alpha\beta$ , majoritairement présent chez les procaryotes. D'après Valverde et al. 2008.

#### 1.2.4 Domaines de reconnaissance à l'ARN double brin

Les domaines dsRBD (*double-stranded RNA-binding domains*) ciblent les ARN double brin de façon non spécifique c'est pourquoi les RBP de cette famille possèdent en général plusieurs dsRBD. Tout comme les domaines KH, les dsRBD sont également composés d'environ 70 résidus d'acide aminés, arborant une topologie légèrement différente avec seulement deux hélices  $\alpha$  opposées à trois brins  $\beta$  ( $\alpha\beta\beta\beta\alpha$ ). La liaison de ces domaines à l'ARN est plutôt dépendante de la structure que de la séquence de l'ARN. En effet, les dsRBD reconnaissent spécifiquement la conformation de l'hélice à double brin de l'ARN, différente de celle d'un ADN. Le contact se fait entre un petit sillon de l'ARN et l'hélice  $\alpha_1$ , un grand sillon et la région N-terminale de l'hélice  $\alpha_2$  ainsi qu'entre un petit sillon suivant et la boucle 2 entre les brins  $\beta_1$ - $\beta_2$  (Figure 7) (Masliah et al. 2013). Ces domaines sont présents dans plusieurs protéines impliquées dans différents aspects de la vie cellulaire, comme les protéines STAU1 et STAU2 (STAUFEN1 et STAUFEN2) impliquées dans la localisation et le transport de l'ARN (Miki et al. 2005).

D'autres exemples concernent également les protéines DROSHA et DICER 1, intervenant dans la biogenèse des miARN (miARN), dont les rôles seront détaillés dans la partie numéro II.1 (Wilson et Doudna 2013).

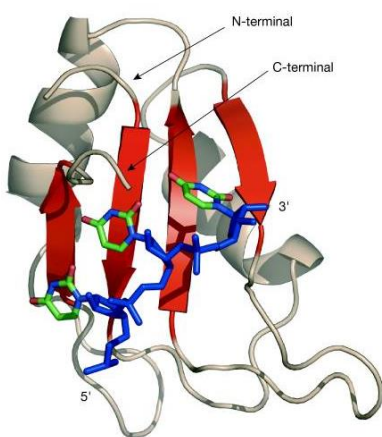


**Figure 7 :** Liaison du dsRBD1 de la protéine ADAR2 (*Adenosine deaminase acting on RNA 2*) avec un ARN tige-boucle (PDB : 2L3C). En rouge les différentes régions interagissant avec l'ARN. Issue de (Masliah et al. 2013).

### I.2.5 Motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM)

Les RRM sont les domaines de liaison à l'ARN les plus répandus au sein des RBP mais aussi les domaines les plus étudiés et par conséquent les mieux connus. Plus de 226 RBP humaines possèdent un RRM, correspondant à 0,5 à 1% des gènes (Venter et al. 2001). Les RRM reconnaissent 4 à 8 nucléotides, ce qui leur permet d'interagir avec un large spectre d'ARN tels que les miARN, les ARNInc (*long non-coding RNA*) ou encore les ARNm. L'affinité et la spécificité de ce type de domaine est dépendant de la séquence d'ARN cible mais aussi du nombre de RRM ainsi que de la présence d'autres RBD au sein de la protéine (Lunde et al. 2007). Malgré le fait que ce domaine soit très conservé, plusieurs types de RRM possédant des variations au niveau de la structure ont été mis en évidence.

Les RRM les plus connus sont les RRM canoniques (Figure 8). Ils possèdent environ 90 résidus d'acides aminés agencés selon une structure typique composée d'un feuillet  $\beta$  antiparallèle à 4 brins ainsi que de deux hélices  $\alpha$  formant la topologie globale suivante :  $\beta_1$ - $\alpha_1$ - $\beta_2$ - $\beta_3$ - $\alpha_2$ - $\beta_4$  (Cléry et al. 2008). Ces domaines sont constitués également de deux séquences très conservées appelées RNP1 et RNP2 (*Ribonucléoprotéin motif 1 and 2*) de séquence [RK]-G-[FY]-GA-[FY]-[ILV]-X-[FY] et [ILV]-[FY]-[ILV]-X-N-L, localisées respectivement dans le brin  $\beta_3$  et dans le brin  $\beta_1$  et sont responsables de la liaison à leurs cibles. La liaison à l'ARN implique souvent un empilement  $\pi$ - $\pi$  entre bases nucléotidiques et 3 chaînes latérales aromatiques localisées dans les RNP. Le premier résidu aromatique interagissant avec le côté 5' de la séquence ARN cible se trouve dans le brin  $\beta_1$  tandis que le brin  $\beta_3$  contient le résidu aromatique qui permet la liaison au côté 3'. Le dernier résidu aromatique qui se trouve également dans le brin  $\beta_3$  est en interaction avec un nucléotide central complétant ainsi l'interface ARN-protéine (Cléry et al. 2008). La liaison est stabilisée en partie grâce aux résidus hydrophobes des hélices  $\alpha$ , entourant les résidus aromatiques des RNP. De plus, les chaînes latérales des résidus aromatiques des RNP sont dirigées vers l'extérieur de la protéine, facilitant l'interaction qui sera ainsi plus directe (Burd et Dreyfuss 1994).



**Figure 8 :** Structure du RRM1 canonique de la protéine SXL (*Sex-lethal*) interagissant avec un triplet de nucléotides UUU. Les 4 brins  $\beta$  en rouge, reconnaissent les nucléotides en vert de façon spécifique. D'après (Stefl et al. 2005)

Le deuxième type de RMM, décrit en 2010, s'appelle qRRM (quasi-RRM) du fait qu'il possède une structure similaire aux RRM canoniques mais que son mode de liaison à l'ARN diffère. En effet, les qRRM reconnaissent en particulier les G-tract (répétitions de

Guanines au sein de l'ARN) à l'aide de résidus conservés chargés et aromatiques localisés dans les boucles 1, 3, et 5 ainsi que dans le brin  $\beta_4$  (Dominguez et al. 2011). hnRNP F possède trois qRRM qui reconnaissent plus spécifiquement la séquence 5'-AGGGAU-3' à l'aide de la première séquence conservée R-G-L-P-(W/F/Y) de la boucle 1, de la deuxième (R/K)-(X<sub>5</sub>)-R-Y-(V/I/L)-E-(V/I/L)-F de la boucle 5, et des résidus chargés positivement de la boucle 3. Cette protéine participe à la régulation de la polyadénylation et à l'épissage alternatif du pré-ARNm de Bcl-x (Dominguez et Allain 2006).

Le troisième type de RRM, xRRM (RRM hélice), possède une hélice  $\alpha$  ainsi qu'un court brin  $\beta$  supplémentaires ( $\beta_1$ - $\alpha_1$ - $\beta_2$ - $\beta_3$ - $\alpha_2$ - $\beta_4$ '- $\beta_4$ - $\alpha_3$ ) mais est dépourvu des séquences d'acides aminés conservés RNP1 et RNP2 observées dans les RRM canoniques. Les xRRMs ont aussi la particularité de reconnaître les ARN double brin. La protéine p65 de la famille LARP7 (*La-related proteins group 7*), une holoenzyme télomérase, possède un xRRM dans son domaine C-terminal. Ce domaine atypique comprend une hélice  $\alpha_3$  supplémentaire impliquée dans la reconnaissance de l'ARN, s'étendant jusqu'à l'extrémité C-terminal lors de la liaison à l'ARN, qui avec l'aide de deux résidus dans le brin  $\beta_2$  permet le repliement du squelette de l'ARN observé pendant l'activité télomérase dépendante de p65 (Singh et al. 2013).

### I.3 Implications dans des pathologies

Les RBP sont des protéines essentielles pour la survie des cellules. En effet, comme vu précédemment (partie I.1), elles possèdent des rôles majeurs dans le développement d'ARNm matures et fonctionnels, conséquence de leur grande implication également dans des maladies comme le diabète ou encore les cancers. Cette partie illustrera donc quelques exemples de dysfonctionnements de RBP et leurs impacts sur le cycle cellulaire.

### I.3.1 Maladies neurodégénératives

Plusieurs RBP ont été identifiées dans les processus de maintien de l'intégrité des cellules neuronales comme TDP-43 (*TAR DNA-binding protein 43*), FUS ou encore les protéines HuD, HuB, HuC (protéines de la famille Hu présentes uniquement dans les neurones). En conditions normales, la transmission d'information entre les neurones est le résultat d'une bonne transcription des gènes ainsi que d'une bonne régulation de la traduction des ARN. Le bon déroulement de ces processus est assuré par les RBP dont la dérégulation peut être fatale pour les neurones (De Conti et al. 2017), comme dans le cas de la maladie neurodégénérative ALS (*Amyotrophic lateral sclerosis*). En effet, en cas de stress des cellules, des condensats composés de protéines et d'ARN s'assemblent pour former des granules de stress, dans lesquelles sont notamment retrouvées TDP-43 et FUS. Il a été mis en évidence, qu'après le stress, l'arrangement stable de ces protéines ne leur permet pas un retour à l'état normal, conduisant ainsi à la formation d'agrégats, inhibant les fonctions physiologiques de ces RBP. Au cours du temps, cette accumulation d'agrégat est telle qu'en bloquant des processus cellulaires normaux la maladie se déclenche (Liu-Yesucevitz et al. 2010; Dormann et al. 2010). Récemment, il a été montré que l'assemblage de façon ordonnée et coopérative de TDP-43 sur ses ARNm cibles réduisait le phénomène d'agrégation, offrant peut-être un moyen d'interférer avec les agrégats pathologiques conduisant à des maladies neurologiques (Rengifo-Gonzalez et al. 2021). Il a aussi été démontré que des mutations de TDP-43 étaient étroitement liées à l'altération de son transport entre le noyau et le cytoplasme, affectant ainsi la répartition de certains ARNm dans les axones (Alami et al. 2014; Suk et Rousseaux 2020).

### 1.3.2 Diabète

Le diabète est une maladie résultant d'une déficience de production ou d'action de l'insuline sécrétée par le pancréas. Du fait d'une hyperglycémie chronique, les tissus vasculaires subissent des dommages, provoquant à terme des maladies cardiovasculaires. Chez les patients diabétiques, l'isoforme DN-RBFOX2 (*Dominant negative- RNA Binding Fox-1 Homolog 2*), spécifiquement exprimé en réponse à des niveaux de glucose élevés, semble avoir un effet inhibiteur sur les fonctions d'épissage alternatif de RBFOX2. En effet, cet isoforme interagit avec la forme sauvage de la protéine inhibant ses fonctions au stade précoce de la maladie, perturbant le relargage intracellulaire du Calcium dans les cellules musculaires cardiaques (Nutter et al. 2016). La RBP QKI-7 (*Quaking-7*) est surexprimée dans les cellules endothéliales de patients atteints de diabète, conduisant ses ARNm cibles à la dégradation, réduisant l'expression de protéine comme NLGN1 (*Neuroigin 1*) et TSG-6 (TNF- $\alpha$ -stimulated gene/protein 6) provoquant ainsi des complications vasculaires (Yang et al. 2020).

### 1.3.3 Cancers

Il est bien connu que les cellules cancéreuses sont le fruit d'une croissance cellulaire non contrôlée. Cela est principalement dû au dérèglement d'expression des gènes responsables de la croissance et de la différenciation cellulaire. En effet, la surexpression et l'inhibition d'expression de certains gènes peuvent permettre aux cellules d'échapper aux différents points contrôles et ainsi devenir cellules cancéreuses. Les gènes RBP voient aussi leurs niveaux d'expression altérés, jouant ainsi un rôle critique dans les cancers humains (Wang et al. 2015). Par exemple, il a été montré que, dans certains cancers du poumon, la protéine QKI (*Quaking*), qui inhibe la transformation et la prolifération de cellules cancéreuses, est fortement diminuée,

entraînant ainsi la carcinogénèse associée à un mauvais pronostic (Zong et al. 2014). La perturbation de la transcription des RBP est causée le plus souvent par des altérations génétiques, comme des mutations, qui vont se répercuter sur l'expression d'autres gènes entraînant, pour finir, le développement de cancers (Wang et al 2015). La protéine SAM68 (*Src associated in mitosis of 68 kDa*) est impliquée dans un grand nombre de mécanismes de la régulation de l'expression génique comme la transcription ou encore l'épissage alternatif. La phosphorylation de SAM68 entraîne l'épissage alternatif de *Bcl-x(l)* (*B-cell lymphoma-extra large*), un gène anti-apoptotique inhibant la mort cellulaire. En cas de non-phosphorylation, SAM68 conduit à l'isoforme pro-apoptotique *Bcl-x(s)* (*B-cell lymphoma-extra small*) qui engendre la mort cellulaire. Dans le cancer de la prostate, SAM68 semble être souvent présente sous la forme phosphorylée, permettant ainsi aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose (Paronetto et al. 2007). La RBP NONO (*non-POU domain-containing octamer binding*) a été identifiée comme jouant un rôle critique dans la prolifération des cancers du sein qu'ils soient hormono-dépendants ou non. En effet, NONO, surexprimée dans les cancers du sein, intervient dans l'épissage alternatif de ses ARNm cibles codant pour des protéines impliquées dans l'avancement du cycle cellulaire comme SKP2 (*S-phase kinase-associated protein-2*) et E2F8 (*E2F Transcription Factor 8*) (Iino et al. 2020). A l'inverse, la protéine RBM38 agit comme un suppresseur de tumeur et voit donc ses niveaux d'expression diminuer dans les cellules cancéreuses rénales. RBM38 augmente le niveau d'expression de la protéine E-cadhérine, responsable de l'adhésion protéine-protéine, réduisant ainsi l'invasion et le phénomène de métastase des cancers du rein (Huang et al. 2017).

De façon générale, un changement dans l'expression des RBP, résultant en une augmentation ou une diminution de l'expression de la protéine concernée, impacte l'expression des gènes cibles qui, pour grand nombre, contrôlent des mécanismes impliqués dans la survie des cellules pouvant contribuer à la carcinogénèse.

## II. Micro-ARN (miARN)

Les micro-ARN (miARN) matures sont des petits ARNs non-codants, simple brin, constitués d'environ 22 nucléotides, encodés à plus de 2000 dans le génome humain (Alles et al. 2019). Ils sont étroitement impliqués dans un large éventail de fonctions cellulaires comme l'inhibition de l'apoptose, la réponse aux dommages de l'ADN, la prolifération cellulaire, la réponse immunitaire et la progression tumorale. Le premier miARN, *lin-4*, a été découvert dans les années 90 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Lee et al. 1993). C'est en étudiant la régulation négative de la protéine LIN-14, régulation essentielle pour la progression du premier stade larvaire vers le deuxième, que *lin-4* a été découvert. La régulation négative de LIN-14 est dépendante de la transcription de *lin-4*, un petit ARN ne codant pour aucune protéine. La complémentarité de séquence entre *lin-4* et de multiple site dans la région 3'-UTR de l'ARNm *lin-14* a aussi été découverte, mettant en avant le potentiel mécanisme d'action des miARN (Wightman et al. 1993).

### II.1 Biogenèse, production et régulation

Les miARN sont transcrits majoritairement par l'ARN polymérase II même si certains sont générés par l'ARN polymérase III (Borchert et al. 2006), une minorité venant d'introns de pré-ARNm. Ces transcrits, appelés miARN primaires (pri-miARN), possèdent, comme les ARNm, une coiffe en 5' ainsi qu'une queue poly-(A) en 3'. Les pri-miARN subissent plusieurs modifications post-transcriptionnelles dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme avant d'aboutir aux miARN matures (Figure 9).



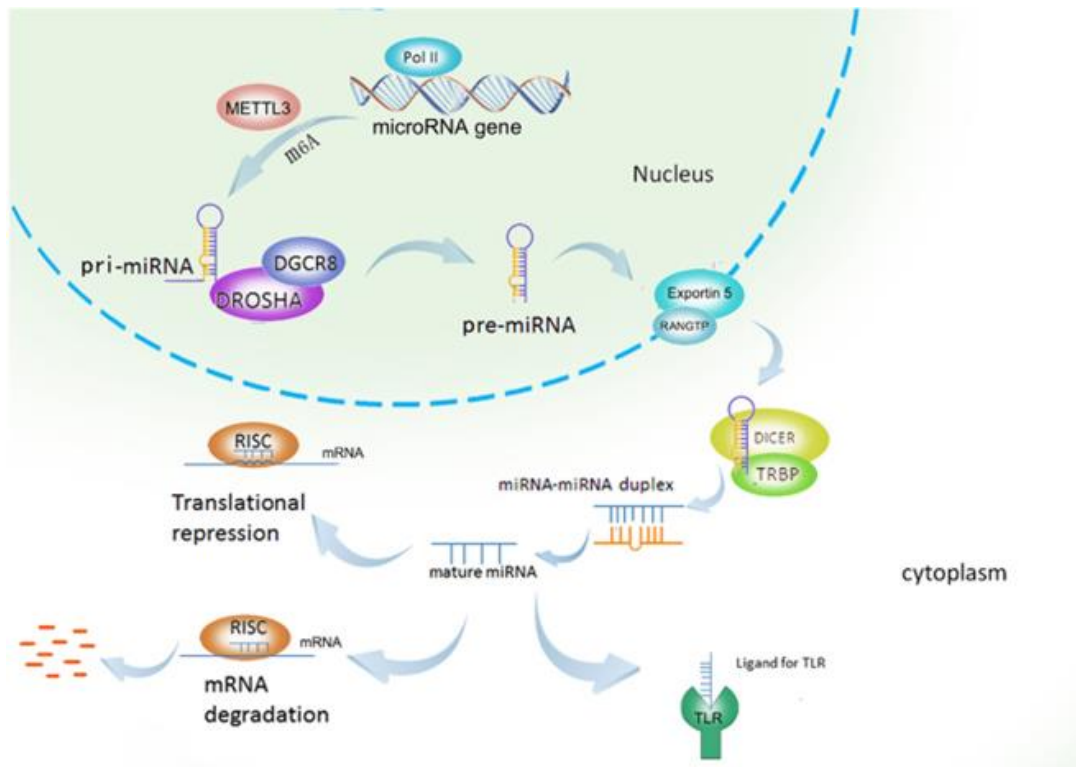


Figure 9 : Schéma montrant les différentes étapes de la biogenèse des miARNs (issu de Peng et Croce, 2016).

La première modification ayant lieu dans le noyau est effectuée sur le pri-miARN, un ARN double brin long de plusieurs kilobases, par le complexe microprocesseur composé de la ribonucléase III Drosha et de la RBP DGCR8 (*Di George syndrome Critical Region 8*). Ce complexe va cliver les extrémités du pri-miARN pour former le miARN précurseur (pré-miARN), une structure tige-boucle d'environ 70 nucléotides : la protéine DGCR8 reconnaît le pri-miARN à son extrémité 3' puis la protéine Drosha coupe à la base de la structure en tige boucle (O'Brien et al. 2018). Une fois que le pré-miARN est créé, il est exporté de façon active vers le cytoplasme par le complexe RanGTP/Exportin 5. Le facteur de transport nucléocytoplasmique Exportin 5, responsable du transport des pré-miARN, se lie aux pré-miARN dans le noyau en présence de la petite protéine Ran GTPase dans sa forme Ran-GTP. Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN est relargué grâce à l'hydrolyse de Ran-GTP en Ran-GDP (Yi et al. 2003) puis subit encore un clivage par l'enzyme endoribonucléase Dicer. Dicer

enlève la boucle du pré-miARN, créant ainsi un duplex miARN-miARN, constitué d'un brin dit « guide » et d'un brin dit « passager ». Le duplex va alors être incorporé aux protéines Argonaute (AGO1-4) à l'aide de la machinerie chaperonne Hsp70/Hsp90 formant ainsi le complexe intermédiaire pré-RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*). Le brin passager est décroché par la protéine AGO2 et relâché dans le cytoplasme où il subit une dégradation, le brin guide restant quant à lui lié à AGO. Ce nouveau complexe dit « miRISC », guidé par le miARN, s'apparie par la région graine (nucléotides 2 à 8 en 5' du miARN) aux parties 3'-UTR (régions non traduites) des ARNm par complémentarité de séquence, entraînant l'inhibition de la traduction de l'ARNm ou sa dégradation (Vasudevan et al 2007). Ce mécanisme dit d'interférence, détaillé au paragraphe II.2, permet aux miARN de réguler le devenir des ARNm.

Comme indiqué précédemment, les miARN sont très importants pour la vie cellulaire du fait de leur rôle dans la régulation génique mais également de leur rôle dans l'activation des voies de signalisation. En effet, il a été mis en évidence que certains miARN peuvent se lier à la famille des récepteurs Toll-like (TLR), des récepteurs responsables de la réponse immunitaire en réponse à divers ligands pathogènes, entraînant par la suite une réponse inflammatoire (Fabbri et al. 2012). Du fait de l'implication des miARN sur la réponse cellulaire, leur biogenèse nécessite d'être parfaitement contrôlée, des niveaux anormaux d'expression des miARN étant souvent corrélés au développement de pathologies telles que le cancer. L'exemple de la protéine METTL3 (méthyletransférase like 3) illustre l'importance du contrôle précis lors de la biogenèse des miARN. En effet, METTL3 méthyle les pri-miARN, induisant une forme de marquage nécessaire à leur reconnaissance par DGCR8 permettant ainsi l'engrenage de la biogenèse (Alarcón et al. 2015).

## II.2 Rôles des miARN dans la régulation des gènes

Le rôle des miARN dans la régulation des gènes est très important et ce dès l'étape de transcription effectuée. En effet, la régulation des gènes peut être indirectement modulée par les pri-miARN dont la structure influence différents clivages, pouvant entraîner la production de miARN isoformes, appelés isomiR. De fait, la reconnaissance et le clivage des pri-miARNs par le complexe DGCR8/Drosha sont basés principalement sur la structure tridimensionnelle des pri-miARN qui lorsqu'altérée peut conduire, lors de la biogénèse, à une variabilité de séquences miARN pouvant fortement influencer l'expression des ARNm. Par exemple, il a été mis en évidence récemment que miR-9 possède trois pri-miR différents et que la structure plus flexible de pri-miR-9-1 conduit à un clivage alternatif par Drosha. Ce clivage alternatif génère une extrémité 5' altérée se traduisant par la suite par la production d'un isomiR avec une région graine décalée régulant alors négativement 539 nouvelles cibles spécifiques comme PURB (*Purine Rich element Binding protein B*) ou encore FOXN3 (*Forkhead Box N3*) (Bofill-De Ros et al. 2019).

Plus conventionnellement, le potentiel régulateur des miARN intervient après maturation et association à RISC. Servant de guide à miRISC, le miARN reconnaît généralement un domaine de la région 3'-UTR des ARNm, appelé élément de réponse au miARN MRE (*microRNA Response Element*) à travers la région graine (très conservée au cours de l'évolution) et initiatrice du ciblage. L'étendue de la complémentarité au-delà de la région graine du miARN avec son ARNm cible va définir la fonction du complexe miRISC aux mécanismes d'interférence à l'ARN responsables du silençage des gènes. Une complémentarité quasi-parfaite miARN : MRE induit le clivage de l'ARNm cible catalysé, chez l'homme, par l'activité endonucléase de la protéine AGO2. Néanmoins, dans les cellules animales, la plupart des miARNs reconnaissent partiellement les MRE, conduisant ainsi le plus souvent à une répression de la traduction, pouvant entraîner une déadénylation et une dégradation de l'ARNm. Ce

mécanisme de répression génique nécessite le recrutement de la protéine TNRC6C/GW182 à miRISC. Outre son interaction avec AGO, TNRC6C/GW182 peut *i*) se lier à la protéine PABP et inhiber son interaction avec le facteur protéique eIF4G empêchant ainsi l'initiation de la traduction (Gu et Kay 2010) et *ii*) recruter les complexes Ccr4-NOT et PAN2-PAN3, déclenchant la déadénylation et la dégradation de l'ARNm cible. Le fait d'avoir des complémentarités partielles permet dès lors aux MRE d'être reconnus par des miARN différents mais permet aussi à un même miARN de cibler différents ARNm, ce qui est le cas par exemple pour miR-124 qui semble s'associer avec 623 ARNm différents (Hendrickson et al. 2009). A l'inverse, il existe aussi des ARNm réprimés par plusieurs miARN comme par exemple l'ARNm de la protéine p21Cip1/Waf1 ciblée par 28 miARN différents (Wu et al. 2010).

Bien que la majorité des miARN inhibent la traduction, il a été observé qu'ils pouvaient aussi dans certains rares cas l'activer. Cette observation a eu lieu dans des cellules carencées en sérum et donc avec une croissance arrêtée. Pour que l'activation ait lieu, la protéine FXR1 (*Fragile-x-mental retardation related protein 1*) doit s'associer avec AGO2 sur une séquence ARE du 3'-UTR de l'ARNm cible (Vasudevan et Steitz 2007). En revanche, ce processus inhibe la traduction dans des cellules proliférantes. Cette activation de la traduction par les miARN a aussi été observée dans des cellules quiescentes comme les ovocytes (Truesdell et al. 2012) mais aussi en cas de déplétion en acides aminés où miR-10a cible cette fois la partie 5'-UTR des ARNm des ribosomes (Ørom et al. 2008). Les miARN sont donc capables de régulation positive mais seulement sous des conditions spécifiques.

Le complexe miRISC pourrait aussi réguler la transcription. En effet, il a été montré que miR-522 interagit avec l'ADN tige-boucle que contient le promoteur de CYP2E1 (*Cytochrome P450 2E1*) inhibant ainsi sa transcription (Miao et al. 2016). miRISC pourrait aussi être impliqué dans la modulation de l'état de la chromatine en affectant la compaction de l'ADN par méthylation, inhibant ou activant ainsi la transcription de certains gènes (O'Brien et al. 2018).

Les miARN sont des régulateurs importants dans la vie de la cellule. Pour régir le devenir des ARNm, l'expression des miARN implique à chaque étape de leur biogénèse une artillerie cellulaire spécifique dont l'action doit être finement régulée. Candidats à la plupart des processus biologiques, les miARN sont souvent impliqués dans les maladies humaines dans lesquelles l'anormalité de leurs profils d'expression (sous- ou surexpression) peut être utilisée comme élément de biomarqueur ou de pronostic (Bhaskaran et Mohan 2014; Ardekani et Naeini 2010; Rupaimoole et Slack 2017).

## II.3 Implications pathologiques

### II.3.1 Neurologiques

Les miARN régulent l'expression de gènes communs à tout type cellulaire mais également l'expression de gènes tissu-spécifiques, tels que les tissus nerveux dont la dégénérescence peut conduire à l'apparition de maladies comme l'Alzheimer, Parkinson ou encore l'amyotrophie spinale. Cette partie illustrera donc quelques exemples de dérégulation de miARN dont l'implication à ces maladies neuronales a été décrite. La maladie d'Alzheimer est une conséquence de plusieurs dérèglements dans les processus cellulaires neuronaux, l'un d'eux étant un dysfonctionnement des synapses. L'un des régulateurs de la plasticité synaptique ainsi que de la mémoire est le facteur neurotrophique dérivé du cerveau BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) dont le gène codant possède en partie 3'-UTR trois séquences ciblées par miR-206. Il a été mis en évidence que dans les cerveaux atteints d'Alzheimer, miR-206 est très présent tandis que le niveau de protéine BDNF a drastiquement diminué. Cependant, le niveau d'ARNm *BDNF* n'est pas affecté indiquant une répression de la traduction par miR-206 (Lee et al. 2012). Dans la maladie de Parkinson, la perte des neurones libérant la dopamine dans le cerveau aidant, entre autres, au contrôle des fonctions motrices

du corps, se traduit par l'apparition de signes caractéristiques comme les mouvements lents, la raideur musculaire ou encore les tremblements. Chez les patients atteints de Parkinson, miR-133b semble être drastiquement déplété en comparaison à des cellules neuronales normales, suggérant son implication dans la maturation et la fonction des neurones produisant la dopamine (Kim et al. 2007). Dans le cas de l'ALS, la surexpression de miR-155 est observée en parallèle d'une perte de la signature moléculaire caractérisant la microglie, les cellules macrophages résidentes du système nerveux central. La microglie est très importante dans le maintien de l'homéostasie du système nerveux central, ce maintien est opéré par diverses protéines comme le facteur de transcription Fos ou encore P2RY12 (*Purinergic receptor P2Y12*). En effet, chez les patients atteints d'ALS en stade précoce, l'expression génique de P2RY12 est très réduite et devient indétectable dans la phase terminale de la maladie. Même si le mécanisme de répression n'est pas encore totalement identifié, il a été mis en évidence que lors d'une déplétion de miR-155, les niveaux d'expression de P2RY12 sont restaurés et la protéine est à nouveau traduite, indiquant l'implication de miR-155 au dysfonctionnement de la microglie (Butovsky et al. 2015). Outre ces exemples spécifiques choisis, beaucoup d'autres miARN sont liés au développement de maladies neurodégénératives. En effet, une étude publiée en 2019 (Juźwik et al. 2019) a montré que, sur 641 articles scientifiques répondant à des critères de sélection (filtrage des études *in vivo* et *ex vivo* par exemple), 2318 miRNA dérégulés ont pu être identifiés dans 12 types de maladies neurodégénératives, 52 miARN apparaissant de façon redondante dans plus de la moitié (7/12) de ces maladies.

### II.3.2 Cancers

Dans beaucoup de cancers, l'expression des miARN est dérégulée. Cet effet peut être la conséquence d'une surexpression ou d'une inhibition mais peut également

survenir à l'issue de problèmes de transcription, de changements dans les marques épigénétiques ou encore de chromosomes anormaux. L'ensemble de ces événements peut conduire la cellule à outrepasser les signaux de mort et ainsi devenir immortelle mais aussi à se multiplier de façon non contrôlée (Peng et Croce 2016; Farazi et al. 2013).

Les gènes des miARN peuvent subir des translocations, des amplifications ou des délétions qui à terme peuvent conduire au développement de cellules cancéreuses. Par exemple, dans les leucémies lymphoïdes chroniques, les niveaux d'expression très faibles de miR-15a et de miR-16a résultent en partie d'une délétion sur le chromosome 13 (Calin et al. 2002). Une amplification du cluster des gènes miR-17~92 a été mise en évidence dans les cancers du poumon, augmentant la prolifération cellulaire (Hayashita et al. 2005). Dans les leucémies lymphoblastiques aiguës à cellules T, une observation de la translocation de ce même cluster conduit aussi à une surexpression de ces miARN (Mavrakis et al. 2010). Les niveaux anormaux d'expression des miARN peuvent ainsi être causés par des défauts génétiques impliquant directement des régions contenant les gènes des miARN mais parfois, la dérégulation de l'expression est causée par des modifications épigénétiques responsables de modulations structurales de l'ADN.

Les modifications de marques épigénétiques sont connues comme étant l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses. Elles résultent de l'hyperméthylation ou de l'hypométhylation de l'ADN, conduisant à l'extinction ou la surexpression de gènes concernés, dont certains pouvant être des gènes de miARN. Par exemple, l'altération du niveau d'expression de miR-223, miARN crucial dans la myélopoïèse, est associée à l'arrêt du processus de différenciation conduisant à différents types de leucémie. Chez les patients atteints de Leucémie Myéloïde Aiguë (LMA), une translocation entre le chromosome 8 et 21 génère AML1/ETO, une protéine fusionnée qui se lie à l'ADN et recrute des enzymes capables de modifier la chromatine (Rejeski et al. 2021). Le gène de pré-miR-223, possédant un site de reconnaissance à la protéine AML1, va permettre à l'oncoprotéine AML1/ETO de se lier. Les enzymes alors recrutées vont modifier l'état

de compaction de l'ADN réduisant au silence par l'hétérochromatine le gène de miR-223 (Fazi et al. 2007). Cette réduction de l'expression conduit à l'arrêt de la différenciation des précurseurs myéloïdes qui se retrouvent bloqués dans un stade indifférencié, finissant par devenir des cellules cancérigènes.

Les facteurs de transcription jouent également un rôle majeur dans la régulation de l'expression des miARN. Par exemple, le facteur pro-tumeur de transcription c-Myc, facteur clé du contrôle de l'apoptose et de la prolifération cellulaire, est très fréquemment surexprimé dans les cellules cancéreuses où il va réprimer la transcription de plusieurs miARN suppresseurs de tumeur dont les miR de la famille let-7, mir-15a, miR-26, miR-29, mir-30 (Chang et al. 2009) ou encore miR-122. Ce dernier illustre un cas particulier puisque miR-122 inhibe indirectement la transcription de c-Myc, dépeignant un mécanisme de régulation réciproque qui se trouve perturbé dans les cellules hépatiques cancéreuses. En effet, dans des conditions physiologiques, miR-122 réprime l'expression des facteurs de transcription Tfdp2 et E2f1 en se liant à leur 3'-UTR grâce au complexe RISC. Ces facteurs sont responsables de l'augmentation de l'expression de c-Myc, ainsi une diminution de l'expression de miR-122 entraîne une perturbation de cette boucle de régulation augmentant la transcription de c-Myc et conduisant à un cancer du foie (Wang et al. 2014). Contrairement à c-Myc, p53 est quant à lui un facteur suppresseur de tumeur, très souvent muté dans les cancers, responsable de la répression de la transcription de miARN oncogènes et de l'activation de la transcription de miARN suppresseurs de tumeurs tels que miR-34a, un inducteur de l'apoptose. La mutation ou le dysfonctionnement du facteur p53 conduit souvent à la régulation négative de l'expression de miR-34a (provoquée en amont par la liaison directe de p53 au promoteur du gène *mir-34a*) dans les tumeurs malignes hématologiques ou solides (Slabáková et al. 2017).

La biogenèse des miARN est complexe et régit par différentes protéines (voir II.1) dont les mutations ou la non-translation altèrent le processus de maturation des pri-miARN en miARN, pouvant mener au développement de cellules cancéreuses. En



effet, des mutations dans les domaines RNase III de la protéine Drosha, responsables du clivage aux extrémités 5' et 3' des pri-miARN, ont été mises en évidence dans les cancers du rein chez l'enfant (tumeurs de Wilms). Ces mutations entraînent un non-clivage des extrémités, se traduisant par un arrêt au stade de pri-miARN. Par exemple, dans ces tumeurs, le miARN mature let-7a est beaucoup moins présent malgré une grande quantité de son pri-miARN (Walz et al. 2015). De façon général, la dérégulation des miARN les conduits à agir comme des oncomiR favorisant le développement de cancers mais aussi, dans certains cas, comme des suppresseurs de tumeurs en jouant sur l'expression génique de gènes anti-tumoraux (Svoronos et al. 2016). Les exemples spécifiques illustrés ici ne représentent qu'une petite fraction des miARN impliqués dans les cancers. En effet, en 2004 une étude faite sur 186 miARN a montré que 98 miARN (52,5%) étaient localisés dans des sites chromosomiques fragiles ou sur des régions génomiques associées au cancers (Calin et al. 2004).

La découverte et l'étude des miARN au cours de ces dernières années a permis de mieux comprendre la biologie du cancer menant au développement de nouvelles thérapies et de nouveaux diagnostics (Hayes et al. 2014). Ainsi tout comme les RBP, les miARN sont des régulateurs importants de l'expression génique qui, en cas de dérégulation, conduisent à des maladies tel que le cancer. Bien qu'étudier très souvent individuellement, des études ont montré la possibilité d'action conjointe du fait de la proximité entre leurs séquences cibles sur le 3'-UTR d'ARNm (Galgano et al. 2008; Mukherjee et al. 2011).

### III. Interactions fonctionnelles entre RBP et miARN

En 2017, une étude effectuée sur 72 pré-miARN dans plusieurs types cellulaires a montré que 180 RBP étaient en interaction avec un ou plusieurs de ces miARN (Treiber et al. 2017). En effet, certaines RBP sont capables d'interagir avec des miARN et de jouer un rôle important dans leur fonctionnement notamment en affectant la localisation, la biogenèse ou la fonction des miARN ainsi que leur interaction avec leurs ARNm cibles (Loffreda et al. 2015; Connerty et al. 2015). De cette manière, les RBP modulent la régulation de l'expression génique par les miARN en agissant comme des cofacteurs ou des antagonistes de la liaison miARN-ARNm. Trois types d'interactions fonctionnelles entre miARN et RBP peuvent être décrites : les interactions compétitives, les interactions synergiques et pour finir les interactions par médiation (Figure 10) (Jiang et Coller 2012).

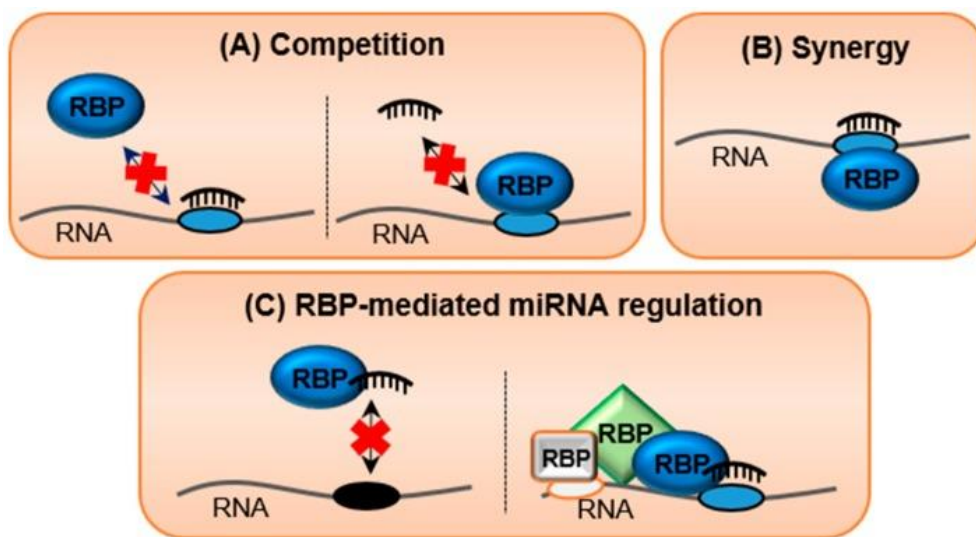


Figure 10 : Diversité des interactions fonctionnelles entre miARN et RBP (image issue de Desi et Tay 2019). A : modèle représentant une interaction compétitive. B : modélisation d'une interaction de type synergique. C : deux modèles différents représentant les interactions par médiation. Les formes ovales bleues sur l'ARN représentent les sites de liaison des miARN et des RBP, les flèches à double sens indiquent une interaction bidirectionnelle et les croix rouges correspondent à une perte d'interaction.

### III.1 Interactions compétitives

Dans ce mode d'interaction, les RBP et les miARN entrent en compétition généralement pour la même partie 3' UTR d'un ARNm, conduisant à des effets antagonistes (Figure 10.A). Parmi les RBP compétitrices, les protéines de la famille Hu sont souvent candidates à ce type de mécanisme puisqu'elles participent généralement à la stabilisation de l'ARNm en se liant à leur partie 3' UTR. En conditions physiologiques, l'ARNm codant pour COX-2 (*Cyclooxygénase 2*) est dégradé par miR-16. En revanche, dans les cellules cancéreuses colorectales, la protéine HuR est surexprimée, lui permettant d'outrepasser la fonction de miR-16, stabilisant l'ARNm entraînant ainsi la surexpression de l'enzyme COX-2 associée à une faible survie (Young et al. 2012). Dans certains cas plus rares, les RBP interagissent avec une région codante de l'ARNm entrant en compétition avec des miARN. Par exemple, lors de sa liaison à une région codante de l'ARNm de  $\beta$ TrCP1 (*Beta-Transducin Repeats-Containing Protein 1*), la protéine CRD-BP (*Coding Region Determinant-Binding Protein*) protège l'ARNm de la dégradation en inhibant l'interaction de miR-183 avec l'ARNm (Elcheva et al. 2009).

### III.2 Interactions synergiques

Les interactions synergiques caractérisent les actions conjointes entre RBP et miARN dans la régulation d'ARNm partagés. Elles se caractérisent par un mécanisme de coopérativité dans lequel la présence simultanée sur l'ARNm cible du miARN et de la RBP va renforcer leurs fonctions respectives. (Figure 10.B). C'est le cas pour la protéine PUM1 (*Pumilio homolog 1*), impliquée dans le développement cellulaire et le maintien des cellules souches, qui coopère avec miR-410 pour réprimer ses ARNm cibles faiblement accessibles. En effet, lors de sa liaison, PUM1 ouvrirait les structures

secondaires de l'ARNm permettant l'accès de miR-410 (Leibovich et al. 2010). Un exemple similaire concerne la synergie entre HuR et let-7 conduisant à la répression de l'expression de c-Myc. Indépendamment, HuR diminue l'expression de c-Myc lors de sa liaison à la partie 3'-UTR. Le positionnement de HuR adjacent au site de liaison de let-7 induirait un changement local dans la structure de *c-Myc* prêt à accueillir le complexe let-7-RISC (Kim et al. 2009). Au vu des exemples décrits, la synergie entre RBP et miARN semble résulter de changements conformationnels subis par l'ARNm facilitant ainsi l'accès aux sites de liaison de miARN préalablement masqués. Néanmoins, aucune étude structurale n'a pu confirmer à ce jour cette hypothèse.

### III.3 Interactions par médiation

La médiation RBP miARN peut être décrite par deux types d'interactions. La première concerne les interactions directes entre RBP qui vont aider à la fonction du miARN (Figure 8.C, à droite). Par exemple, il a été montré que, lors de la dégradation de l'ARNm *TNF- $\alpha$*  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) par miR-16, des interactions physiques entre la protéine TTP et AGO permettent à miR-16 d'être incorporé à RISC facilitant le ciblage des ARE (Jing et al. 2005). La deuxième décrit les interactions directes entre RBP et miARN entravant leur liaison respective sur les ARNm. D'une part, la liaison des RBP aux ARNm peut être inhibée par l'action des miARN. Cet événement fait intervenir un mécanisme non-canonique particulier de leurre par les miARN appelé *miRNA decoy* au cours duquel les miARN interfèrent avec les fonctions régulatrices des RBP. miR-328 utilise ce mécanisme de leurre pour réactiver la traduction de l'ARNm *CEBPA* (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*), en interagissant directement par sa région riche en C et non par sa région graine avec hnRNP E2 (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein E2*). Cette interaction empêche la liaison entre hnRNP E2 et l'ARNm *CEBPA* réactivant sa traduction (Eiring et al. 2010). D'autre part, la liaison des miARN aux ARNm peut cette fois-ci être inhibée par l'action des RBP via un nouveau

mécanisme de séquestration. En 2012, une étude sur le cancer colorectal a montré que la surexpression de HuR et sa localisation dans le cytoplasme lui permettait de séquestrer miR-16, empêchant sa liaison à l'ARNm COX-2 (Young et al. 2012). Il a aussi été observé qu'en réponse à un déficit nutritif, la protéine HuR se lie à miR-122, le décrochant de la protéine AGO2. L'interaction HuR : miR-122 favorise l'export extracellulaire du miARN et réactive la traduction des ARNm cibles de miR-122 (Mukherjee et al. 2016).

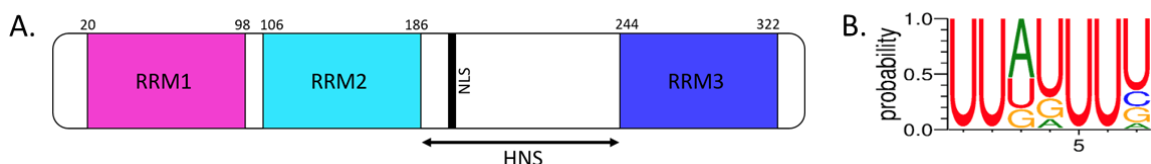
#### IV. Human Antigen R (HuR/ELAVL1)

##### IV.1 Présentation de la famille ELAVL

Les protéines de la famille ELAVL (*Embryonic Lethal Abnormal Visual system Like*) ou Hu (*Human antigen*) sont des protéines de liaison à l'ARN. Ces protéines, d'abord identifiées chez la *Drosophila* dans les neurones, sont vitales pour la régulation et le traitement des ARNm. Les protéines de cette famille possèdent 3 domaines de reconnaissance à l'ARN (RRM) qui se lient aux ARE bien souvent retrouvées dans la partie 3'-UTR des ARNm. Chez l'humain, cette famille est composée de quatre membres : HuB (codé par le gène *ELAV-like 2*), HuC (codé par le gène *ELAV-like 3*), HuD (codé par le gène *ELAV-like 4*) et HuR (codé par le gène *ELAV-like 1*). La protéine HuR est ubiquitaire tandis que HuB, HuC et HuD ne sont retrouvées que dans les cellules neuronales.

## IV.2 La structure de HuR

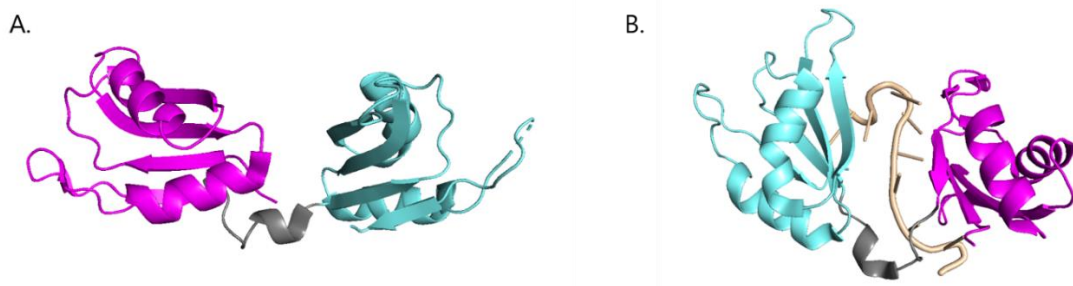
HuR est une RBP encodée par le gène *ELAVL1* localisé sur le chromosome 19p13.2. La protéine HuR constituée de 326 résidus d'acide aminé (36 kDa) est composée de 3 RRM structuralement organisés selon la topologie suivante :  $\beta_1$ - $\alpha_1$ - $\beta_2$ - $\beta_3$ - $\alpha_2$ - $\beta_4$  (Wang et al. 2013). Le RRM1 (résidus T20 à P98) et le RRM2 (résidus A106 à N186), coté N-terminal, sont séparés du RRM3 (résidus W244 à N322), coté C-terminal, par une longue région non structurée HNS (*HuR nuclear-cytoplasmic shuttling*) contenant le signal de localisation nucléaire (NLS, *Nuclear Localization Signal*) (Figure 11.A). HuR est une RBP reconnaissant les motifs ARE se trouvant bien souvent dans les régions 3'-UTR de ses ARNm cible (Figure 11.B)



**Figure 11 :** Structure de HuR. A : Schéma différents domaines de la protéine HuR, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale : tandem constitué par RRM1 (en magenta) et RRM2 (en cyan), longue région non structurée HNS contenant le NLS et RRM3 (en bleu). B : Séquence consensus reconnue par HuR (Source : oRNAmement, (Benoit Bouvrette et al. 2020).

Le première structure 3D de HuR obtenue par diffraction des rayons X, à une résolution de 2 Å, fut celle décrivant la structure du RRM1 (PDB : 3HI9, Benoit et al. 2010). Ce premier RRM possède une structure type constituée par des RRM canoniques composés de 4 brins  $\beta$  organisés de façon antiparallèle contre deux hélices  $\alpha$  perpendiculaires (Benoit et al. 2010). Par la suite, l'étude du tandem de HuR a conduit à l'obtention des structures 3D d RRM1 et 2 libres et complexés avec un ARN. La structure cristallographique du tandem libre, obtenue à une résolution de 2,90 Å (PDB : 4EGL, Wang et al. 2013) a montré que RRM1 et 2 suivaient la topologie canonique des RRM et que les motifs conservés RNP1 et RNP2 étaient bien présents dans la partie

centrale des brins  $\beta_3$  et  $\beta_1$  respectivement. Les deux RRM sont très similaires cependant, la boucle 5 (résidus G83 à I91) du RRM1 entre  $\alpha_2$  et  $\beta_4$  adopte une conformation  $\beta$ -boucle- $\beta$  non observée dans le RRM2. Plus intéressant encore, le cristal obtenu a permis de mettre en lumière une conformation ouverte adoptée par le tandem dans laquelle aucune interaction intramoléculaire n'apparaît entre RRM1 et RRM2. Le *linker* (résidus S99 à D105) entre les deux domaines RRM les maintient éloignés à une distance supérieure à 13 Å (Wang et al. 2013) (Figure 12.A). La forme complexée du tandem a été obtenue à une résolution de 2 Å, en présence d'un ARN synthétique de 11 nucléotides riche en ARE de séquence 5'-AUUUUUAUUUUU-3' (PDB : 4ED5). Lors de sa liaison à l'ARN, le tandem subit alors un changement conformationnel l'entraînant dans une conformation dite fermée créant un sillon entre les feuillets  $\beta$  constitués de résidus d'acides aminés chargés positivement pouvant ainsi accueillir l'ARN (Figure 12.B). Cette conformation est maintenue par des liaisons hydrogènes inter-RRM existant entre la chaîne latérale de L92 et le squelette de I133 mais aussi entre R97 et les résidus N155 et V102 (linker). RRM1 reconnaît les cinq nucléotides U5 à U8 et U10 de la séquence d'ARN tandis que RRM2 interagit avec les nucléotides U3 et U4. Le linker est lui aussi impliqué dans la liaison en se liant au nucléotide U9. Les résidus d'acides aminés du tandem RRM1-2 peuvent interagir avec l'ARN par exemple par le biais *i)* de leur chaîne latérale comme pour N21, N25, Q29, F65, K89, K92, R97, S99, S100, K104, N107, R147, R153 et K182 ; *ii)* de leur squelette comme L61, T90, R97, S100 et A185 ; ou *iii)* par empilements  $\pi$ - $\pi$  comme pour les résidus aromatiques Y26, F65, Y109 et F151 (Wang et al. 2013).



**Figure 12 :** Structures 3D du tandem constitué de RRM1 (magenta) et RRM2 (cyan) : A. libre (PDB : 4EGL) ou B. lié à l'ARN (beige) (PDB : 4ED5), obtenues par diffraction des rayons X.

Les structures du RRM3 libre ou lié à l'ARN n'ont été obtenues que récemment par diffraction des rayons X à des résolutions respectives de 1,35 Å et 1,90 Å. Le RRM3 libre (PDB : 6GD3) adopte également un repliement classique aux RRM canoniques avec cependant un brin supplémentaire ( $\beta_3'$ ) défini par 4 résidus d'acides aminés (G307, Y308, R309 et L310) entre  $\alpha_2$  et  $\beta_4$  (Figure 13.A). Ici encore, les feuillets  $\beta$  sont principalement constitués de résidus chargés positivement et contiennent les motifs RNP1 et RNP2 pouvant interagir avec l'ARN par empilement  $\pi$ - $\pi$  (Pabis et al. 2019a). La structure 3D du RRM3 lié à un ARN synthétique riche en ARE (5'-AUUUUUUUUUU-3', PDB: 6GC5) (Figure 13.B) montre que le nucléotide U2 forme des liaisons hydrogènes avec la chaîne latérale du résidu Q316 mais aussi des empilements  $\pi$ - $\pi$  avec Y249 tandis que U3 interagit avec F247 par empilement  $\pi$ - $\pi$  et des liaisons hydrogènes avec les résidus L320, T321 et L323 (Ripin et al. 2019a; Pabis et al. 2019a).

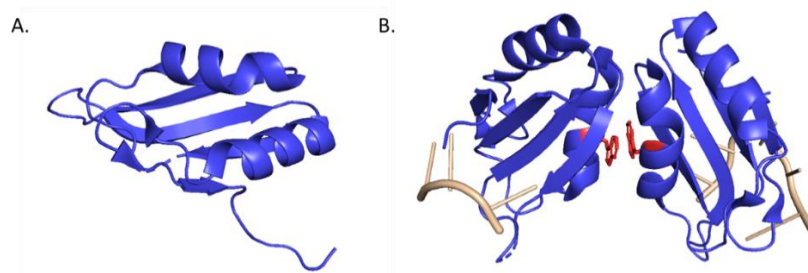
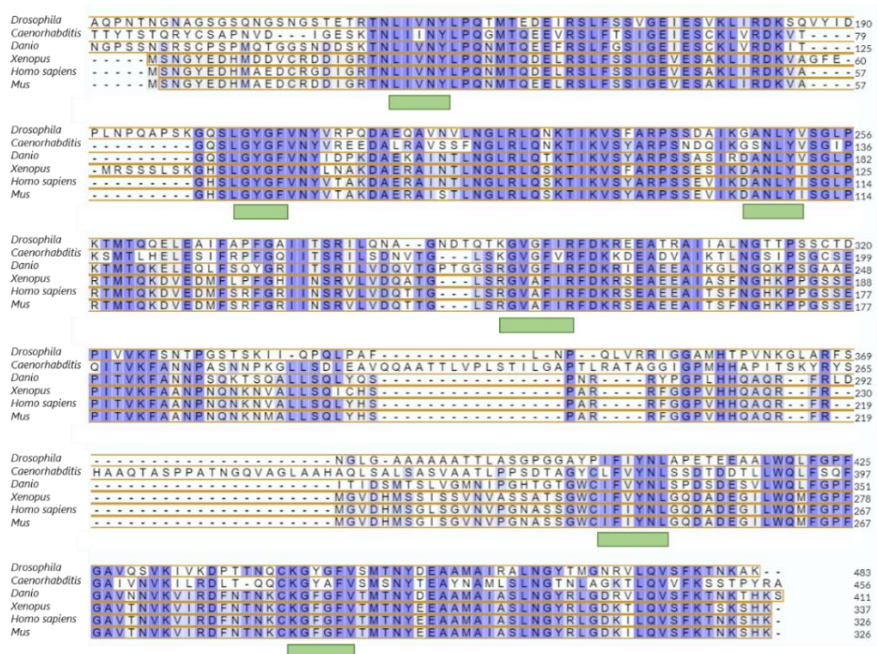


Figure 13 : Structures 3D du RRM3 de HuR (bleu) : A : libre (PDB : 6GD3) et B : lié à l'ARN (beige) et homodimérisation par empilement  $\pi$ - $\pi$  du résidu W261 (rouge) (PDB : 6GC5).

Concernant les cibles reconnues par les domaines de liaison, le tandem RRM1-2 reconnaît les éléments cis-régulateur ARE (Fan et Steitz 1998). Le rôle du RRM3 a, quant à lui, longtemps été attribué à la reconnaissance des queues poly-A des ARNm (Abe et al. 1996; Maet al. 1997). Néanmoins, les études ayant conduit à la détermination de la structure 3D de RRM3 ont montré que RRM3 avait également la possibilité de se lier aux ARE des ARN (Pabis et al. 2019; Ripin et al. 2019), comme le tandem. Plus intéressant encore, plusieurs études ont montré que le RRM3 a la capacité à dimériser



avec lui-même à travers son résidu Tryptophane 261 (W261, Figure 13.B) et que cette dimérisation pourrait être responsable de l'augmentation de l'affinité de HuR pour ses ARNm cibles (Scheiba et al. 2014; Ripin et al. 2019; Pabis et al. 2019). Généralement, il a été montré que HuR est capable de former des complexes oligomériques coopératifs dès lors que la séquence d'ARN liée dépasse les 18 nucléotides (Fialcowitz-White et al. 2007). Cependant, la nécessité absolue du RRM3 pour l'activité de la liaison à l'ARN de HuR reste encore à démontrer. La région HNS de HuR contient le signal NLS qui est nécessaire pour le transport nucléocytoplasmique de la protéine détaillé plus loin dans la partie IV.4. Cette région HNS peut également établir quelques contacts ioniques non-spécifiques avec des substrats d'ARN, suggérant que les fonctions de liaison d'ARN et de navette nucléocytoplasmique de HuR peuvent être mutuellement exclusives (Fialcowitz-White et al. 2007). Ainsi, tous les domaines de la protéine HuR semblent avoir leur importance et participent à des degrés différents à la liaison des ARNm cibles. La protéine HuR est très conservée au sein des espèces eucaryotiques montrant l'importance de cette protéine (Figure 14).



**Figure 14:** Alignement de la séquence de HuR *Homo sapiens* avec ses homologues chez *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis* et *Mus musculus* montrant la conservation (résidus en bleu) et les RNP (en vert). Alignement fait avec le serveur UniProt (The UniProt Consortium 2023).

### IV.3 Expression de HuR

Exprimée de façon ubiquitaire, ses niveaux d'expression dans les conditions physiologiques normales restent constants tout au long du cycle cellulaire. Cependant, des altérations peuvent être observées comme dans des cellules quiescentes et sénescents où le niveau d'expression de HuR est généralement réduit ou *a contrario* dans des maladies comme le cancer où HuR se trouve souvent surexprimée. D'un point de vue mécanistique, la protéine HuR participe à sa propre régulation d'expression afin de maintenir son homéostasie. D'une part, une boucle d'auto-régulation positive a été décrite au cours de laquelle l'ARNm *HuR* va nécessiter la liaison en 3'UTR de la protéine afin d'être exporté vers le cytoplasme où il sera traduit. La cellule voit donc le niveau d'expression de HuR augmenter permettant ainsi d'accroître l'export d'ARNm (Yi et al. 2010). D'autre part, il a également été montré que les niveaux d'expression de HuR peuvent être modulés par une boucle d'auto-régulation négative où HuR en se liant à son propre pré-ARNm entraîne l'augmentation de l'expression d'une forme longue de l'ARNm possédant des séquences ARE déstabilisantes, réduisant ainsi la production de la protéine HuR (Dai et al. 2012). Bien entendu, dans les conditions pathologiques, l'expression de HuR est très souvent modifiée par l'influence de certains miARN ayant pour cible l'ARNm de 'HuR (Abdelmohsen et al. 2010; Xu et al. 2010; Guo et al. 2009).

### IV.4 Distribution subcellulaire de HuR

Dans les conditions physiologiques, la protéine HuR est localisée dans le noyau où elle va permettre la régulation d'ARNm nucléaires ainsi que différentes étapes de leur *processing*. Mais en réponse à certains stimuli comme le stress, elle est transportée dans le cytoplasme. En effet, la région non structurée HNS gère le transport bidirectionnel entre le noyau et le cytoplasme. La séquence NLS du HNS permet

principalement le transport de la protéine dans le sens cytoplasme vers noyau où HuR est reconnue par des protéines spécifiques dont les nucléoporines servant de guide vers les ports nucléaires. Il est à noter que la protéine HuR fait partie des rares RBP pouvant aussi être transportées dans le sens noyau vers cytoplasme sans même posséder une séquence Signal d'Export Nucléaire (NES, *Nuclear Export Signal*). Pour être transportée du noyau vers le cytoplasme, la région HNS de HuR se lie à Trn2 (*Transportin-2*) via l'implication de deux résidus d'acides aminés essentiels P222 et M223 (Rebane et al. 2004). Le transport est dit actif car Trn2 nécessite la présence de la petite protéine Ran GTPase pour naviguer entre le cytoplasme et le noyau. En d'autres termes : dans le noyau, Trn2 se lie simultanément à HuR et à RanGTP induisant leur transport vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, RanGTP est hydrolysée en RanGDP, conduisant au relargage de HuR dans le cytoplasme. Dans le sens cytoplasme noyau, Trn2 libre se lie avec HuR et une fois dans le noyau à RanGTP, engendrant le relargage de HuR. Ce mécanisme de transport est le plus connu mais il n'est pas exhaustif. Une fois dans le cytoplasme, la protéine HuR peut aussi se retrouver dans des granules de stress ou encore dans des P-bodies (*Processing-bodies*), un lieu de stockage d'ARNm non traduits. Il est également intéressant de savoir que la localisation cellulaire de HuR est dépendante du cycle cellulaire. Lors de la phase G1 du cycle cellulaire, HuR se trouve principalement dans le noyau mais pendant la phase S et G2, une fraction considérable de HuR est transportée vers le cytoplasme afin d'exercer ses fonctions sur la traduction et la stabilité de ses ARNm cibles (Kim et Gorospe 2008; Wang et al. 2000).

#### IV.5 Régulation transcriptionnelle

En général, le niveau d'expression des RBP est contrôlé au niveau de la traduction ou par des modifications post-traductionnelles. Cependant il arrive parfois que la régulation se fasse directement au niveau de la transcription. La transcription du

gène *hur* est contrôlée positivement par le facteur de transcription NF-κB (*Nuclear Factor kappa B*) dont le site putatif de liaison (5'-CGGAAGTCCCG-3') est présent en amont du promoteur de *hur*, à environ -133/-123 nucléotides du site d'initiation de la transcription. Dans un état physiologique normal, les cellules conservent la voie de signalisation dont fait partie NF-κB inactivée par des protéines inhibitrices. En situation de stress par exemple, les différents modulateurs dans la voie de signalisation sont phosphorylés, entraînant l'activation de la protéine NF-κB qui, en se fixant sur les sites de liaison, va pouvoir activer l'initiation de la transcription du gène *hur*. Cette voie de signalisation engendre une surexpression de la RBP HuR, très souvent observée dans des maladies comme le cancer (Kang et al. 2008). La régulation de l'expression d'une protéine en jouant sur sa transcription est un phénomène rare nécessitant plus de temps avant d'avoir un impact sur les niveaux de protéines dans les cellules, c'est pourquoi les modifications post-transcriptionnelles sont plus souvent utilisées pour réguler l'expression génique.

#### IV.6 Modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles PTM (Post-translational modifications) sont très variées et concernent les modifications chimiques apportées aux protéines par l'intermédiaire d'actions enzymatiques. Elles peuvent influencer la structure, la localisation ou encore l'activité de HuR lors de sa liaison à l'ARN. Dans cette partie, les différentes modifications post-traductionnelles subies par HuR (Figure 16) seront détaillées ainsi que leurs effets sur les fonctions régulatrices de HuR.

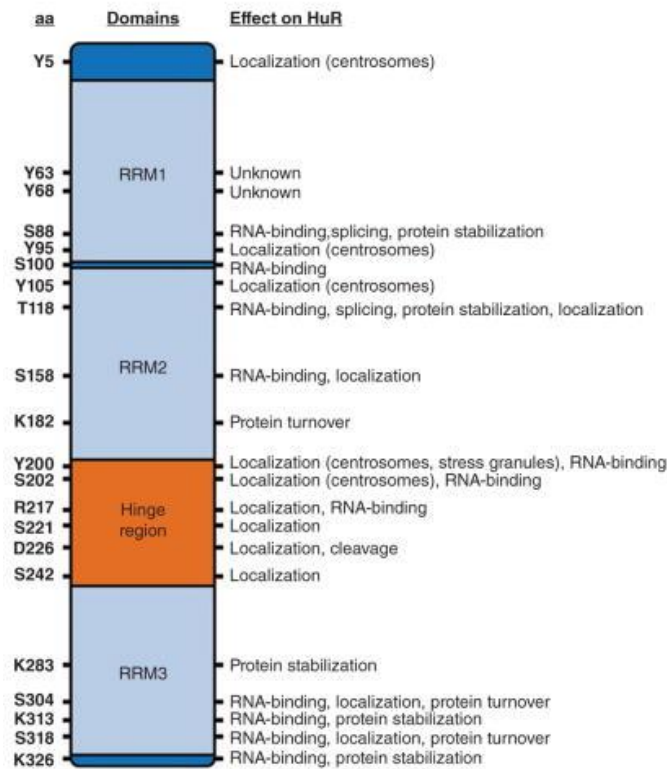


Figure 15 : Résidus subissant des PTM et leurs impacts sur HuR (adapté de Grammatikakis et al. 2017)

#### IV.6.1 Les phosphorylations

Ce type de modifications est réversible et correspond à l'ajout d'un groupement phosphoryl négatif  $\text{PO}_3^{2-}$  aux résidus d'acides aminés accepteurs tels que la sérine, la thréonine ou encore la tyrosine chez les eucaryotes. L'ajout de ces charges négatives peut conduire, par exemple, à un ajustement de la structure de la protéine par effet stérique.

La phosphorylation résulte de l'action d'enzymes appelées kinases comme la kinase CHK2 la (*Checkpoint 2*) qui joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire en phosphorylant des protéines importantes dans l'inhibition de la prolifération. Cette enzyme est activée lors de stress génotoxique, provoqué par des rayonnements ultra-violets ou des agents chimiques comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) engendrant

directement des problèmes au niveau de la structure de l'ADN. En réponse à un traitement avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HuR est phosphorylé par CHK2 sur les résidus S88, S100 et T118, impactant la liaison à l'ARN de HuR (Abdelmohsen et al. 2007). Il a été montré que ces phosphorylations entraînent le décrochage de HuR du 3'UTR de l'ARNm *SIRT1* (*Silent mating type Information Regulator Two homolog 1*), provoquant ainsi sa dégradation et la réduction de l'expression de la protéine SIRT1. Cette réponse au stress oxydatif est étonnante car elle inhibe la production d'une protéine aidant à la réponse au stress, induisant par conséquent une diminution de la survie cellulaire. Dans l'ensemble, la phosphorylation de HuR par CHK2 provoque une dissociation de ses ARNm cibles entraînant une diminution de la survie cellulaire. Certaines exceptions ont été rapportées comme lors d'un traitement à l'arsénite où HuR alors phosphorylée va se lier à l'ARNm *TRA2β* (*Splicing factor transformer 2*) entraînant un épissage alternatif de cet ARNm, générant ainsi un nouvel isoforme de TRA2β (Akaike et al. 2014).

La famille des PKC (Protéines kinases C) joue un rôle au niveau de la migration cellulaire, de l'apoptose et de la prolifération. Ces protéines phosphorylent majoritairement les résidus S158, S221 et S318. Dans le noyau, PKCα phosphoryle les résidus S158 et S221, entraînant la translocation de HuR vers le cytoplasme. L'augmentation locale de la concentration de HuR dans le cytoplasme renforce la liaison avec son ARNm cible *COX2* le stabilisant (Doller et al. 2007). Lors d'un traitement à l'angiotensine II de cellules mésangiales humaines, la phosphorylation du résidu S318 par PKCδ conduit à un renforcement de la liaison entre HuR et ses ARNm cibles comme *COX2*, *CCNA2* (*cycline A2*) ou encore *CCND1* (*Cycline D1*). Cette phosphorylation ne joue pas sur le transport vers le cytoplasme de HuR à l'inverse de la phosphorylation de S221 qui elle est critique pour cet export cytoplasmique (Doller et al. 2010).

Les CDK (*Cyclin-dependant kinases*) sont, quant à elles, impliquées dans la différenciation cellulaire et la progression du cycle cellulaire. CDK1 est responsable de la phosphorylation de HuR sur le résidu S202, qui retient la protéine HuR dans le noyau. Cette phosphorylation a lieu pendant les phases S et G2 et assure le maintien de HuR

dans le noyau une fois la mitose terminée (Kim et al. 2008). En réponse à un stress à l'UV, CDK1 est phosphorylée, inhibant sa liaison avec HuR. La non-phosphorylation du résidu S202 permet alors à HuR d'être transportée dans le cytoplasme pour se lier à ses ARNm cibles dont *p21/CDKN1A*, augmentant sa traduction en protéines p21 inhibitrices de CDK (Al-Khalaf et Aboussekhra 2014). C'est dans le centrosome des cellules du gliome que CDK5 interagit avec HuR et phosphoryle le résidu S202. HuR n'est alors plus capable de se lier à l'ARNm *CCNA2*, entraînant une diminution de la traduction de la cycline A2, responsable de l'arrêt du cycle cellulaire, et d'une duplication défectueuse du centrosome suggérant que la présence de HuR au centrosome permet de réguler la synthèse des protéines à proximité (Filippova et al. 2012).

Parmi les kinases de la famille MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), p38 est impliquée dans la réponse cellulaire à la suite de dommage de l'ADN et dans le cycle de division cellulaire en régulant l'arrêt de la phase G2 induite par rayons gamma. Lors d'un traitement par rayons gamma, p38 phosphoryle HuR sur le résidu T118, conduisant à l'accumulation de HuR dans le cytoplasme. Cette phosphorylation induit l'augmentation de l'expression de la protéine p21 grâce à la stabilisation de son ARNm *p21*, cible de HuR, déclenchant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire au checkpoint entre la phase G1 et la phase S (Lafarga et al. 2009). Lors d'un traitement à l'interleukine-1 $\beta$ , p38 phosphoryle T118, renforçant la liaison de HuR à l'ARNm *cPLA2 $\alpha$*  (*Cytosolic Phospholipase A2*) et *COX2*, augmentant leur stabilisation et leur niveau de traduction. Ces événements indiquent que HuR pourrait être un effecteur clé des fonctions médiées par p38 dans la réponse inflammatoire, néanmoins l'inhibition de p38 conduit à une augmentation de la phosphorylation globale de HuR (Degese et al. 2015; Liao et al. 2011).

Jusqu'à présent, les exemples de phosphorylation impliquaient les résidus de sérines ou thréonines. La protéine tyrosine kinase JAK3 (Janus Kinase 3) a été identifiée comme pouvant phosphoryler les résidus Y63, Y68 et Y200. Cependant, seule la

phosphorylation du résidu Y200 affecte les fonctions de HuR et induit son exclusion des granules de stress formées à la suite d'un traitement à l'arsénite, réduisant son interaction avec certains de ses ARNm cibles, comme *SIRT1*, qui sont alors dégradés (Yoon et al. 2014).

La liste des kinases présentées dans cette partie n'est pas exhaustive. Il existe bien entendu d'autres kinases responsables de phosphorylation sur HuR dont les conséquences restent encore à être étudiées.

#### IV.6.2 Les ubiquitinations

Lorsque les protéines sont dégradées, elles subissent le marquage par une chaîne d'ubiquitination qui sera ensuite reconnue par le protéasome qui va les dégrader. Ce processus nécessite trois enzymes spécifiques, E1, E2 et E3 qui agissent en cascade pour fixer de façon covalente une ou plusieurs ubiquitines sur les protéines amenées à être dégradées. L'enzyme E1, dite activatrice, agit la première en activant l'ubiquitine puis la transfère à l'enzyme E2, dite conjugante qui à son tour interagit avec l'enzyme E3, dite ligase, qui achemine l'ubiquitine sur une lysine de la protéine cible. Chez HuR, plusieurs résidus ont été mis en évidence comme pouvant être ubiquitinylés : K182, K313 et K326. En réponse à un dommage à l'ADN, le suppresseur de tumeur *ECRG2* (*Esophageal Cancer-Related Gene 2*) subit une augmentation d'expression qui en retour favorise l'ubiquitination du résidu d'acide aminé K182 de HuR entraînant sa dégradation (Lucchesi et al. 2016). Lors d'un stress métabolique induit par des inhibiteurs de la glycolyse ou lors d'un manque de glucose, une diminution des niveaux de HuR est observée bien que les niveaux ARNm *HuR* ne soient pas influencés, signifiant que la régulation de HuR est altérée au niveau de modifications post-traductionnelles. Au même moment, les niveaux de la ligase E3 sont augmentés, suggérant l'implication d'une ubiquitination de la protéine HuR suivie



d'une dégradation. Cette dégradation est facilitée par la phosphorylation de HuR sur S318, favorisant son transport vers le cytoplasme et son interaction avec la ligase E3. Cependant, le site d'ubiquitination n'a pas été identifié pour le moment (Chu et al. 2012). L'ubiquitination ne conduit pas toujours à la dégradation mais elle peut, dans certains cas, donner des nouvelles fonctions à la protéine. En effet, l'ubiquitination, ici présente sous la forme d'une courte chaîne d'ubiquitine (appelée K29, forme particulière d'ubiquitination) de HuR sur les résidus K313 et K326 sert de signal au décrochage de HuR de ses ARNm cibles *p21*, *MKP1* et *SIRT1*. Cette fois, l'ubiquitination de HuR permet de jouer sur ses fonctions et non sur sa dégradation (Zhou et al. 2019).

Il existe aussi des protéines qualifiées d'ubiquitine-like comme NEDD8 (*Neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8*) qui se lie de manière covalente à leurs protéines cibles en mimant l'ubiquitine. NEDD8 est une protéine impliquée dans des processus tels que l'embryogenèse et le contrôle du cycle cellulaire qui, via une modification post-traductionnelle appelée neddylation, agit sur les résidus K283, K313, et K326 de la protéine HuR. La localisation cytoplasmique de HuR est augmentée lors de la neddylation de K313 et K326. Contrairement à une ubiquitination, cette modification stabilise HuR et la protège de la dégradation (Embade et al. 2012). Cependant, l'impact de ces modifications post-traductionnelles particulières sur les fonctions de HuR, comme sa liaison aux ARNm, reste encore à élucider.

#### IV.6.3 Les méthylations

Ces modifications post-traductionnelles consistent en l'ajout d'un groupement méthyle sur un résidu arginine, favorisant la régulation de plusieurs processus cellulaires comme les interactions protéine-protéine, la transcription ou encore le transport entre le noyau et le cytoplasme. Les enzymes responsables de la méthylation s'appellent PRMT (Protéines arginine méthyltransférases). Elles transfèrent le

groupement méthyle du métabolite SAM (*S-adenosylméthionine*) sur la protéine cible, générant une protéine monométhylée ou diméthylée. Par exemple, PRMT4 (*Protein arginine N-methyltransferase-4*) cible le résidu R217 de la protéine HuR, accroissant ses fonctions stabilisatrices sur certains de ses ARNm cibles comme *SIRT1*, *CCNA2* ou encore *FOS* (Pang et al. 2013). La méthylation du résidu R217 est aussi souvent corrélée à une augmentation de la localisation cytoplasmique de HuR dans les cellules cancéreuses, faisant de HuR R217-méthylé un éventuel marqueur de pronostic dans certains cancers (Vigouroux et al. 2015).

#### IV.6.4 La protéolyse

La protéolyse, ou le clivage protéolytique, consiste au clivage d'une protéine cible par des enzymes spécifiques qualifiées de protéases comme les caspases par exemple. En situation de stress, HuR est transportée vers le cytoplasme où elle peut subir une protéolyse par les caspases 3 et 7. Cette coupure a lieu au niveau du résidu D226, générant deux fragments HuR-CP1 et HuR-CP2. Pour que le clivage ait lieu, la protéine HuR doit d'abord s'associer avec le complexe pp32/PHAP-I, un activateur de l'apoptosome, indiquant l'importance éventuelle du clivage de HuR dans l'apoptose (Mazroui et al. 2008). Dans la myogenèse, phénomène conduisant à la formation des tissus musculaires, HuR est clivée par les caspases 3 et 8 induisant une accumulation de HuR non clivé dans le cytoplasme. En effet, le fragment HuR-CP1 issu de ce clivage va bloquer le mécanisme d'import de HuR dans le noyau. HuR s'accumule donc dans le cytoplasme permettant son action sur ses ARNm cibles ce qui promeut la myogenèse (Beauchamp et al. 2010). Ainsi le clivage de HuR par les caspases peut influencer de nombreux processus vitaux pour la cellule. Si les fragments issus de ce clivage peuvent jouer un rôle sur le devenir des ARNm cibles, ces possibilités restent encore à étudier.

A travers les exemples décrits, il a été montré que les modifications post-traductionnelles permettent à la protéine HuR de changer rapidement les programmes d'expression génique de ses cibles. Ces modifications sont bien entendu importantes pour des processus comme la division cellulaire, la réponse à différents stress, l'apoptose, la myogenèse ou encore la cancérogenèse. Les fonctions de HuR sont régulées par des changements dans son abondance, dans son affinité pour l'ARN, dans sa localisation subcellulaire et par son clivage, qui à leur tour influencent la capacité de HuR à affecter le destin des ARNm cibles.

#### IV.7 Fonctions de HuR

La protéine HuR, étant une RBP, possède un grand nombre de fonctions dans la maturation des ARNm et dans la régulation de l'expression génique. Dans cette partie, plusieurs exemples des fonctions exercées par HuR ainsi que certaines de ses cibles seront exposés.

##### IV.7.1 Stabilisation des ARNm

HuR stabilise un grand nombre d'ARNm dont la traduction conduit souvent à la production de protéines impliquées dans des pathologies. La surexpression de HuR ainsi que sa localisation cytoplasmique lui permettent de se lier sur des régions ARE du 3'-UTR de ses ARNm cibles. Cette liaison stabilise les ARNm en protégeant la séquence codante de la dégradation même si la déadénylation a toujours lieu (Peng et al. 1998). Une étude a montré que la perte du RRM3 abolissait cette fonction de stabilisation des ARNm, dévoilant l'importance du RRM3 pour la fonction de HuR (Fan et Steitz 1998). Un exemple de cette fonction de stabilisation a été observée dans une

lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome colorectal humain. Après traitement par rayons UV, induisant la surexpression et l'augmentation de HuR dans le cytoplasme, l'ARNm *p21* se retrouve stabilisé (Wang et al. 2000). HuR a déjà été identifiée comme stabilisant une quarantaine d'ARNm codant pour diverses protéines comme TGF- $\beta$ , SIRT1, eIF-4E, COX-2 et même HuR lui-même. Le mécanisme exact conduisant à la protection des ARNm et à leur stabilisation n'a pas encore été élucidé cependant, il semblerait que la liaison de HuR bloque l'association de sa cible avec des facteurs capables d'initier la dégradation comme les miARN ou d'autres RBP (Srikantan et Gorospe 2012).

#### IV.7.2 Activation de la traduction

La protéine HuR possède une activité de promotion de la traduction de certains de ses ARNm cibles qui encodent des protéines comme la cycline A, p53 ou encore Bcl-2 très souvent impliquées dans des maladies. Lorsque des cellules sont exposées à des UVC de courtes longueurs d'onde, une augmentation de la protéine p53 est observée, n'étant pas la conséquence de l'augmentation de transcription du gène tumeur suppresseur, ni de la stabilisation de l'ARNm mais de l'augmentation de la traduction. Dans ces conditions de stress provoquées par l'exposition aux UVC, HuR est surexprimée et se lie spécifiquement au 3'-UTR de *p53*, ce qui induit sa traduction mais ne joue pas sur son *turnover* (Mazan-Mamczarz et al. 2003). La régulation positive de la traduction peut aussi avoir lieu lors d'une liaison de HuR en 5'-UTR sur les séquences IRES permettant l'initiation de la traduction de façon interne sans nécessité de reconnaissance de la coiffe 5' en recrutant directement le ribosome. L'ARNm *XIAP* (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) contient une séquence reconnue spécifiquement par HuR dans son domaine IRES 5'-UTR activant l'initiation de la traduction. HuR est donc un régulateur positif de l'expression de la protéine XIAP ce qui protège les cellules de la mort cellulaire (Durie et al. 2011).

### IV.7.3 Répression de la traduction

Cette répression de la traduction peut avoir lieu lorsque HuR se lie à une séquence 3'-UTR et recrute un complexe miRISC. En effet, l'ARNm *c-Myc* possède en 3'-UTR un site de liaison de HuR à proximité d'un site de liaison du miARN let-7. HuR semble se lier en premier puis recruter le complexe RISC-let-7 sur *c-Myc*, inhibant la traduction et entraînant sa dégradation (Kim et al. 2009). Plus rarement, HuR est responsable de la répression de la traduction d'un petit nombre d'ARNm en se liant à leur région 5'-UTR. Par exemple, l'ARNm *p27* possède, à proximité du codon initiateur de la traduction dans sa région 5' UTR, une séquence IRES contenant une région riche en U reconnue par HuR. La liaison de HuR inhibe la traduction entraînant la diminution de l'expression de *p27*, une protéine antitumorale, rétablissant ainsi la croissance cellulaire (Kullmann et al. 2002).

### IV.8 Implication de HuR dans les cancers

La protéine HuR est très souvent surexprimée dans les cellules cancéreuses indiquant souvent un mauvais pronostic (Wu et Xu 2022; Wu et al. 2019; Wang et al. 2013). De nombreuses études dédiées à HuR dans les cellules cancéreuses ont permis l'identification de ses cibles et de comprendre le rôle de HuR dans les mécanismes du cancer (Figure 17).

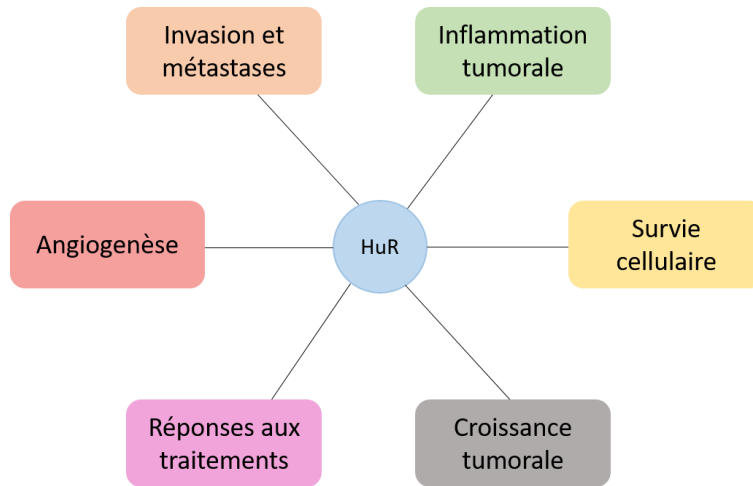


Figure 16 : Implication de HuR dans divers mécanismes de développement des cancers.

#### IV.8.1 Développement et croissance des cellules tumorales

C'est principalement par sa fonction de stabilisation de l'ARNm que HuR participe au développement de cellules cancéreuses. En effet, il a été montré que la surexpression de COX-2 dans des cellules cancéreuses de l'estomac corrèle avec l'augmentation de HuR cytoplasmique et que les différences de niveaux d'expression de COX-2 observées entre les stades précoces et avancés se reflètent également sur les niveaux de HuR, montrant ainsi son implication dans le développement et l'avancée des cancers (Milne et al. 2006). HuR peut, d'une part, promouvoir l'expression de protéines impliquées dans le développement et dans la division cellulaire mais aussi inhiber la mort cellulaire ou la sénescence en influençant les niveaux d'expression de plusieurs cyclines comme la cycline E, retrouvée surexprimée dans les cancers du sein ou encore colorectal. En effet, la surexpression de HuR augmente la production de cycline E en se liant et en stabilisant son ARNm, accélérant en retour la prolifération cellulaire (Guo et al. 2010). HuR agit également en tant qu'inhibiteur sur ses cibles, comme observé pour p27, une protéine pro-apoptotique inhibant elle-même la prolifération cellulaire. HuR agit donc comme un répresseur de la traduction de l'ARNm p27 en se liant à la région IRES du 5'-UTR comme vu dans la sous-partie IV.7.3.

## IV.8.2 La survie cellulaire

Les cellules tumorales continuent de se développer malgré des conditions de stress comme des dommages oxydatifs ou encore un accès restreint aux différents nutriments nécessaires à la croissance cellulaire. Pour prospérer, les cellules tumorales doivent échapper aux différents signaux de mort envoyés par les cellules environnantes mais aussi par la cellule elle-même. Cette résistance à l'apoptose peut être orchestrée par HuR qui va déstabiliser les ARNm codant pour des protéines pro-apoptotiques tout en stabilisant les ARNm codant pour des protéines anti-apoptotiques comme ProTα (*Prothymosin α*), inhibitrice de la formation de l'apoptosome. ProTα est très exprimée dans les cellules cancéreuses où HuR favorise la traduction de son ARNm en se liant à sa partie 3'-UTR. En plus de son rôle anti-apoptotique, l'augmentation de ProTα protège les cellules cancéreuses des radiations par UVC (Lal et al. 2005). Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), une protéine favorisant le développement de cancers où elle est souvent surexprimée, a pour rôle d'inhiber la libération du cytochrome c des mitochondries et donc la voie apoptotique mitochondriale. C'est dans des cellules de leucémie que la liaison de HuR au 3'-UTR de l'ARNm *Bcl-2* a été observée. Cette liaison permet de stabiliser l'ARNm mais aussi de réguler positivement sa traduction (Ishimaru et al. 2009). L'une des fonctions de HuR est également d'aider à l'épissage alternatif pouvant ainsi directement influencer la fonction de la protéine produite. L'épissage normal de l'ARNm de Fas conduit à la production d'un récepteur qui promeut l'apoptose mais lorsque HuR influence son épissage en excluant l'exon 6, un isoforme soluble de la protéine Fas empêchant la mort cellulaire est produit. L'exclusion de l'exon 6 est la conséquence de la liaison de HuR avec un ESS (*Exonic Splicing Silencer*) ce qui inhibe l'association des facteurs d'épissage avec le côté 3' mais pas avec le côté 5' éliminant l'exon (Izquierdo 2008). Il est tout de même intéressant de savoir qu'en cas de stress trop sévère ou trop prolongé, HuR peut devenir pro-apoptotique et participer à la mort de la cellule (Kuwano et al. 2010).

### IV.8.3 Invasion et métastases

Les cellules tumorales sont capables d'envahir les tissus voisins mais aussi de proliférer dans des organes distants et ce en passant par la circulation périphérique. Ces procédés nécessitent un changement au niveau de l'interaction entre la cellule cancéreuse et son environnement proche mais aussi une augmentation des protéases pour dégrader la matrice extracellulaire. HuR favorise le processus de progression des cellules cancéreuses en régulant l'expression des gènes liés à l'invasion et aux métastases. L'une des premières étapes menant à la formation de métastases implique une TEM (Transition épithélio-mésenchymateuse) où les cellules épithéliales perdent l'adhésion cellule-cellule, les rendant invasives et pouvant entraîner une dédifférenciation. La surexpression du facteur de transcription Snail est responsable de l'initiation de cette transition en induisant les protéines mésenchymateuses et réprimant les facteurs épithéliaux. Dans des conditions de stress, après un traitement avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HuR stabilise l'ARNm *Snail* en se liant aux ARE dans la partie 3'-UTR, induisant la surexpression de Snail qui à son tour améliore la capacité de migration cellulaire en réprimant l'expression de cadhérines E, des protéines responsables de l'adhésion cellulaire (Dong et al. 2007). Les MMP (*Matrix metalloproteinases*) sont des protéases capables de dégrader la plupart des substrats de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine et les protéoglycanes dans des conditions physiologiques mais aussi pathologiques. MMP-9 fait partie de cette famille et elle est surexprimée dans différents types de cancers invasifs et métastatiques. Une fois de plus, HuR intervient dans la régulation de l'expression de l'ARNm *MMP-9* en se liant à sa région 3'-UTR afin de le stabiliser. Cet effet semble inhibé par l'oxyde nitrique, produit par les vaisseaux sanguins, jouant sur les niveaux d'expression de HuR. A l'inverse une augmentation d'ATP extracellulaire favorise l'action de HuR sur l'ARNm *MMP-9* (Akool et al. 2003; Huwiler et al. 2003). uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) est aussi une protéase qui déclenche une cascade protéolytique et entraîne



la dégradation de la matrice extracellulaire favorisant les métastases et l'invasion. uPA et son récepteur uPAR sont souvent surexprimés dans les tumeurs malignes, caractérisant la gravité de la maladie et impliquant des mauvais pronostics. L'augmentation de HuR dans le cytoplasme lui permet de se lier aux régions 3'-UTR des ARNm *uPA* et *uPAR*, les stabilisant et augmentant ainsi le niveau d'expression des protéines codées par ces ARNm (Tran et al. 2003). Pour grossir et s'étendre, les cellules cancéreuses envahissent les tissus voisins et dégradent la matrice extracellulaire aidées par HuR mais il est aussi nécessaire pour ces cellules de développer un réseau vasculaire local.

#### IV.8.4 Angiogenèse

L'angiogenèse est un phénomène caractérisé par la formation de nouveaux vaisseaux mais à partir d'un réseau déjà existant et non *de novo* à partir de précurseurs cellulaires. L'angiogenèse est très importante pour la croissance des cellules cancéreuses car elle permet d'amener des nutriments ainsi que de l'oxygène ce qui favorise le développement des cancers. HuR est l'une des protéines participant à l'angiogenèse en jouant sur les niveaux d'expression des facteurs anti-angiogéniques et pro-angiogéniques. Le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$* ) est nécessaire pour la croissance de cellule dans des conditions d'hypoxie car il permet d'activer la transcription de plusieurs gènes essentiels à l'adaptation et la survie des cellules dans un milieu pauvre en oxygène. L'une des protéines interagissant avec l'ARNm *HIF-1 $\alpha$*  est HuR qui reconnaît sa région 5'-UTR et favorise sa traduction. HuR peut aussi reconnaître la région 3'-UTR mais sa liaison à *HIF-1 $\alpha$*  joue, cette fois, sur la stabilisation de celui-ci (Sheflin et al. 2004; Galbán et al. 2008). Une augmentation de la protéine HIF-1 $\alpha$  médiée par la protéine HuR permet ainsi aux cellules cancéreuses de survivre même sans oxygène conférant aux cancers un caractère agressif faisant de

HIF-1 $\alpha$  et HuR de cibles potentielles thérapeutiques contre les cancers (Galbán et Gorospe 2009; Poon et al. 2009). Les facteurs VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ont pour fonction de déclencher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires au développement des différents organes du corps humain. La protéine VEGF est surexprimée dans les cellules cancéreuses qui la sécrètent principalement dû au manque d'oxygénation. Dans des conditions d'hypoxie, HuR reconnaît la région 3'-UTR de l'ARNm *VEGF* augmentant sa stabilité et donc la production de la protéine qu'il encode (Levy et al. 1998). De plus, le gène *vegf* est l'une des cibles du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ . HuR module ainsi deux niveaux de régulation de VEGF, soit directement en stabilisant son ARNm soit de façon indirecte via son action sur HIF-1 $\alpha$ , agissant à son tour sur *vegf*. Il existe aussi des protéines anti-angiogéniques comme TSP-1 (*thrombospondine-1*), une glycoprotéine de la matrice extracellulaire qui bloque la croissance des vaisseaux sanguins. Ici, le mécanisme observé est différent car la liaison de HuR au 3'-UTR de l'ARNm *TSP-1* favorise sa traduction par conséquent cette interaction est inhibée dans les cellules cancéreuses (Mazan-Mamczarz et al. 2008).

#### IV.8.5 Inflammation tumorale

Dans les conditions physiologiques, le système immunitaire surveille et élimine les cellules tumorales. C'est pourquoi les cellules cancéreuses ont développé des mécanismes pour échapper à la surveillance et la reconnaissance des cellules immunitaires. TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) est une cytokine assurant le bon fonctionnement immunitaire. TGF- $\beta$  a une fonction de suppresseur de tumeurs lorsque celles-ci sont encore en cours de développement et en phase précoce mais lorsque les cellules cancéreuses sont en stade avancé, TGF- $\beta$  stimule la prolifération et l'invasion de ces cellules. La protéine HuR se lie avec une grande affinité au 3'-UTR de l'ARNm *TGF- $\beta$* , le stabilise et aide à sa traduction (Nabors et al. 2001). La cytokine TGF- $\beta$  semble

participer à l'inhibition de la réponse immunitaire par les lymphocytes T cytotoxiques qui reconnaissent normalement des éléments du non-soi à la surface des cellules cancéreuses et libèrent des perforines qui perforent la membrane plasmique, entraînant une lyse des cellules (Beck et al. 2001). La kinase MKP-1 (*MAP kinase phosphatase 1*) déphosphoryle p38 et JNK, des kinases responsables de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. MKP-1 possède dans la région 3'-UTR de son ARNm une séquence ARE reconnue par HuR, l'ARNm est alors stabilisé avec une durée de demi-vie beaucoup plus longue, permettant une augmentation de production de la protéine MKP-1. Une fois surexprimée, la protéine MKP-1 peut déphosphoryler ses cibles, supprimant ainsi la réponse inflammatoire (Wang et Liu 2007). L'évasion de la surveillance par les cellules immunitaires est une étape cruciale pour la survie des cellules cancéreuses. De ce fait, de nombreuses thérapies se focalisent récemment sur ces mécanismes de surveillance et de réponse immunitaire en espérant les comprendre et les réactiver pour combattre les cellules cancéreuses.

#### IV.8.6 Les réponses aux traitements

Du fait de son importance dans le développement et la croissance de cellules cancéreuses, la protéine HuR semble être une bonne cible pour des traitements anti-cancéreux. D'une part, HuR peut rendre les cellules sensibles à certains traitements d'autre part, HuR participe également au phénomène de résistance qui est souvent observé après certains traitements comme les chimiothérapies. En général, la surexpression de HuR ou son accumulation dans le cytoplasme entraîne une stabilisation de ses ARNm cibles, conférant à la cellule un pouvoir de résistance. Par exemple, TUBB3 (*Tubulin beta 3 class III*) participe à la chimiorésistance aux traitements à base de taxanes comme le paclitaxel ou le docetaxel qui en bloquant la mitose, stabilisent les microtubules conduisant ainsi à l'apoptose des cellules cancéreuses.

TUBB3 est surexprimée dans un grand nombre de tumeurs répondant faiblement aux chimiothérapies. L'ARNm *TUBB3* possède un seul site de liaison dans sa partie 3'-UTR permettant sa reconnaissance par HuR qui l'emmène alors vers des polysomes libres pour amplifier sa traduction augmentant la présence de la protéine TUBB3 dans la cellule devenant alors résistante (Lee et al. 2007; Raspaglio et al. 2010). Concernant les traitements visant directement la protéine HuR, plusieurs stratégies sont possibles. La première consiste à inhiber son transport vers le cytoplasme bloquant HuR dans le noyau loin de ses ARNm cibles, la deuxième stratégie étant plus directe en ciblant la liaison de HuR à ses cibles et enfin la troisième permettant de moduler les niveaux d'expression de HuR. En ce qui concerne le transport de HuR, des molécules inhibitrices de la translocation ont été proposées. Il s'agit de MS-444 qui, en se liant principalement aux RRM1 et RRM2 de HuR, empêche son export dans le cytoplasme, inhibant ainsi ses fonctions de stabilisation d'ARNm. Cette molécule réduit ainsi la croissance des cellules cancéreuses, augmente l'apoptose et inhibe le phénomène d'angiogenèse (Blanco et al. 2016). Une autre molécule inhibant l'accumulation de HuR dans le cytoplasme se nomme pyrvinium pamoate. Cette molécule bloque les fonctions de HuR et permet également d'entraîner la mort cellulaire, en inhibant en amont le transport de HuR dans le cytoplasme en bloquant le cycle cellulaire lors d'un checkpoint de la phase G2. Pyrvinium pamoate possède un double rôle puisqu'elle active aussi des voies de signalisation responsables de l'import de HuR dans le noyau qui s'y retrouvant séquestré ne peut plus cibler et stabiliser les ARNm nécessaires pour la survie des cellules cancéreuses (Guo et al. 2016). Certains traitements influencent le niveau d'expression de la protéine HuR par l'intermédiaire de l'utilisation de petits ARN interférents siARN ou encore des miARN qui vont alors enclencher différentes voies de dégradation post-transcriptionnelles. Des études ont ainsi montré que la présence de miR-125a dans des cellules du cancer du sein diminue l'expression de HuR bloquant ensuite la croissance cellulaire, activant l'apoptose et limitant la migration cellulaire. La protéine HuR possède dans la région 3'-UTR de son ARNm une séquence partiellement complémentaire à miR-125a qui via la fixation de miRISC peut initier la dégradation de

l'ARNm *HuR* (Guo et al. 2009). Concernant les siARN, ils sont de plus en plus utilisés dans le traitement de cancers où ils sont transportés puis délivrés dans les cellules cancéreuses grâce à des nanovecteurs. Les nanovecteurs possèdent à leur surface des ligands reconnus par des récepteurs souvent surexprimés spécifiquement dans les cellules cancéreuses permettant l'entrée du siARN dans les cellules sélectionnées, réduisant les effets secondaires. Une fois délivré dans les cellules cibles, le siARN reconnaît spécifiquement sa séquence complémentaire dans l'ARNm *HuR*, entraînant son clivage et sa dégradation. Les cellules cancéreuses sont alors déficientes en HuR, le cycle cellulaire s'arrête en phase G1 et la croissance cellulaire ainsi que la migration et l'invasion sont inhibées (Muralidharan et al. 2017). Une autre stratégie de traitement contre les cancers consiste à perturber la liaison de HuR à ses cibles qui, pour la plupart, participent au développement de cellules cancéreuses. Une étude *in vitro* a montré que la petite molécule AZA-9 (*azaphilone-9*) se lie à HuR et inhibe son interaction avec les régions ARE, faisant de cette molécule un potentiel candidat aux traitements contre les cancers. (Kaur et al. 2017). Il en va de même pour la molécule KH-3, identifiée comme inhibitrice de l'interaction entre les RRM1 et 2 de HuR et ses ARNm cibles comme *Bcl-2* et *XIAP* (Wu et al. 2020). A travers les exemples choisis, cette partie résume l'importance de la protéine HuR et son rôle majeur dans le développement de cellules cancéreuses faisant de cette RBP une cible thérapeutique prometteuse.

## V. Micro-ARN-21 (miR-21)

### V.1 Biogénèse

miR-21 a été l'un des premiers miARN identifié comme oncogénique. Qualifié d'oncomiR, son expression est très souvent dérégulée dans un grand nombre de cancers. La séquence codant pour miR-21 se trouve sur le chromosome 17q23.2 dans le dixième intron du gène codant également pour la protéine transmembranaire 49

(TMEM49). Même si les deux gènes se chevauchent et qu'ils possèdent la même direction de transcription, le pri-miR-21 est transcrit indépendamment car il possède son propre promoteur (Rhim et al. 2022). La région promotrice putative très conservée de miR-21 (miPPR-21) se trouve 900 paires de base en amont de son site TSS (*Transcription Start Site*) impliquant l'intervention de facteurs d'initiation de la transcription recrutés sur les éléments d'amplification présents dans la séquence du promoteur. Il a été montré que la transcription de la séquence de miR-21 est activée ou réprimée en présence du facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein 1*) conjugué au facteur de transcription PU.1 de la famille Ets (*Erythroblast transformation specific*). Néanmoins, les sites de liaison d'autres facteurs de transcription ont été identifiés indiquant une régulation complexe de la transcription de miR-21 (Figure 18). Parmi ces facteurs, la famille NFI (*Nuclear factor I*) et C/EBP $\alpha$  (*CCAAT/enhancer-binding protein- $\alpha$* ) sont retrouvés. Les NFI sont souvent inhibiteurs de la transcription en modulant la structure des nucléosomes ou en entrant en concurrence avec d'autres facteurs pour le même site de liaison. Fait intéressant, un site de reconnaissance de miR-21 a été identifié dans la région 3'-UTR des ARNm *NFIB*. La surexpression de miR-21 entraîne une diminution du niveau d'expression de la protéine NFIB à la suite de l'inhibition de la traduction de l'ARNm *NFIB*. À l'inverse, une sous-expression de miR-21 conduit à l'activation de la traduction de *NFIB* et donc à l'augmentation du niveau d'expression de protéine NFIB qui, en se liant au site contenu dans le promoteur de miR-21, réprime sa transcription. NFIB est donc un régulateur négatif de miPPR-21. De plus, il a également été observé que le facteur C/EBP $\alpha$  agit aussi comme un régulateur négatif et que son action est cumulative à celle de NFIB dans le but de supprimer le niveau basal d'expression du gène *miR-21* (Fujita et al. 2008).

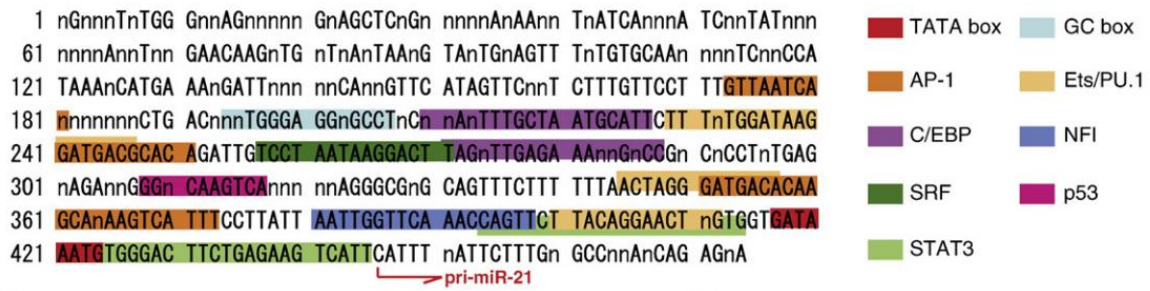


Figure 17.: Séquence de la région promotrice putative de miR-21 (issue de Fujita et al. 2008).

En plus d'être régulée au niveau de la transcription, la biogenèse des miARN peut aussi être régulée aux étapes de clivages mais aussi au moment de la translocation vers le cytoplasme, influençant le processus de maturation et donc *in fine* le niveau d'expression. Par exemple, en réponse à une stimulation par les facteurs de croissance TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) ou BMP4 (*Bone morphogenetic protein 4*), une augmentation de miR-21 mature est observée. Le niveau invariant de pri-miR-21 indique que la régulation d'expression est post-transcriptionnelle. En effet, TGF- $\beta$  interagit avec les récepteurs SMAD (homologie en référence à SMA "*small*" worm phenotype et MAD "*Mothers Against Decapentaplegic*") à la surface de la cellule, activant les protéines SMAD qui elles-mêmes interagissent avec DDX5 (*Dead box protein 5*), une hélicase à ARN. L'association de la protéine SMAD avec DDX5 est alors recrutée par le complexe microprocesseur Drosha, permettant un assemblage spécifique sur pri-miR-21. Une stimulation par TGF- $\beta$  induit spécifiquement la liaison entre pri-miR-21, Drosha et les protéines SMAD2 ou SMAD3 tandis qu'une stimulation par BMP4 fait intervenir SMAD1 (Davis et al. 2008). Il est à noter que des isomiRs de miR-21 ont été mis en évidence comme contribuant au développement et à la progression de certains cancers (Park et al. 2022) mais également que le brin passager miR-21-3p pouvait être fonctionnel et surexprimé dans des cellules cancéreuses résistantes à certains traitements (Zhang et al. 2022).

## V.2 Les fonctions de miR-21

miR-21 a été identifié dans des évènements liés au développement et la progression des cancers mais ce ne sont pas les seuls processus auxquels il peut contribuer. En effet, miR-21 intervient dans la régulation de processus développementaux et immunologiques mais également dans la fibrose pulmonaire et cardiaque. La grande implication de miR-21 à l'ensemble de ces processus, développés ci-dessous, permet de comprendre pourquoi miR-21 est la cible de beaucoup de traitements qu'ils soient pharmacologiques ou génétiques.

### V.2.1 Dans le développement embryonnaire

À la suite de la fertilisation, les embryons sont totalement dépendants des ARNm d'origine maternelle jusqu'à ce que leur propre machine transcriptionnelle soit opérative. Une fois que le génome embryonnaire est activé, l'ARNm maternel doit être dégradé ce qui fait intervenir des miARN exprimés pendant la phase précoce du développement. Plusieurs études ont démontré que miR-21 faisait partie de ces miARN exprimés dans les premières étapes du développement embryonnaire et pouvant peut-être participer à la dégradation des ARNm maternels (Chen et al. 2005; Ramachandra et al. 2008). Il semblerait aussi que miR-21 soit impliqué dans la pluripotence des cellules souches embryonnaires. En effet, lorsque les cellules souches embryonnaires de souris s'auto-renouvellent sans se différencier, le répresseur neuronal REST (*Repressor Element 1-silencing transcription factor*) est surexprimé, réprimant ainsi la transcription de plusieurs miARN dont miR-21. miR-21 ne peut alors plus exercer ses fonctions de répression sur ses ARNm cibles comme *Oct4* (octamer-binding transcription factor 4), *Nanog* (*Homeobox protein NANOG*), *Sox2* (*SRY-box transcription factor 2*) ou encore *c-Myc* qui sont des régulateurs critiques de l'autorenouveaulement



(Singh et al. 2008). A contrario, la perte d'expression de REST conduit à l'augmentation de la transcription de miR-21 pouvant ainsi réprimer les régulateurs d'autorenouveaulement et conduire à l'expression de marqueurs spécifiques à plusieurs lignées cellulaires pour initier la différenciation cellulaire. miR-21 est également impliqué dans le processus de morphogenèse ramifiée nécessaire à la formation et au développement des différents organes comme le cœur ou encore les poumons. Le facteur EGF (*Epidermal growth factor*) stimule la morphogenèse ramifiée en régulant positivement miR-21 dans les cellules du mésenchyme. miR-21 va alors à son tour réprimer deux ARNm cibles codant pour la protéine RECK (*Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*) inhibitrice de MMP ancrées à la membrane et la protéine PDCD4 (*Programmed Cell Death 4*) en partie responsable de l'apoptose. La répression de la protéine RECK permet l'activation des MMP qui vont alors dégrader la matrice extracellulaire laissant la place pour que les cellules épithéliales envahissent et se développent correctement, améliorant ainsi la morphogenèse ramifiée. En temps normal, PDCD4 a pour fonction d'inhiber AP-1 ainsi lorsque miR-21 inhibe PDCD4, AP-1 alors réactivé se lie au promoteur de miR-21 favorisant sa transcription. AP-1 interagit aussi avec le promoteur des MMP, augmentant l'expression de ces protéines conduisant à la dégradation de la matrice extracellulaire aidant ainsi la morphogenèse ramifiée (Hayashi et al. 2011). Ainsi miR-21 est important pour le développement embryonnaire et ce à différents stades plus ou moins avancés.

## V.2.2 Dans le système immunitaire

Le système immunitaire nécessite très souvent une activation ou une inhibition rapide, impliquant une régulation réactive et efficace de l'expression des ARNm générée en partie par l'action des miARN. Au cours de la réponse immunitaire, plusieurs cellules interviennent comme les lymphocytes T, qui en proliférant et en se développant,

passent de cellules T naïves à des cellules T effectrices responsables de la réponse immunitaire adaptative. Une fois le pathogène éliminé, les lymphocytes T effecteurs sont massivement détruits ou transformés en lymphocytes T mémoire. Les niveaux d'expression des protéines et des miARN dans ces trois types de lymphocytes T varient, reflétant les différentes fonctions de chaque cellule. miR-21 a été identifié dans le maintien de la phase effectrice des cellules T. En effet, son niveau d'expression est élevé dans les lymphocytes T effecteurs, diminué dans les lymphocytes T mémoire et très faible dans lymphocytes T naïfs (Wu et al. 2007). L'asthme est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par une diminution des fonctions respiratoires, une inflammation des voies respiratoires et un changement dans l'expression génique et protéique régulée en partie par les miARN. miR-21 est surexprimé lors d'un asthme expérimental induit par IL-13 (*Interleukin-13*) ou par des allergènes dans des cellules de lignées monocytes et macrophages. L'augmentation du niveau de miR-21 se répercute par une diminution du niveau de la cytokine IL-12 impliquée dans la réponse immunitaire adaptative par les lymphocytes Th1 (*T helper 1*) contre des bactéries intracellulaires. En effet, l'ARNm *IL-12p35* contient en son 3'-UTR une potentielle séquence cible de miR-21 qui, lors de sa liaison, inhibe la traduction de l'ARNm favorisant ainsi la réponse immunitaire faite par les lymphocytes Th2 contre des pathogènes extracellulaires (Lu et al. 2009). La régulation du niveau de miR-21 permet ainsi d'adapter la réponse immunitaire aux différents stress rencontrés.

### V.2.3 Dans la fibrose

À la suite d'une lésion, du tissu cicatriciel apparaît. La fibrose caractérise la production de tissu cicatriciel incontrôlée et amplifiée par les fibroblastes. Les fibroblastes sont des cellules majoritairement dérivées des cellules souches mésenchymateuses embryonnaires mais il arrive parfois qu'elles proviennent de cellules endothéliales ou

épithéliales ayant subi une transition EndMT (Endothélio-mésenchymateuse) ou EMT (Epithélio-mésenchymateuse). La cytokine TGF- $\beta$  est l'un des plus puissants inducteurs de ces deux transitions mésenchymateuses mais elle est également la première cytokine responsable de fibrose dans divers organes. Comme discuté précédemment (partie V.1), miR-21 est rapidement induit après un stimulus par TGF- $\beta$  ce qui suggère un potentiel rôle de miR-21 dans les fibroses. En conditions normales, le niveau d'expression de miR-21 dans les fibroblastes du myocarde est faible mais lorsque celui est défaillant, l'expression de miR-21 est élevée. Cette augmentation d'expression de miR-21 permet l'inhibition de *Spry1* (*Sprouty homologue 1*) une cible de miR-21, provoquant l'augmentation de l'activité d'ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), entraînant une fibrose interstitielle et une hypertrophie cardiaque (Thum et al. 2008). Bien que miR-21 soit impliqué dans des maladies cardiovasculaires en ayant un effet sur les fibroblastes du myocarde, l'origine de son augmentation d'expression reste encore à être identifiée. Il a été observé chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique une augmentation de miR-21 localisée dans les poumons et principalement dans les myofibroblastes. Encore une fois, miR-21, surexprimé en réponse à TGF- $\beta$ , se lie au 3'-UTR de l'ARNm *Smad7*, connu pour réguler négativement la fibrose pulmonaire, et l'inhibe, participant et amplifiant de ce fait le rôle profibrotique de TGF- $\beta$  (Liu et al. 2010). Des approches thérapeutiques dans le but de traiter les fibroses prennent pour cible miR-21 afin de réexprimer certains facteurs anti-fibrotiques (Chau et al. 2012).

#### V.2.4 Dans les cancers

miR-21 est un acteur majeur des processus liés au développement de cancers ce qui lui a valu la qualification d'oncomiR. En effet, il participe à la progression des cellules cancéreuses, à l'invasion ou encore à la croissance des tumeurs, conséquence d'un

ciblage fréquent de gènes dits suppresseurs de tumeurs. Du fait de son implication intensive dans les cancers, la partie suivante du manuscrit détaillera ses propriétés oncogéniques.

### V.3 Propriétés oncogènes

#### V.3.1 Expression de miR-21 dans les cancers

Dans un grand nombre d'études portant sur la dérégulation des miARN dans les cancers, miR-21 a été identifié comme l'un des miARN les plus dérégulés et donc potentiellement très important pour la carcinogenèse. La première étude ayant mis en lumière l'aberrante expression de miR-21 portait sur les glioblastomes, un cancer du cerveau rare qui se développe à partir des cellules gliales dont le rôle est d'assurer la conduction nerveuse et le bon fonctionnement des neurones. Cette étude a montré que la surexpression de miR-21 était en partie responsable de l'inhibition de l'apoptose et du phénotype malin (Chan et al. 2005). Dans une étude à grande échelle faite sur 540 échantillons de tissus humains, miR-21 est apparu comme étant l'un des rares miARN surexprimés dans tous les types de tumeurs solides analysés correspondant au cancer du côlon, des poumons, de l'estomac, du sein, de la prostate et du pancréas (Volinia et al. 2006). L'expression de miR-21 apparaît aussi très élevée dans les leucémies, un cancer « liquide » du sang caractérisé par la multiplication incontrôlée de cellules sanguines immatures (Fulci et al. 2007). Cette surexpression est aussi visible dans les lymphomes, des cancers apparaissant dans le système lymphatique et donc dans les cancers du système immunitaire caractérisés par la prolifération excessive des lymphocytes T ou B (Lawrie et al. 2007). De nombreuses études s'intéressent aux niveaux d'expression des miARN dans les cancers et toutes mettent en avant la surexpression de miR-21 dans la plupart des cancers où dans certains cas, miR-21 représente jusqu'à 25% du contenu cellulaire en miARN (Landgraf et al. 2007; Pan et

al. 2010; Fulci et al. 2007; Feng et al. 2011). Dans certains cancers, l'observation de l'amplification de la région chromosomique 17q qui contient le gène de miR-21 serait l'une des explications de la surexpression observée dans les cancers du sein par exemple (Wu et al. 2000). En ce qui concerne les cancers du col de l'utérus, la surexpression de miR-21 pourrait être due à la localisation du gène *miR-21* dans une région du chromosome dite fragile, propice aux cassures, qui se trouve être l'un des lieux d'intégration dans le génome humain du virus HPV16 (Thorland et al. 2003). L'intégration du génome viral dans le génome humain entraîne des altérations épigénétiques et génétiques pouvant donc être la cause de l'augmentation du niveau d'expression de miR-21 dans ce type de cancer. La surexpression de miR-21 peut aussi être liée à une augmentation de sa transcription. En effet, comme vu dans la partie V.1, celui-ci possède au sein de son promoteur des éléments d'amplification permettant de recruter des facteurs d'initiation de transcription comme AP-1 et STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) souvent contributeur du potentiel oncogénique des cellules. En se fixant à son récepteur à la surface de la membrane cellulaire, la cytokine IL-6 induit une voie de signalisation aboutissant à l'activation de STAT3 qui, à son tour, se fixe sur le promoteur du gène de miR-21 initiant sa transcription. L'augmentation de la sécrétion d'IL-6 entraîne alors la surexpression de miR-21 permettant aux cellules cancéreuses de proliférer et de survivre (Löffler et al. 2007). Il se peut aussi qu'une diminution du niveau des facteurs d'inhibition de la transcription comme C/EBP- $\alpha$  ou encore NFIB joue sur le niveau de transcription du gène de miR-21 permettant cette augmentation d'expression.

### V.3.2 Fonctions dans les cancers

miR-21 a été décrit, dans différents types cellulaires, comme facteur de survie anti-apoptotique. Du fait de sa participation à la progression cellulaire, l'invasion et à

la migration des cellules cancéreuses, miR-21 est devenu le plus représentatif des biomarqueurs de diagnostic des cancers.

#### Prolifération cellulaire :

Certaines cibles inhibées par miR-21 conduisent à l'augmentation de la prolifération cellulaire. Il s'agit des ARNm *PDCD4*, *SPRY2* (*Sprouty RTK signaling antagonist 2*), *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*) ou encore *RECK* (*Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*). Par exemple, miR-21 reconnaît *Spry2* dans sa région 3'-UTR entraînant sa dégradation et la diminution de son niveau protéique, conduisant à l'augmentation de la phosphorylation des protéines ERK1/2 et de PKB (*Protein kinase B*) impliquées dans des voies de signalisation responsables de la croissance et de la prolifération cellulaire (Zhao et al. 2018). Dans les cancers du poumon non à petites cellules, miR-21 surexprimé cible et inhibe l'ARNm *PDCD4* codant pour la protéine antitumorale *PDCD4* altérant ainsi la prolifération cellulaire (Yang et al. 2015).

#### Apoptose :

miR-21 cible directement plusieurs ARNm transcrits de gènes pro-apoptotiques tels que *Pdcd4*, *RhoB* (*Ras homolog gene family member B*) ou encore *Bcl-2* en diminuant leur niveau d'expression. miR-21 permet ainsi aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose et donc de survivre à la mort cellulaire (Hatley et al. 2010). Le suppresseur de tumeur p53 est au centre de plusieurs voies de signalisation comme la voie de réponse aux dommages de l'ADN pouvant amener à l'activation de l'apoptose. miR-21 inhibe l'expression de protéines responsables de l'activation de p53 comme *JMY* (*Junction Mediating And Regulatory Protein*) et *DAXX* (*Death domain-associated protein 6*) altérant alors la réponse de p53 aux différents stimuli, permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à la mort cellulaire (Papagiannakopoulos et al. 2008).

### Migration et invasion :

miR-21 est un miARN participant à l'invasion et au phénomène de métastase. Dans les conditions physiologiques, l'inhibiteur TIMP3 (*Tissue inhibitor metalloproteinase 3*) réduit l'activité des MMP, empêchant l'invasion métastatique. L'invasion accrue des cellules cancéreuses surexprimant miR-21 peut être en partie expliquée par le fait que l'ARNm *TIMP3* soit l'une de ses cibles, inhibant ainsi son effet sur le niveau des MMP pouvant alors dégrader la matrice extracellulaire et faciliter l'invasion et les métastases (Martin del Campo et al. 2015). L'ARNm codant pour la protéine TPM1 (*Tropomyosin 1*), connue pour supprimer le phénotype malin des cancers, possède dans sa région 3'-UTR un site de liaison à miR-21 qui le régule négativement en inhibant sa traduction. En réduisant ainsi le niveau d'expression de TPM1, miR-21 participe à la migration des tumeurs vers un nouveau site dans le corps (Zhu et al. 2007).

### Chimiorésistance :

La chimiorésistance est un obstacle majeur au traitement et à la guérison des patients atteints de cancers, c'est pourquoi il est important de comprendre les processus enclenchés lors de cette résistance. miR-21 semble aider les cellules cancéreuses à développer une résistance particulière à certains traitements ou tout du moins à les rendre moins efficaces. Dans certains cancers du sein, insensibles au traitement par doxorubicine, miR-21 est surexprimé, entraînant une baisse du niveau d'expression de PTEN. La sensibilité au traitement est retrouvée lorsque miR-21 est inhibé ou PTEN surexprimée, montrant l'effet de miR-21 sur la chimiorésistance (Wang et al. 2011). La surexpression de miR-21 entraîne l'inhibition de beaucoup de voies pro-apoptotiques nécessaires lors de traitements chimiothérapeutiques. miR-21 confère alors indirectement un pouvoir résistant aux cellules cancéreuses limitant l'efficacité de certaines thérapies.

### V.3.3 Un biomarqueur potentiel ?

Les miARN sont détectables dans le sérum et le plasma, rendant leur utilisation en tant que biomarqueurs possible. miR-21 est un oncomiR impliqué dans de nombreux processus tumoraux. Du fait de sa surexpression dans un grand nombre de cancers, miR-21 est devenu un biomarqueur de diagnostic et de pronostic comme dans le cas de métastases leptoméningées. Ces métastases, logées dans les tissus cérébraux, sont la conséquence d'adénocarcinomes difficiles à diagnostiquer. À la suite d'un traitement par chimiothérapie, l'analyse du liquide-céphalorachidien d'une cohorte de patient a révélé la présence en excès de miR-21 qui pourrait servir de biomarqueur de mauvais pronostics (Lee et al. 2020). Une étude à grande échelle a été menée afin d'observer l'impact de la surexpression de miR-21 sur le pronostic vital de patients atteints de différents types de cancers. Une méta-analyse, regroupant et comparant les données de 63 articles différents, a mis en évidence une corrélation entre la surexpression de miR-21 et l'établissement de pronostics médiocres, faisant de miR-21 un bon candidat de prédiction de survie des patients (Zhou et al. 2014). Malheureusement, miR-21 est surexprimé dans un grand nombre de maladies, le rendant alors non spécifique et certainement inutilisable comme biomarqueur (Jenike et Halushka 2021).

### V.3.4 Une cible thérapeutique

miR-21 reste néanmoins une cible thérapeutique très attrayante du fait de ses fonctions diverses dans le développement et la progression tumorale. L'idée d'une inhibition séquence-spécifique de miR-21 permettrait de réajuster l'expression de plusieurs protéines dérégulées et de rendre les cellules cancéreuses sensibles à la chimiothérapie ou l'immunothérapie. Les cellules de certains cancers du sein



résistantes à la chimiothérapie au Taxol deviennent moins invasives lorsque traitées avec un anti-miR-21. Il a été montré que ces cellules entrent alors en apoptose réduisant d'environ 50% la masse tumorale (Mei et al. 2010). Dans le cancer du pancréas, miR-21 est surexprimé dès les premiers stades de la maladie. Un traitement régulant négativement miR-21 permet l'arrêt de la progression des cellules cancéreuses dans le pancréas, entraînant leur mort par réactivation de la voie apoptotique mitochondriale. Cumulé à un traitement chimiothérapique, l'effet est encore plus drastique, donnant un espoir de cure pour ce cancer très agressif (Sicard et al. 2013). Finalement, l'administration à des souris d'un nouvel oligonucléotide antisens de miR-21 chimiquement modifié MKAD-21 a permis de bloquer la croissance cellulaire du cancer de la vessie (Koutsoumpa et al. 2018). Néanmoins, les études illustrant miR-21 comme potentielle cible thérapeutique sont le résultat d'expériences *in cellulo* et *in vivo*, aucune étude clinique sur l'homme n'ayant pu confirmer ces conclusions.

## VI. Interaction fonctionnelle entre HuR et miR-21 dans les cancers

Comme montré précédemment dans ce manuscrit, la protéine HuR et miR-21 semblent être deux régulateurs importants dans le développement de cellules cancéreuses. Plus intéressant encore, il existe même une interaction fonctionnelle entre ces deux acteurs majeurs impactant la traduction de PDCD4. Dans les cellules non cancéreuses, la balance entre tumorigenèse et inflammation est maintenue en partie par le gène suppresseur de tumeur *Pdcd4*. L'expression de PDCD4 est contrôlée transcriptionnellement mais aussi post-transcriptionnellement par des mécanismes influant sur le niveau de traduction et sur la stabilité de l'ARNm. miR-21 inhibe la traduction de l'ARNm *PDCD4* en se liant par complémentarité à sa séquence cible dans la région 3'-UTR de l'ARNm entre les nucléotides 228 et 249. En inhibant la traduction

de *PDCD4*, miR-21 participe au processus tumoral induisant la transformation et la croissance cellulaire, l'invasion, la formation de métastases ainsi que leur migration mais participe également à l'inhibition de l'apoptose (Asangani et al. 2008; Lu et al. 2008; Frankel et al. 2008). Dans sa région 3'-UTR, *PDCD4* possède aussi deux séquences ARE reconnues par HuR, la première se trouve en amont du site de liaison de miR-21 tandis que la deuxième a été observée en aval. La liaison de HuR sur *PDCD4* conduit, à l'inverse de miR-21, à la réactivation de la traduction de *PDCD4*, permettant aux cellules d'activer l'arrêt de la croissance cellulaire et d'initier l'apoptose (Poria et al. 2016a). Dans le cas présent, un niveau de régulation double est observé du fait de la proximité existante entre les sites de liaison de HuR et miR-21 à *PDCD4*. En effet, lors de sa surexpression dans le cytoplasme, miR-21, via le complexe RISC, se lie à *PDCD4*, inhibant la traduction et empêchant également l'interaction de HuR avec les ARE cibles. À l'inverse, une surexpression de HuR dans le cytoplasme, résultant de l'induction de stress sur la cellule, favorise sa liaison à l'ARNm *PDCD4*, conduisant à un changement conformationnel dans la partie 3'-UTR de *PDCD4*, entraînant la dissociation du complexe miR-21-RISC. La dissociation de miR-21, à la suite de l'accroche de HuR, réactive la traduction de l'ARNm *PDCD4* (figure 19). La régulation de l'expression de *PDCD4* est ainsi orchestrée par une interaction antagoniste entre miR-21 et la protéine HuR, illustrant un modèle de compétition entre un miARN et une RBP (partie III.1). Cependant, l'étude de ce mécanisme a permis de mettre en évidence un niveau de régulation supplémentaire impliquant une interaction directe entre HuR et miR-21.

En effet, il a été montré que, même lorsque l'interaction directe de HuR avec *PDCD4* est impossible, la traduction de *PDCD4* reste active. miR-21 possède une séquence nucléotidique riche en ARE, pouvant être directement ciblée par HuR. En effet, en réponse à un stimulus inflammatoire, HuR est transloquée du noyau vers le cytoplasme pour se lier directement à miR-21 inhibant la répression de la traduction du gène *PDCD4* (figure 19). Il semble important de noter que la protéine HuR se lie seulement

à miR-21 mature et non aux différents précurseurs, montrant que cette liaison n'influence pas le phénomène de maturation du miARN mais qu'il le séquestre dans le but d'inhiber ses fonctions cellulaires (Poria et al. 2016a).

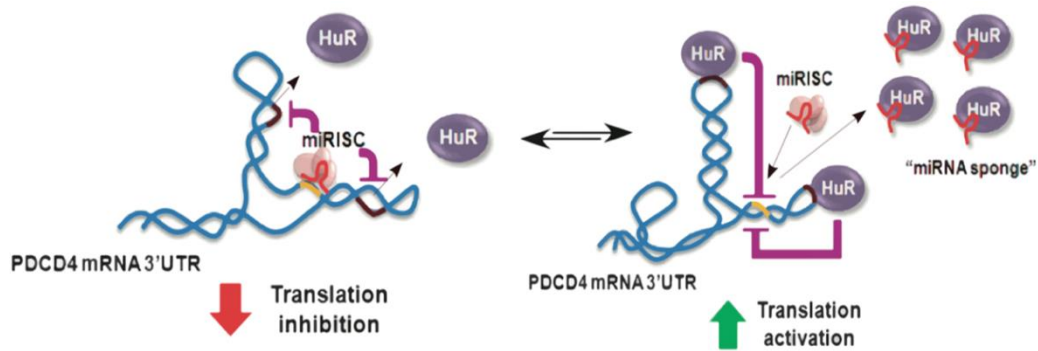


Figure 18 : Mécanisme de l'équilibre dynamique entre miR 21, HuR et l'ARNm PDCD4 ainsi que de la fonction éponge de HuR d'après (Poria et al. 2016).

Cette étude de l'interaction entre miR-21 et HuR a permis de découvrir pour la première fois le mécanisme complexe de séquestration d'un miARN par une RBP. Le caractère anti-miR de HuR ne se limite probablement pas à miR-21, ainsi d'autres miARN pourraient être séquestrés par HuR, révélant un nouveau mode de régulation post-transcriptionnelle des gènes. Le développement de thérapies capables de cibler ce phénomène de séquestration par HuR n'est possible qu'à travers l'élucidation de la relation structure-fonction. En effet, il est nécessaire de déterminer les signatures structurales conduisant à la formation de ce type de complexe pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et peut-être un jour pouvoir trouver des molécules capables de les moduler spécifiquement.

## OBJECTIFS

---

La première partie introductive de ce manuscrit a permis de mettre en lumière l'importance de deux acteurs majeurs dans la régulation post-transcriptionnelle, les RBP et les miARN. Des dérégulations dans leurs niveaux d'expression ou dans leurs fonctions respectives conduisent bien souvent à des maladies telles que le cancer confirmant l'intérêt qui leur est porté. Plus intéressant encore, des interactions fonctionnelles entre ces deux régulateurs clés ont été identifiées ajoutant un nouveau degré de complexité dans la régulation post-transcriptionnelle. Ces mécanismes d'interactions directes semblent importants pour la régulation d'un grand nombre d'ARNm cependant très peu de détails mécanistiques liés à leur action combinatoire sont retrouvés dans la littérature. Par conséquent, ce travail de thèse a consisté à élucider les signatures structurales conduisant à la reconnaissance spécifique entre RBP et miARN dans les cancers en prenant comme modèle l'interaction directe entre la protéine HuR et le miARN oncogène miR-21.

HuR est une RBP constituée de 3 RRM dont les deux premiers sont connus pour se lier aux régions ARE des ARN. Pour comprendre la liaison de HuR à miR-21, des expériences *in vitro*, utilisant la RMN comme outil d'investigation majeur, ont été effectuées sur le complexe HuR : ADN-21, l'homologue ADN de miR-21. Le premier objectif de cette thèse s'est focalisé sur l'étude d'une forme tronquée de HuR constituée du tandem RRM1-2 dans le but de déterminer s'il existait des éléments structuraux dans HuR ou ADN-21 capables d'expliquer leur spécificité d'interaction. Des expériences ont été menées afin d'identifier si des résidus d'acides aminés de HuR étaient spécifiquement impliqués dans la reconnaissance d'ADN-21. De la même façon, l'étude de ce complexe a aussi amené à la recherche de nucléotides particuliers sur ADN-21 qui seraient reconnus par HuR lors de sa liaison. L'utilisation d'une série de mutants d'ADN-21 complexés au tandem RRM1-2 a été testée par RMN et ITC afin de comprendre l'établissement des RRM1 et 2, *i.e.* leur recrutement, le long de la direction 5'-3' de l'oligonucléotide mais également de déterminer la stœchiométrie du complexe

formé, compte-tenu de la tendance de HuR à la multimérisation.

Le deuxième objectif de cette thèse a été consacré à l'étude de HuR dans sa forme pleine longueur permettant une analyse de l'interaction HuR : ADN-21 plus proche des conditions natives, conservant l'intégrité physiologique du complexe. Les objectifs de cette étude ont été dans un premier temps de confirmer que la troncation du fragment constitué du tandem RRM1-2, bien plus soluble, n'engendrait pas de perturbations structurales et que les mêmes résidus d'acides aminés étaient recrutés lors de l'accroche de HuR-FL à ADN-21. Dans un second temps, l'étude de la protéine pleine longueur HuR-FL complexée à ADN-21 a permis d'essayer de répondre aux questionnements concernant l'implication possible de RRM3 dans la formation du complexe HuR : ADN-21.

Sur la base de l'ensemble des résultats *in vitro* obtenus, l'objectif final du travail présenté a consisté à étudier dans un contexte cellulaire l'effet de mutations ponctuelles de résidus d'acides aminés de HuR pouvant être impliqués dans différentes interactions protéine-protéine critiques pour la formation, le maintien et la fonctionnalité du complexe HuR : miR-21.

## MATERIELS ET METHODES

---

### I. Préparation des plasmides et clonages

#### I.1 Pour la biochimie (RMN et ITC)

Pour les expériences de biochimie nécessitant la préparation de protéines pures à homogénéité, trois constructions ont été utilisées. La première construction contient la séquence codant pour HuR pleine longueur (HuR-FL ; M1-K326), la deuxième code pour le tandem RRM1 et 2 de HuR (RRM1-2 ; M1-N188) et la troisième construction correspond à la séquence du RRM3 de la protéine (RRM3 ; S241-K326). Le gène codant pour HuR-FL a été inséré dans le plasmide pET28a entre les sites de restriction EcoRI et HindIII. Ce plasmide est caractérisé par la présence d'une étiquette poly-histidine en aval du site de clonage multiple, nécessaire à la purification de la protéine. Les sites de restriction NdeI et XhoI ont été ajoutés aux extrémités de la séquence nucléotidique codant pour RRM1-2 dans le but d'insérer cette dernière par ligation dans le plasmide pET28b, possédant également en amont du site de clonage multiple une séquence nucléotidique codant pour une étiquette poly-histidine. En aval de cette étiquette, la séquence nucléotidique codant pour le site de reconnaissance de la protéase TEV (*Tobacco Etch Virus*) a été insérée dans le but de retirer l'étiquette poly-histidine au moment de la purification de la protéine RRM1-2. La séquence nucléotidique codant pour RRM3 a été amplifiée par PCR et clonée dans le vecteur d'expression pET-22b à l'aide d'amorces appropriées (Tableau 1). Ce plasmide inclut une étiquette poly-histidine à l'extrémité C-terminale de la séquence d'acides aminés des protéines.

Domaine	Type d'amorce	Séquences nucléotidiques des amorces (5'→3')
RRM3	Sens	GCGCA/TATGTCCTCCGGCTGGTGCATTTTC
	Anti-sens	CGCC/TCGAGTTTGTGGGACTTGTGGTTTTG

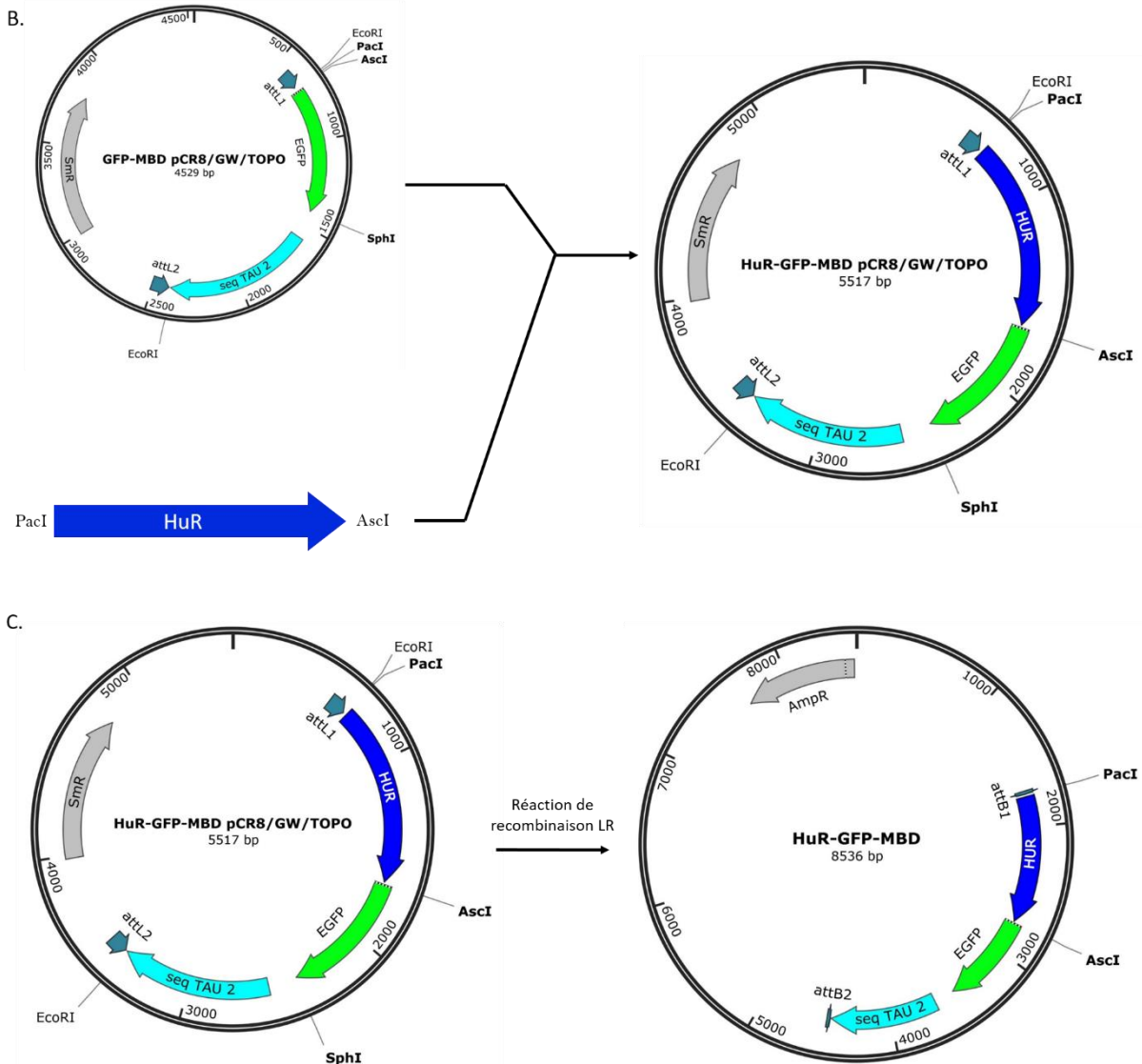
Tableau 1 : Amorces utilisées pour le clonage de HuR-RRM3.

## I.2 Pour la technologie Microtubule Bench

Les différents plasmides contenant des gènes chimériques codant pour HuR-FL fusionnée avec la GFP (*Green fluorescent protein*) / ou la RFP (*Red fluorescent protein*) et le domaine de liaison aux microtubules, appelé MBD (*Microtubule binding domain*) de la protéine Tau (*Tubulin-associated unit*) ont été obtenus comme décrit précédemment par Boca et al. 2015 et Maucuer et al. 2018 (Figure 19.A). Brièvement, le gène *hur* a été cloné dans un plasmide d'entrée pCR8/GW/TOPO (Invitrogen™) hébergeant déjà le gène *gfp-mbd* ou *rfp-mbd* (Figure 19.B). Les cassettes *hur – gfp-mbd* ou *hur – rfp-mbd* ont ensuite été clonées dans le plasmide d'expression Gateway® pEF-Dest51 (Invitrogen™) en utilisant le kit Gateway LR clonase II (Invitrogen™) selon le protocole du fabricant, dans le but d'obtenir un plasmide capable de s'exprimer dans des cellules eucaryotes et de générer des protéines chimériques HuR- GFP-MBD ou HuR-RFP-MBD (Figure 19.C), dont la localisation peut être observée et quantifiée par fluorescence.

A.





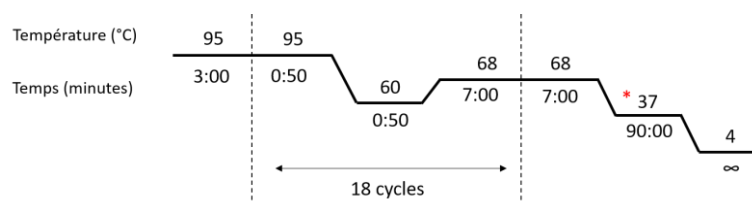
**Figure 19:** Etapes de préparation du plasmide HuR-GFP-MBD en utilisant la stratégie Gateway. A : Schéma de la protéine chimérique finale contenant la protéine HuR-FL fusionnée à la GFP et au MBD. B : Insertion de la séquence codant pour le gène *hur* (en bleu) dans le plasmide d'entrée GFP-MBD-pCR8/GW/TOPO. B : Insertion de la cassette *hur-gfp-mbd* dans le plasmide Gateway® pEF-Dest51 par réaction de recombinaison LR. Les séquences AmpR ou SmrR (en gris) correspondent au marqueur de sélection (Ampicilline ou Spectinomycine).

### I.3 Mutations du gène *hur*

Des mutants de la protéine RRM1-2, HuR-FL et HuR-FL-GFP-MBD ont été



généérés par mutagenèse dirigée en utilisant des amorces synthétiques portant la mutation souhaitée (Tableau 2). Les mutations ont été introduites par PCR (*Polymerase chain reaction*) suivant le programme indiqué sur la Figure 20. Pour cela, un mélange réactionnel a été préparé contenant : 1 µL de plasmide (50 ng/µL), 2 µL du mix d'amorce, 1 µL de dNTP (Désoxyribonucléotide triphosphate) (10 mM), 5 µL de tampon GC 5x, 1 µL de DMSO (Diméthylsulfoxyde), 1 µL d'ADN polymérase haute-fidélité Phusion (Thermo Scientific™) et 14 µL d'eau stérile. Dans le but d'éliminer les plasmides n'ayant pas subi de PCR (plasmides parents), 1 µL d'enzyme de restriction DpnI a été ajouté après les cycles d'amplification. L'enzyme de restriction DpnI coupe au niveau de site de méthylation se trouvant seulement sur les plasmides parents laissant les plasmides nouvellement synthétisés par PCR intacts. Pour s'assurer du bon déroulement de la PCR, les produits de celle-ci ont été introduits sur gel d'agarose 1% avec du BET (Bromure d'éthidium). Après vérification de la présence sur le gel de bandes correspondant au plasmide amplifié par PCR, une transformation de bactéries compétentes *E. coli* TOP10 a été réalisée dans le but d'introduire le plasmide généré. Les plasmides ont ensuite été isolés et purifiés des colonies de bactérie obtenues après croissance sur boîte de Pétri pendant la nuit à 37°C. La purification des plasmides a été effectuée en suivant les différentes étapes du kit de purification d'ADN de Macherey-Nagel (NucleoSpin® Plasmid). Les différentes mutations introduites ont été vérifiées par séquençage de l'ADN en utilisant une amorce T7 de séquence 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (Eurofins Genomics).



**Figure 20 :** Programme PCR utilisé pour générer les mutants de HuR. L'étoile rouge indique l'ajout de l'enzyme de restriction DpnI avant l'étape à 37°C.

<b>Mutation</b>	<b>Types d'amorce</b>	<b>Séquences nucléotidiques des amorces (5' -&gt;3')</b>	<b>Plasmide</b>
C13A	Sens	CACATGGCCGAAGACGCCAGGGGTGACATCGG	pET28b-RRM1-2
	Anti-sens	CCGATGTCACCCCTGGCGTCTTCGGCCATGTG	
N21C	Sens	CATCGGGGAGAACGTGTTTGATCGTCAACTACC	pET28b-RRM1-2-C13A
	Anti-sens	GGTAGTTGACGATCAAACACGTTCTCCCGATG	
T32A	Sens	CTCAGAACATGGCCAGGATGAGTTAC	HuR-GFP-MBD
	Anti-sens	GTAATCATCCTGGCCATGTTCTGAG	
D34C	Sens	CAGAACATGACCCAGTGTGAGTTACGAAGCCTG	pET28b-RRM1-2-C13A
	Anti-sens	CAGGCTTCGTAACACACTGGGTCATGTTCTG	
E45A	Sens	CAGCAGCATTGGTGCAGTTGAATCTGCAAAAC	HuR-GFP-MBD
	Anti-sens	GTTTTGCAGATTCAACTGCACCAATGCTGCTG	
E47A	Sens	GCATTGGTGAAGTTGCATCTGCAAACTTATTC	HuR-GFP-MBD
	Anti-sens	GAATAAGTTTTGCAGATGCAACTTCACCAATGC	
Y63A	Sens	CACAGCTTGGGCGCCGGCTTTGTGAAC	HuR-GFP-MBD
	Anti-sens	G TTCACAAAGCCGGCGCCCAAGCTGTG	
K72A	Sens	CGTGACCGCGGCGGATGCAGAGAG	HuR-GFP-MBD
	Anti-sens	CTCTCTGCATCCGCCGCGGTACG	
L138C	Sens	CAACTCGCGGGTCTGCGTGGATCAGACTAC	pET28b-RRM1-2-C13A
	Anti-sens	GTAGTCTGATCCACGCAGACCCGCGAGTTG	
K182A	Sens	GAGCCCATCACAGTGGCGTTTGACGCCAACCCC	HuR-GFP-MBD
	Anti-sens	GGGGTTGGCTGCAAACGCCACTGTGATGGGCTC	
K182E	Sens	CCATCACAGTGGAGTTTGACGCCAAC	HuR-GFP-MBD
	Anti-sens	GTTGGCTGCAAACCTCACTGTGATGG	
K182R	Sens	GAGCCCATCACAGTGGCGTTTGACGCCAACCCC	HuR-GFP-MBD
	Anti-sens	GGGGTTGGCTGCAAACCTCACTGTGATGGGCTC	
K182R	Sens	GCCCATCACAGTGGAGTTTGACGCCAAC	HuR-GFP-MBD
	Anti-sens	GGTTGGCTGCAAACCTCACTGTGATGGGC	

F183A	Sens	CCCATCACAGTGAAGGCAGCAGCCAACCC	HuR-GFP-MBD
	Anti-sens	GGGTTGGCTGCTGCCTTCACTGTGATGGG	
A184C	Sens	CATCACAGTGAAGTTTTGTGCCAACCCCAAC	pET28b-RRM1-2-C13A
	Anti-sens	GTTGGGGTTGGCACAAAACCTCACTGTGATG	
N188A	Sens	CAGCCAACCCCGCCAGAACAAAAACG	HuR-GFP-MBD
	Anti-sens	CGTTTTTGTCTGGGCGGGTTGGCTG	
W261E	Sens	GACGAGGGGATCCTCGAGCAGATGTTTGGGCCG	HuR-GFP-MBD ; pET28a-HuR-FL
	Anti-sens	CGGCCCAAACATCTGCTCGAGGATCCCCTCGTC	

Tableau 2 : Amorces utilisées pour générer les mutants de HuR.

## II. Méthodes de biochimie

### II.1 Production et purification de protéine

Durant cette thèse, la protéine HuR-FL ainsi que des fragments de celle-ci (RRM1-2 et RRM3) ont été produits et purifiés. De plus, sur la base de résultats obtenus par une approche intégrative en biologie structurale et cellulaire, des mutants de ces trois protéines ont également été produits. Pour la protéine HuR-FL, le mutant HuR-FL-W261E a été obtenu. Pour le fragment HuR-RRM1-2, les mutants RRM1-2-C13A-N21C, RRM1-2-C13A-D34C, RRM1-2-C13A-L138C et RRM1-2-C13A-A184C ont été préparés.

#### II.1.1 Protéines utilisées en RMN

Pour les expériences de RMN (*Résonance magnétique nucléaire*), les protéines ont été surexprimées chez *E. coli* BL21(DE3). Pour détailler, des bactéries compétentes en phase exponentielle ont été transformées avec 75 ng de la construction plasmidique, citée

précédemment, par choc thermique à 42°C. Ensuite, 5 mL de milieu LB (*Lysogeny broth*) supplémenté avec de la Kanamycine (50 µg/mL) ont été inoculés avec une colonie de bactérie et mis en incubation à 37°C toute la journée avec agitation. 200 µL de ce pré-inoculum ont été prélevés pour inoculer 25 mL de milieu MM (Minimum M9) (Tableau 3) supplémenté avec <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl (Chlorure d'ammonium marqué au <sup>15</sup>N) et 50 µg/mL de Kanamycine. L'inoculum a été incubé dans les mêmes conditions toute la nuit. Finalement, 1 L de MM a été inoculé avec la totalité de l'inoculum précédent et mis en incubation dans les mêmes conditions. Lorsque la culture bactérienne a atteint une densité optique de 0,7, une concentration finale d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) à 1 mM a été ajoutée et l'incubation a été poursuivie pendant 3 heures à 37°C en agitation. Les bactéries ont ensuite été récoltées par centrifugation à 4000g pendant 30 minutes puis lavées dans 30 mL de tampon A (Tableau 3). Le culot bactérien a été resuspendu dans 20 mL de tampon B (Tableau 3). La lyse cellulaire a été effectuée par sonication (Bioblock Vibracell sonicator, model 72412) en appliquant des cycles de 4 secondes suivis de 15 secondes de repos, le tout pendant 30 minutes dans la glace. La suspension résultante a été centrifugée à 70 000xg pendant 30 minutes à 6°C dans une ultracentrifugeuse (Optima™ MAX Ultracentrifuge BECKMAN). Le surnageant a ensuite été incubé à 4°C toute la nuit dans 3 mL de résine Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose (Qiagen) préalablement équilibrée dans du tampon B supplémenté de 5 mM d'Imidazole dans le but de purifier la protéine par chromatographie d'affinité aux métaux IMAC (*Immobilized metal affinity chromatography*). Après avoir élué la fraction de protéines non liées aux billes, des lavages extensifs ont été appliqués à la résine en utilisant le tampon B et un gradient de concentrations croissantes d'Imidazole (5 à 40 mM). Finalement, l'élué de la protéine a été réalisé en appliquant un gradient en Imidazole allant de 75 à 250 mM dans 20 mL tampon C (Tableau 3), en collectant des fractions de 2 mL. La séparation de protéines et la visualisation des étapes de purification ont été effectuées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (10% pour HuR-FL, 12% pour RRM1-2 et 15% pour RRM3) en conditions dénaturantes SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) à 130 V dans un tampon

d'électrophorèse (Tableau 3). Dans le cas de la purification du fragment HuR-RRM1-2 et de ses différents mutants, une étape de purification supplémentaire a été ajoutée dans le but d'enlever l'étiquette poly-histidine située à l'extrémité N-terminale. Pour cela, les fractions éluées ont été incubées avec 15 µg de la protéase TEV, 1 mM de DTT (Dithiothréitol) et 1 mM d'EDTA (Acide édétique). L'endoprotéolyse a été réalisée en agitation pendant 16 heures à température ambiante. Après digestion et afin de retirer l'Imidazole et l'EDTA, les échantillons ont été chargés sur une colonne Sephadex PD-10 (GE Healthcare) suivant les recommandations du fabricant. Dans l'étape suivante, une deuxième IMAC a été appliquée pour adsorber la protéase TEV et l'étiquette poly-histidine. Pour cela, 3 passages par gravité des fractions concernées ont été réalisés pour ensuite charger les échantillons sur colonne PD-10 et ainsi dialyser les protéines contre le tampon D (Tableau 3) pour RRM1-2 ou dans le tampon E (Tableau 3) pour HuR-FL, RRM-3 et RRM1-2(MOPS).

Nom du tampon	Composition
Milieu Minimum M9 (MM)	H <sub>2</sub> O; solution "SBM" (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; NaCl); solution "S" (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ); solution "O" (MgCl <sub>2</sub> ; FeCl <sub>2</sub> ); mix de vitamines; thiamine 2mg/L; <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl 0,1%; glucose 0,35%
Tampon A	Tris-HCl 25 mM, KCl 100 mM, pH 7,4
Tampon B	Tris-HCl, 25 mM, KCl 2 M, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, cocktail d'inhibiteurs de protéases, pH 7,5
Tampon C	Tris-HCl 25 mM, KCl 200 mM et DTT 1 mM, 7,5
Tampon électrophorèse	Tris Base 25 mM, Glycine 200 mM, 10% SDS
Tampon D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7,5 mM, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7,5 mM, KCl 25 mM, DTT 1 mM pH 6,8
Tampon E	MOPS 30 mM, KCl 200 mM, DTT 1 mM, Glycérol 10%, pH 7,0
Tampon F	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7,5 mM, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7,5 mM, KCl 25 mM, pH 6,8

Tableau 3 : Composition des différents tampons.

## II.1.2 Protéines utilisées en ITC

Pour les expériences de titration calorimétrique isotherme ITC (*Isothermal titration calorimetry*), les protéines concernées ont été surexprimées dans du milieu 2xYT supplémenté à la Kanamycine (50 µg/mL). La production, la purification et la dialyse ont été réalisées comme décrit ci-dessus. Cependant, le DTT étant un agent réducteur dont la demi-vie diminue drastiquement à pH supérieur à 6,5 et à des températures supérieures à 20°C, les échantillons de protéines ont été préparés dans du tampon D ou E contenant du TCEP (tris(2-carboxyéthyl)phosphine) 1 mM afin de limiter les perturbations thermiques occasionnées par la dégradation du DTT, pouvant altérer les profils calorimétriques.

## II.1.3 Protéines pour les expériences RMN PRE

Quatre mutants du fragment HuR-RRM1-2 ont été générés pour des études RMN PRE (*Paramagnetic relaxation enhancement*): RRM1-2-C13A-N21C, RRM1-2-C13A-D34C, RRM1-2-C13A-L138C et RRM1-2-C13A-A184C à partir d'un mutant "mère" RRM1-2-C13A dans lequel le résidu Cystéine en position 13 a été remplacé par un résidu d'Alanine. L'étape suivante a consisté au greffage d'une sonde paramagnétique MTSL (de formule S-(1-oxyl-2,2,5,5-tetraméthyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl) méthyl methanesulfonothioate) après s'être assuré par RMN que les mutations n'engendraient aucune modification structurale. Le MTSL est greffé sur les résidus de Cystéines dont les groupements thiols de leur chaîne latérale préalablement réduits permettent la formation d'une liaison hétérodisulfure entre le MTSL et la fonction thiol (Figure 21). En pratique, 10 mM de DTT ont été ajoutés au mutant d'intérêt (2 mg/mL). La solution a été incubée pendant une heure à température ambiante pour ensuite charger le mélange réactionnel sur une colonne PD-10 afin

d'enlever le DTT par dialyse contre le tampon F (Tableau 3). L'élution de la protéine a été faite par fractions de 1mL dans le but de récolter seulement les fractions appartenant au pic d'élution. Le MTSL a été ajouté à une concentration finale 10 fois supérieure à la concentration de la protéine. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 2 heures puis à 4°C toute la nuit dans l'obscurité. Finalement, une seconde dialyse sur colonne PD-10 a été appliquée contre le tampon F afin de retirer l'excès de MTSL.

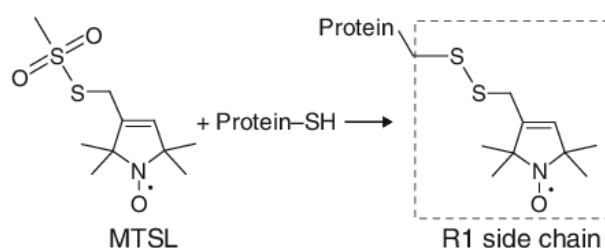


Figure 21 : Réaction chimique conduisant au greffage du MTSL sur la fonction thiol d'une Cystéine (issu de (Fawzi et al. 2011)).

## II.2 Oligonucléotides utilisés en ITC et RMN

Les oligonucléotides ADN utilisés au cours des expériences RMN et ITC ont été synthétisés par Eurofins Genomics et miR-21 par Eurogentec. Leurs séquences nucléotidiques sont indiquées dans le Tableau 4.

Oligonucléotides	Séquences (5' ->3')	Techniques <i>in vitro</i>
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	RMN
ADN21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	ITC/RMN
ADN-CG1	TAGCTTATCAGACTGACGCGGA	ITC
ADN-CG2	TAGCGCGCAGACTGATGTTGA	

ADN-CG3	TAGCCGCGCAGACCGCGGTTGA	
ADN-6 (6nt)	TAG CTT	RMN
ADN-8 (8nt)	TAG CTT AT	
ADN-10 (10nt)	TAG CTT ATC A	
ADN-11 (12 nt)	GAC TGA TGT TGA	
ADN-12 (12nt)	TAG CTT ATC AGA	ITC/RMN
ADN-14 (14nt)	TAG CTT ATC AGA CT	
ADN-16 (16nt)	TAG CTT ATC AGA CTG A	
ADN-18 (18nt)	TAG CTT ATC AGA CTG ATG	
ADN-20 (20nt)	TAG CTT ATC AGA CTG ATG TT	
ADN-T1G	GAGCTTATCAGACTGATGTTGA	
ADN-A2C	TCGCTTATCAGACTGATGTTGA	
ADN-G3C	TACCTTATCAGACTGATGTTGA	
ADN-C4G	TAGGTTATCAGACTGATGTTGA	
ADN-T5G	TAGCGTATCAGACTGATGTTGA	
ADN-T6C	TAGCTCATCAGACTGATGTTGA	
ADN-A7C	TAGCTTCTCAGACTGATGTTGA	
ADN-T8C	TAGCTTACCAGACTGATGTTGA	
ADN-C9G	TAGCTTATGAGACTGATGTTGA	
ADN-A10C	TAGCTTATCCGACTGATGTTGA	
ADN-G11C	TAGCTTATCACTGATGTTGA	
ADN-A12C	TAGCTTATCAGCCTGATGTTGA	
ADN-C13G	TAGCTTATCAGAGTGATGTTGA	
ADN-T14G	TAGCTTATCAGACGGATGTTGA	
ADN-G15C	TAGCTTATCAGACTCATGTTGA	
ADN-A16C	TAGCTTATCAGACTGCTGTTGA	
ADN-T17G	TAGCTTATCAGACTGAGGTTGA	
ADN-G18C	TAGCTTATCAGACTGATCTTGA	



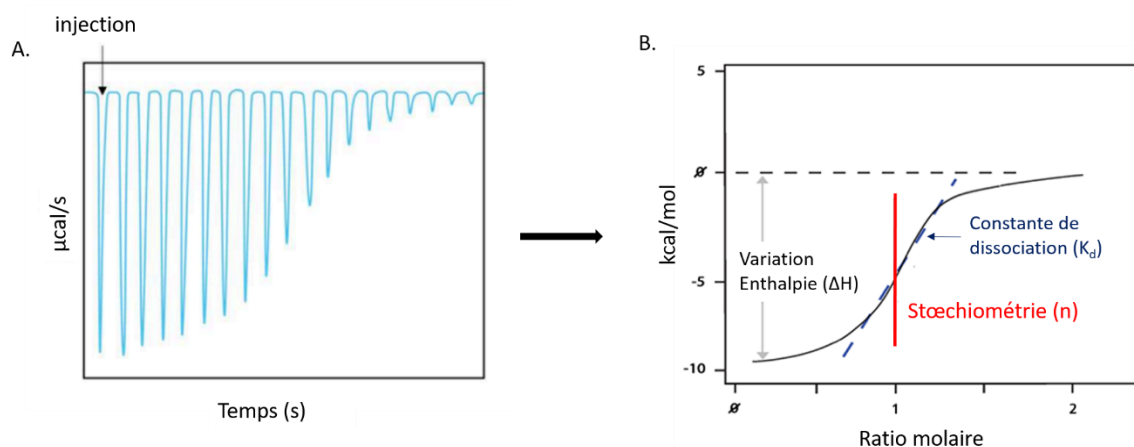
ADN-T19C	TAGCTTATCAGACTGATGCTGA	
ADN-T20C	TAGCTTATCAGACTGATGTCTGA	
ADN-G21C	TAGCTTATCAGACTGATGTTCTA	
ADN-A22C	TAGCTTATCAGACTGATGTTGCT	

Tableau 4 : Séquences nucléotidiques des oligonucléotides utilisés pour les expériences RMN et ITC. Les nucléotides (nt) mutés sont mis en rouge.

## II.3 Titration Calorimétrique Isotherme

### II.3.1 Principe général

L'ITC est une technique utilisée dans le but de caractériser la thermodynamique et la cinétique lors de la formation de complexes. Elle repose sur la mesure des variations de chaleur (variation d'enthalpie,  $\Delta H$ ) lors de la liaison entre deux molécules. Plus précisément, dans notre cas, l'ADN contenu dans la seringue est injecté progressivement dans la cellule de réaction contenant la protéine. La réaction de complexation, provoquée par chaque injection, dégage de la chaleur proportionnelle à la quantité d'ADN liée à la protéine. L'instrument mesure alors la quantité d'énergie par seconde nécessaire pour maintenir une différence de température nulle entre la cellule de réaction et la cellule de référence. La surface sous chaque pic du thermogramme obtenu (Figure 22.A), normalisée par la quantité d'ADN injectée, conduit à la variation d'enthalpie  $\Delta H$ . L'évolution de  $\Delta H$  en fonction du ratio molaire ( $[ADN]/[protéine]$ ) se traduit, dans le cas d'une interaction, par une courbe sigmoïdale d'où sont extraits différents paramètres thermodynamiques et cinétiques ainsi que la stœchiométrie du complexe formé (Figure 22.B) (Srivastava et Yadav 2019).



**Figure 22:** Principe général de l'ITC. Exemple de thermogramme (A) et sigmoïde (B) obtenus par ITC pour un site de liaison et correspondance graphique des paramètres  $\Delta H$ ,  $n$  et  $K_d$  extraits (adaptée de Srivastava et Yadav 2019).

### II.3.2 Applications

Les expériences d'ITC ont été réalisées sur un calorimètre MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Instruments). Les protéines (Tableau 5) et les différents oligonucléotides (Tableau 4) utilisés ont été préparés dans le même tampon. Les expériences ont été réalisées à 37°C, en utilisant un intervalle entre injection de 90 s et une agitation à 750 rpm. Dans la cellule de réaction du microcalorimètre, les protéines ont été placées à des concentrations entre 20 et 30  $\mu\text{M}$  selon le fragment étudié, pour un volume de 200  $\mu\text{L}$ . Les différents oligonucléotides ont été utilisés à des concentrations variant entre 130 et 255  $\mu\text{M}$  dans la seringue. Pour le tandem RRM1-2 et ses mutants, 26 injections de 1,5  $\mu\text{L}$  ont été effectuées tandis qu'un programme de 36 injections de 1  $\mu\text{L}$  a été choisi pour la protéine RRM3, RRM1-2(MOPS) ainsi que HuR-FL et ses mutants. Les expériences ont ensuite été analysées par le logiciel Microcal PEAQ-ITC Analysis en procédant à un ajustement non-linéaire par minimisation du  $\chi$ -square ( $\chi^2$ ) des données à un modèle à un ou deux sites de liaison (Brown 2009). Les paramètres extraits par ITC et leurs erreurs respectives ont été moyennés à l'issue de titrations réalisées en duplicats ou triplicats.

	<b>Construction</b>	<b>Tampon</b>
RRM1-2-	WT, (MOPS)	D et F
HuR-FL-	WT ; W261E	F
HRRM3	WT	F

Tableau 5 : Protéines utilisées pour les expériences ITC.

### III. Résonance Magnétique Nucléaire

Afin d'obtenir des informations structurales et dynamiques relatives aux différents complexes HuR-ADN étudiés, des expériences RMN du côté de la protéine HuR marquée à l'isotope  $^{15}\text{N}$  ont été conduites à 600 MHz (fréquence de résonance du proton  $^1\text{H}$ ) sur un spectromètre Bruker AVIII HD équipé d'une cryosonde. Il est à noter que l'attribution des déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$  du squelette peptidique de RRM1-2 a été faite en amont de cette thèse sur la base de l'entrée BMRB (*Biological magnetic resonance bank*) 27002 et d'expériences RMN multidimensionnelles conventionnelles (Inagaki 2013). Certains résidus d'acides aminés du RRM3 ont été identifiés sur la base de l'entrée BMRB 27671.

Pour cette thèse, en fonction des expériences, les échantillons, contenant la protéine HuR libre ou complexée, ont été placés dans des capillaires de diamètre 1,7 mm (volume final 60  $\mu\text{L}$ ) introduits dans des porte-capillaires contenant 100  $\mu\text{M}$  de DSS (2,2-Diméthyl-2-silapentane-5-sulfonique) dans de l'eau lourde  $\text{D}_2\text{O}$  (Eurisotop) ou dans des tubes de diamètre 3 mm (volume final 200  $\mu\text{L}$  dont 10% de  $\text{D}_2\text{O}$ ). L'ensemble des expériences RMN présentées dans ce manuscrit ont été réalisées à 310 K. Pour toutes les expériences, la concentration de la protéine (WT ou mutée) a été maintenue à 100  $\mu\text{M}$  pour RRM1-2, à 30  $\mu\text{M}$  pour RRM3 et à 30  $\mu\text{M}$  pour HuR-FL.

### III.1 Principe

La RMN est une spectroscopie fondée sur les propriétés magnétiques des noyaux de certains atomes, appelés spins nucléaires. Lors d'une expérience RMN, l'échantillon est placé dans un champ magnétique statique intense ( $B_0$ ) orientant les spins nucléaires selon deux directions, parallèle ou antiparallèle au champ, conduisant à la levée de dégénérescence des niveaux énergétiques par effet Zeeman. Pour les spins  $1/2$ , l'application du champ  $B_0$  conduit à l'apparition de deux niveaux d'énergie  $\alpha$  ( $+1/2$ ), d'énergie plus basse et  $\beta$  ( $-1/2$ ), d'énergie plus haute. L'excès de population existant sur l'état  $\alpha$  se traduit par l'apparition d'une aimantation nucléaire macroscopique, alignée à l'équilibre avec la direction du champ magnétique statique  $B_0$ . L'application d'une impulsion de champ radiofréquence RF générée par un champ magnétique  $B_1$  perpendiculaire à  $B_0$  permet de rompre l'état d'équilibre, faisant basculer l'aimantation hors de sa position d'équilibre. Selon la durée de l'impulsion RF appliquée, l'aimantation peut être manipulée à l'infini. Par exemple pour une durée correspondant à une impulsion à  $\pi/2$ , l'aimantation se retrouve dans le plan transverse, perpendiculaire à la direction de  $B_0$  : l'amplitude du signal mesurée est alors maximale. A la fin de l'impulsion RF, l'aimantation nucléaire revient à sa position d'équilibre selon un mouvement de précession autour de  $B_0$  à la fréquence de résonance ou de Larmor  $\nu_0$ . Lors de l'acquisition, le signal de précession libre FID (*Free induction decay*) est enregistré au cours du temps et converti, par transformée de Fourier, en signal fréquentiel, contenant alors les fréquences de résonance des noyaux, propres à l'environnement électronique entourant chacun d'entre eux. Sur un spectre RMN, cette différenciation de fréquences est appelée déplacement chimique, dont la valeur exprimée en ppm (parties par million) est une source d'informations sur la structure des molécules.

### III.2 Acquisition des spectres 2D

Les expériences 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  conduisent à l'obtention de spectres dans lesquels chaque résonance est la conséquence d'une corrélation entre un proton  $^1\text{H}$  et un hétéronoyau, ici  $^{15}\text{N}$ . Pour les protéines, chaque tâche de corrélation observée correspond, et ce pour chaque résidu d'acide aminé à l'exception de la proline, à la liaison entre le  $^1\text{H}$  amide et l'azote  $^{15}\text{N}$  de la liaison peptidique. Les spectres obtenus sont caractérisés par deux dimensions, chacune représentant l'axe des déplacements chimiques  $^1\text{H}$  (dimension directe) et  $^{15}\text{N}$  (dimension indirecte). Ces expériences sont souvent utilisées comme empreinte pour caractériser des interactions protéine-ligand par comparaison des spectres de la protéine libre et après ajout de ligand.

#### Acquisition des spectres RMN 2D (pour HuR-FL et ses mutants) :

Les spectres 2D de HuR-FL libre ou en complexe ont été enregistrés à l'aide d'expériences d'acquisition classiques  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (*Heteronuclear single quantum coherence*) (Bodenhausen et Ruben 1980). Le programme d'impulsion standard *hsqcetf3gpsi2* de la librairie Bruker (Figure 23) a été utilisé. 2048 points ont été acquis dans la dimension directe  $^1\text{H}$  contre 128 dans la dimension indirecte  $^{15}\text{N}$  avec un délai de relaxation de 1 s et 512 scans. Des fenêtres spectrales de largeur 12,5 ppm dans la direction  $^1\text{H}$  (centrée à 4,7 ppm) et 35 ppm dans la direction  $^{15}\text{N}$  (centrée à 118 ppm) ont été choisies. La durée de chaque expérience a été d'environ 21 heures et 30 minutes.

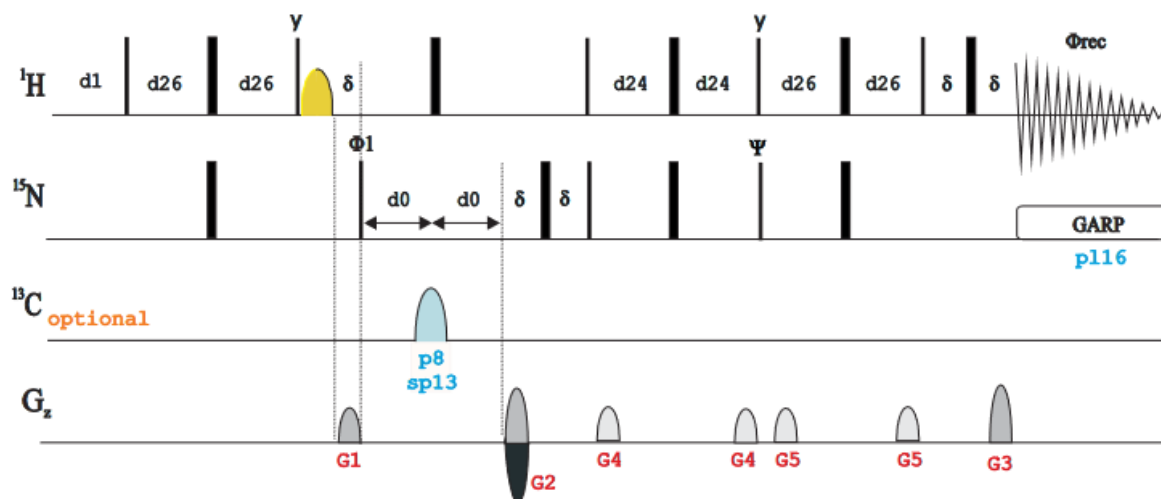


Figure 23: Séquence d'impulsion  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC utilisée dans le cadre des travaux présentés (source catalogue Bruker).

#### Acquisition des spectres RMN 2D (pour HuR-RRM3, HuR-RRM1-2 et ses mutants):

Les spectres 2D de HuR-RRM1-2 libre ou en complexe ont été enregistrés à l'aide d'expériences d'acquisition rapide  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC (*Band-selective optimized flip-angle short-transient heteronuclear multiple quantum coherence*) (Schanda et Brutscher 2005). L'expérience SOFAST-HMQC permet d'avoir une meilleure sensibilité grâce à la combinaison : d'un transfert HMQC limitant le nombre d'impulsions, à l'utilisation d'impulsions sélectives sur le canal  $^1\text{H}$  permettant de restaurer plus rapidement l'aimantation des spins d'intérêt à l'équilibre et par conséquent de l'application de délais de relaxation courts. Pour ces expériences, le programme d'impulsion *sfhmqcf3gpph* de la librairie Bruker a été utilisé (Figure 24). Le nombre de points d'acquisition a été respectivement de 2048 dans la dimension directe  $^1\text{H}$  et de 128 dans la dimension indirecte  $^{15}\text{N}$  avec un délai de relaxation de 0,2 s et 256 scans. La largeur des fenêtres spectrales a été imposée à 16 ppm dans la direction  $^1\text{H}$  (centrée à 4,7 ppm) et à 35 ppm dans la direction  $^{15}\text{N}$  (centrée à 118 ppm). La durée et la puissance des impulsions sélectives ont été calculées considérant une bande amide de largeur 4 ppm et centrée à 8 ppm. La durée de chaque expérience a été de 3 heures et 30 minutes.

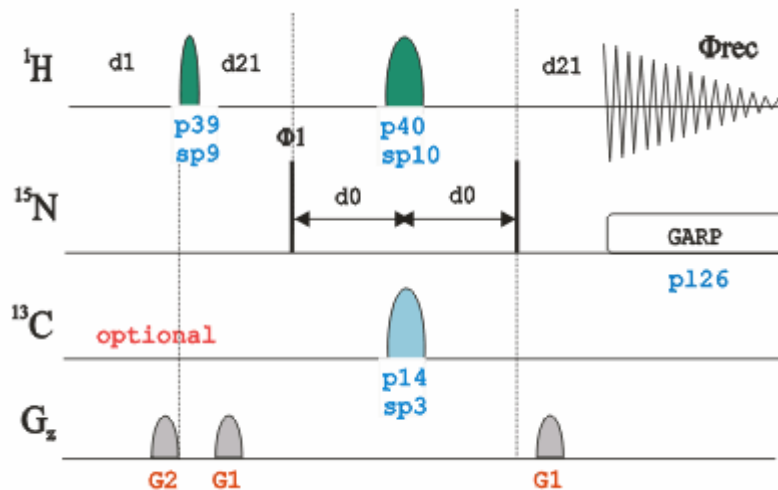
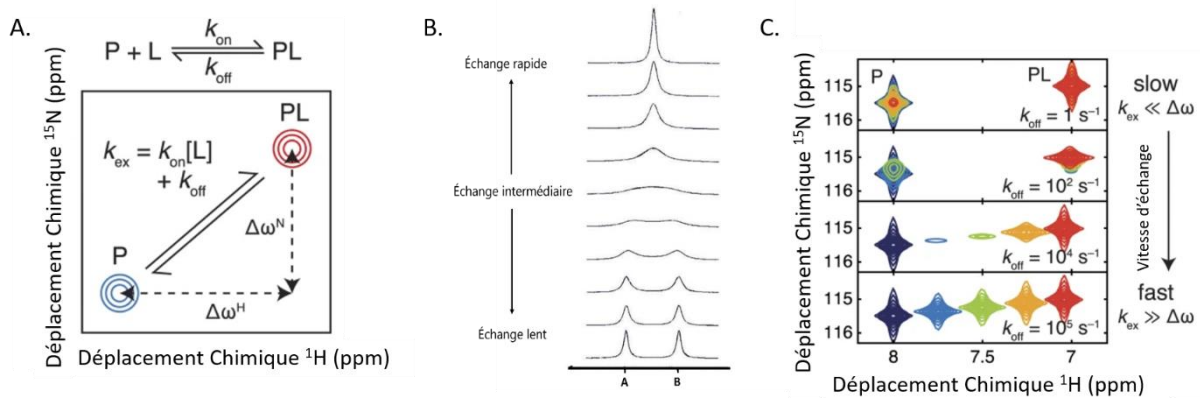


Figure 24.: Séquence d'impulsion de l'expérience SOFAST-HMQC utilisée dans le cadre des travaux présentés (source *catalogue Bruker*).

### III.3 Phénomènes d'échange

Après l'acquisition d'un spectre de corrélation 2D, une première étape de simple visualisation permet souvent d'obtenir déjà des informations quant à la protéine étudiée. En effet, l'allure des tâches de corrélation permet d'identifier le régime d'échange du système, qu'il soit chimique ou conformationnel. Lors de phénomènes d'échange, un spin peut, dans le cas le plus simple, s'échanger entre deux sites A et B magnétiquement différents, chacun caractérisé par une fréquence propre  $\omega_A$  et  $\omega_B$  (Figure 25.A). La visualisation de ces deux états sur un spectre RMN est modulée par la dynamique du système étudié caractérisée par une vitesse d'échange ( $k_{ex}$ ). L'échange est classé selon trois catégories relatives à la différence en Hertz entre les résonances échangeables ( $\Delta\omega$ ) et peut être relié à l'affinité de liaison : lent (affinité forte), intermédiaire (affinité moyenne) ou rapide (affinité faible). L'échange lent ( $k_{EX} \ll \Delta\omega$ ) se traduit par l'apparition de deux signaux RMN aux déplacements chimiques caractéristiques des deux états, l'échange intermédiaire ( $k_{EX} \sim \Delta\omega$ ) par un élargissement des résonances conduisant à leur coalescence qui peut résulter à la disparition totale

du signal et l'échange rapide ( $k_{EX} \gg \Delta\omega$ ) caractérisé par l'apparition d'une raie fine définie par un déplacement chimique moyen pondéré par les populations respectives de chaque état (Figure 25.B et C).



**Figure 25 :** Phénomènes d'échange en RMN A : Schéma et équation expliquant la vitesse d'échange  $k_{EX}$  et la différence de fréquence entre deux sites  $\Delta\omega$  (adapté de (Waudby et al. 2016)). B : Schéma théorique de l'effet de l'échange sur les signaux RMN entre une population A et une population B (adapté du livre de Canet et al. 2002). C : Spectres 2D illustrant les différents phénomènes d'échange lors d'une interaction protéine-ligand au cours d'une titration (adapté de (Waudby et al. 2016))

### III.4 Perturbations des déplacements chimiques

Chaque protéine possède une empreinte spectrale qui lui est propre. Lors de la liaison d'un ligand à une protéine par exemple, l'environnement électronique de la protéine au niveau de certains résidus d'acides aminés peut être modifié, ce qui se traduit par des perturbations de déplacements chimiques CSP (*Chemical shift perturbations*) qui peuvent être suivies dans un spectre 2D  $^1H$ - $^{15}N$ . Les CSP sont quantifiables et peuvent donc apporter de précieuses informations structurales lors de formation de complexes. Après complexation, les CSP peuvent apparaître le long de la dimension  $^1H$ ,  $^{15}N$  ou les deux. Afin de tenir compte de l'étendue différentes des déplacements chimiques entre  $^1H$  et  $^{15}N$ , un CSP pondéré est ainsi calculé selon l'équation suivante :



$$CSP = \sqrt{0,5[\Delta\delta_H^2 + (0,14\Delta\delta_N)^2]}$$

Où  $\Delta\delta_H$  et  $\Delta\delta_N$  correspondent à la différence de déplacements chimiques entre forme libre et complexée de la protéine respectivement dans la dimension  $^1H$  et  $^{15}N$  (Williamson 2013).

### III.5 Mesure des temps de relaxation $R_1$ et $R_2$

Les protéines sont des édifices flexibles dont les mouvements moléculaires s'étendent sur une gamme de temps très large accessible au moyen de différentes expériences RMN (Figure 26). Pour caractériser les mouvements moléculaires rapides (de l'ordre de la pico à la nanoseconde), les paramètres de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  ont été mesurés au niveau de chaque azote de la liaison peptidique des résidus d'acides aminés. Ces paramètres caractérisent le retour à l'équilibre de l'aimantation nucléaire après excitation :  $T_1$ , le temps de relaxation longitudinale, correspond au temps nécessaire au retour à l'équilibre de l'aimantation le long de l'axe z (direction de  $B_0$ ) et  $T_2$ , le temps de relaxation transversale, le temps correspondant à la disparition de l'aimantation dans le plan transverse (x,y).

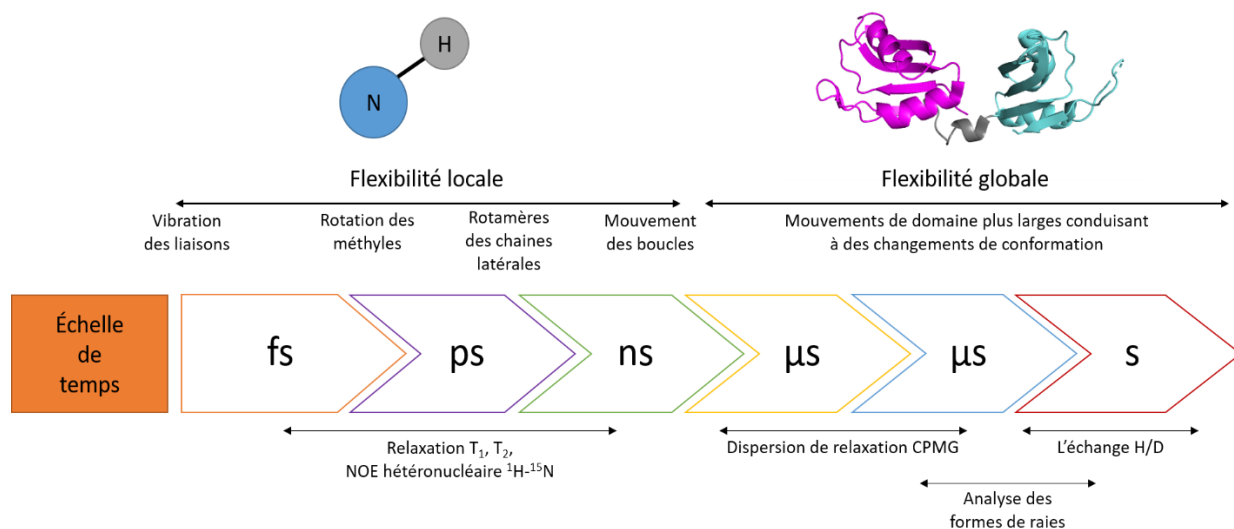


Figure 26 : Echelle de temps des mouvements moléculaires pouvant être étudiés par RMN (inspiré de (Dias et Ciulli 2014))

Les séquences d'impulsion permettant la mesure de  $T_1$  et  $T_2$  sont des expériences pseudo-3D basées sur un bloc d'impulsion  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC auquel est ajouté une troisième dimension correspondant à une période d'évolution pendant laquelle se manifeste le paramètres dynamiques d'intérêt. L'expérience est répétée pour différents temps d'évolution pour lesquels un spectre 2D est à chaque fois enregistré.

Dans le cas de ce travail, les expériences de relaxation  $T_1$  et  $T_2$   $^{15}\text{N}$  ont été enregistrées pour la forme tronquée RRM1-2 concentrée à  $100\mu\text{M}$  libre et en complexe avec des ADN de concentrations variables. Le temps de relaxation longitudinale  $T_1$  a été acquis à partir du programme d'impulsion *hsqct1etf3gpsi3d.2* (bibliothèque Bruker) en utilisant une liste de 8 délais variables (20, 300, 85, 1000, 700, 45, 475 et 175 ms) (Figure 27.A). Le nombre de points d'acquisition a été respectivement de 2048 dans la dimension directe  $^1\text{H}$  et de 128 dans la dimension indirecte  $^{15}\text{N}$  avec un délai de relaxation de 1,5 s et 108 scans (durée : environ 63 heures). La largeur des fenêtres spectrales a été imposée à 12,5 ppm dans la direction  $^1\text{H}$  (centrée à 4,7 ppm) et à 30 ppm dans la direction  $^{15}\text{N}$  (centrée à 118 ppm). Pour le temps de relaxation transversale  $T_2$ , la séquence

d'impulsion *hsqct2etf3gpsi3d* (bibliothèque Bruker) a été utilisée avec une liste de 8 délais (17, 34, 85, 34, 51, 68, 51 et 102 ms) (Figure 27.B). Le nombre de points d'acquisition a été respectivement de 2048 dans la dimension directe  $^1\text{H}$  et de 128 dans la dimension indirecte  $^{15}\text{N}$  avec un délai de relaxation de 1,5 s et 128 scans (durée : environ 61 heures). La largeur des fenêtres spectrales a été imposée à 12,5 ppm dans la direction  $^1\text{H}$  (centrée à 4,7 ppm) et à 30 ppm dans la direction  $^{15}\text{N}$  (centrée à 118 ppm). Les expériences ont été ensuite analysées à l'aide du logiciel PINT (Niklasson et al. 2017) afin d'extraire les vitesses de relaxation longitudinale  $R_1=1/T_1$  ou transversale  $R_2=1/T_2$ .

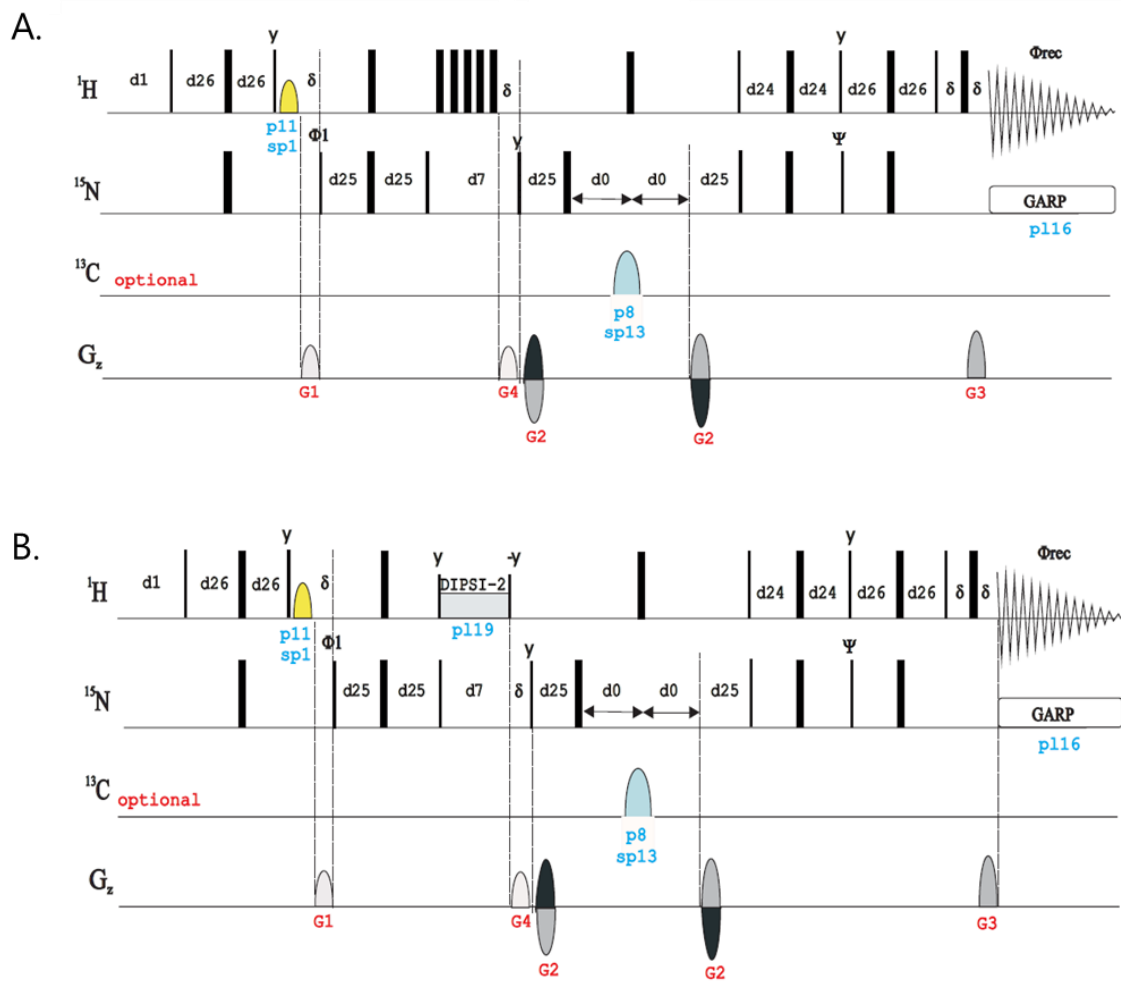


Figure 27 : Schéma des séquences d'impulsion utilisées pour la mesure des temps de relaxation  $T_1$  (A) et  $T_2$  (B) dans le cadre des travaux présentés (source catalogue Bruker).

### III.6 Expériences PRE

Pour les expériences PRE, la protéine étudiée arbore une sonde MTSL greffée sur la fonction thiol d'un résidu Cystéine (partie II.1.3). Le MTSL possède un électron non apparié, lui conférant des propriétés paramagnétiques. L'électron non apparié va modifier l'environnement électrique des noyaux environnant résultant sur le spectre en un élargissement des résonances voire une disparition totale s'ils se trouvent très proches du MTSL ( $d < 12 \text{ \AA}$ ). L'interaction dipolaire intermoléculaire entre le spin de l'électron célibataire et celui d'un noyau environnant est un mécanisme de relaxation très efficace puisqu'il fait intervenir le rapport gyromagnétique de l'électron  $\gamma_e$ , 658 fois supérieur à celui de  $^1\text{H}$  par exemple. Les expériences MTSL permettent ainsi d'obtenir des informations de proximité entre le MTSL et les noyaux aux alentours. Dans la pratique, deux spectres SOFAST-HMQC (partie III.2) sont enregistrés pour chacun des quatre mutants MTSL du fragment HuR-RRM1-2 (partie II.1.3) correspondant aux formes paramagnétique et diamagnétique du MTSL greffé. La forme diamagnétique du MTSL a été obtenue par réduction du MTSL en incubant l'échantillon avec de l'acide ascorbique à 2mM final pendant une durée minimale de 4h à température ambiante. Cette expérience sert de contrôle en restaurant l'intensité des signaux préalablement perturbé par la présence du MTSL paramagnétique. Pour chacun des deux spectres collectés, les intensités correspondant aux états paramagnétique  $I_{\text{para}}$  et diamagnétique  $I_{\text{dia}}$  de chaque résonance ont été déterminées. Le ratio des intensités ( $I_{\text{para}}/I_{\text{dia}}$ ) a été calculé pour chaque résidu d'acide aminé, une valeur égale à 0 traduit une proximité à moins de 12 Å de la sonde MTSL, un ratio compris entre 0,8 et 1 indique que le résidu se trouve à plus de 35 Å (Venditti et Fawzi 2018) (Figure 28).

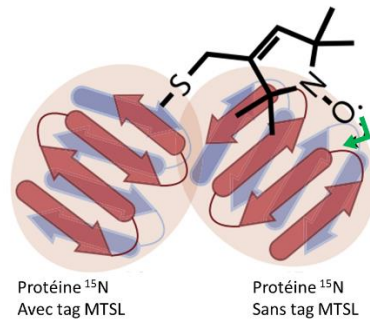


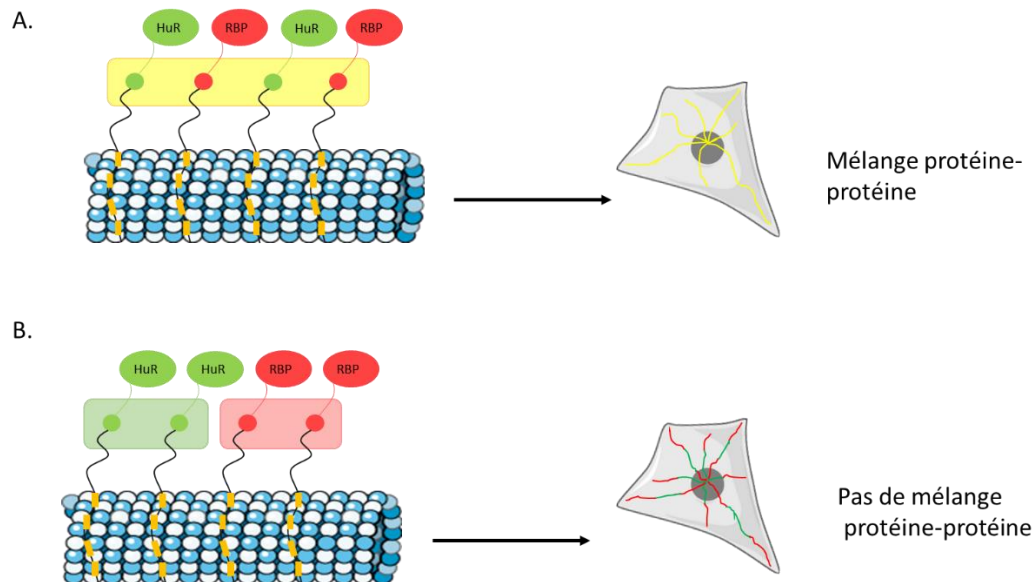
Figure 28: Illustration des effets PRE intermoléculaires entre deux protéines induits par la présence d'une sonde MTSL. Pour les résidus d'acides aminés proches du MTSL (flèche verte), leur environnement électronique est perturbé amenant à un élargissement de leur résonance sur le spectre RMN (adapté de (Karamanos et al. 2015)).

#### IV. Technique de la Microtubule Bench

##### IV.1 Principe de la technique

La MT (Microtubule) Bench est une technique développée au sein du laboratoire SABNP pour analyser des interactions protéine-protéine en utilisant comme support le réseau de microtubule de la cellule. Le principe est de fusionner une protéine fluorescente (GFP ou RFP) avec le MBD (Microtubule Binding Domain) de la protéine Tau et ensuite à la protéine d'intérêt. L'utilisation des microtubules est intéressante car cela permet de distinguer clairement les signaux d'intérêt du bruit de fond du fait de leur structure fibrillaire. De plus, un grand nombre de protéines peut s'y fixer car ils possèdent une grande surface de contact. Dans la pratique, une co-transfection est faite pour exprimer dans des cellules HeLa deux différentes protéines fusionnées à GFP-MBD ou RFP-MBD dans le but de visualiser et quantifier leur répartition le long des microtubules. Si les deux protéines se mélangent, la fluorescence associée à chacune d'elle sera mixée donnant une couleur jaune (Figure 29.A). En revanche, si les deux protéines ne se mélangent pas, elles auront tendances à former des clusters de

fluorescence rouge et vert provoquant une séparation nette des fluorescences (Figure 29.B). Le niveau de mélange des deux protéines est quantifié en mesurant un coefficient de corrélation.



**Figure 29 :** Schéma de la méthode MT Bench entre deux protéines RBPs fusionnées aux domaines GFP-MBD et RFP-MBD. 1 : observation d'un mélange protéine-protéine 2 : résultats attendus lorsque les protéines ne se mélangent pas.

## IV.2 Culture cellulaire et co-transfection

Pour cette partie, des cellules *HeLa* (obtenues auprès de l'*American Type Culture Collection*, ATCC) ont été utilisées. Elles sont cultivées dans un milieu DMEM à haute teneur en glucose (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, 4.5 g/L de glucose) complété par 10% de SBF, 2 mM de L-glutamine, 1x de MEM (solution d'acides aminés non essentiels) et 1% de pénicilline-streptomycine (GIBCO Life Technologies) à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Une fois confluentes, les cellules ont été placées dans des plaques de 96 puits (microplaques CellCarrier Ultra, PerkinElmer) à une densité de 15x10<sup>3</sup> cellules par puit. Elles ont été co-transfectées (0.25 µg de chaque plasmide/puit) le jour suivant avec les différents plasmides GFP-MBD et RFP-MBD (Tableau 6) en utilisant le réactif

Lipofectamine 2000 (Thermofisher) (0.2µL /puit) puis incubées pendant 24 heures à 37°C dans 5% de CO<sub>2</sub>. Après avoir été lavées avec du tampon PBS (*Phosphate-buffered saline*), les cellules ont été fixées avec du méthanol froid et incubées à -20°C pendant 10 minutes. Après un deuxième lavage avec du PBS, les cellules ont été fixées avec 4% de PFA (Paraformaldéhyde), dilué dans du PBS, pendant 20 minutes à 37°C. Une double fixation a été réalisée dans le but d'améliorer la visualisation des microtubules. Les cellules ont ensuite été marquées au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), un réactif permettant de marquer les noyaux, puis lavées une dernière fois avec du PBS avant de procéder à l'acquisition d'images avec le microscope Opera Phenix® Plus HCS (*High content screening system*) (PerkinElmer).

Etiquette	Constructions utilisées
GFP-MBD	HuR-T32A; HuR-E45A; HuR-E47A; HuR-Y63A; HuR-K72A; HuR-K182A; HuR-K182E; HuR-K182R; HuR-F183A; HuR-N188A; HuR-W261E
RFP-MBD	HuR-FL; YB1

Tableau 6 : Récapitulatif des plasmides utilisés pour la MT Bench.

### IV.3 Acquisition et analyse des images

Les images ont été acquises à l'objectif x40 sur le microscope HCS. Le logiciel Harmony v4.8 de PerkinElmer, couplé au microscope HCS, a permis l'analyse des images et la sélection de différents paramètres dans le but de créer un script spécifique à l'analyse d'expériences MT Bench. Les cellules co-tranfectées ont d'abord été segmentées, le noyau a été détecté en premier, puis le cytoplasme et enfin les microtubules. Des fragments de microtubules appelés spots, ont été sélectionnés à l'aide de plusieurs filtres comme le rapport largeur/longueur (>0,2) pour éliminer les spots non tubulaires. Cette sélection a permis de ne tenir compte que des segments

de microtubule très fins pour une analyse plus précise et spécifique. Les intensités de fluorescence de la GFP et de la RFP ( $I_{RFP}$  et  $I_{GFP}$ ) dans ces spots ont été mesurées automatiquement et individuellement pour toutes les cellules d'un puit donné.

#### IV.4 Analyse automatique du score d'auto-association

Les données issues de l'analyse faite à l'aide du logiciel Harmony ont ensuite été exportées dans le logiciel Matlab R2023a. Les valeurs des intensités  $I_{RFP}$  et  $I_{GFP}$  de chaque spot ont été normalisées par rapport aux intensités RFP et GFP du cytoplasme (bruit de fond) et un score d'auto-association ( $R^2$ ) moyen par puit a été calculé à partir d'une régression linéaire entre les deux signaux de fluorescence. Lorsque les deux protéines sont miscibles entre elles (auto-association),  $R^2$  se rapproche de la valeur 1 et les microtubules apparaissent en jaune à la suite du mélange des deux fluorescences. A l'inverse, plus le  $R^2$  tend vers la valeur 0, moins les protéines sont miscibles entre elles et plus elles ont tendance à former des clusters traduits visuellement par la présence de compartiments rouges et verts distincts sur les microtubules.

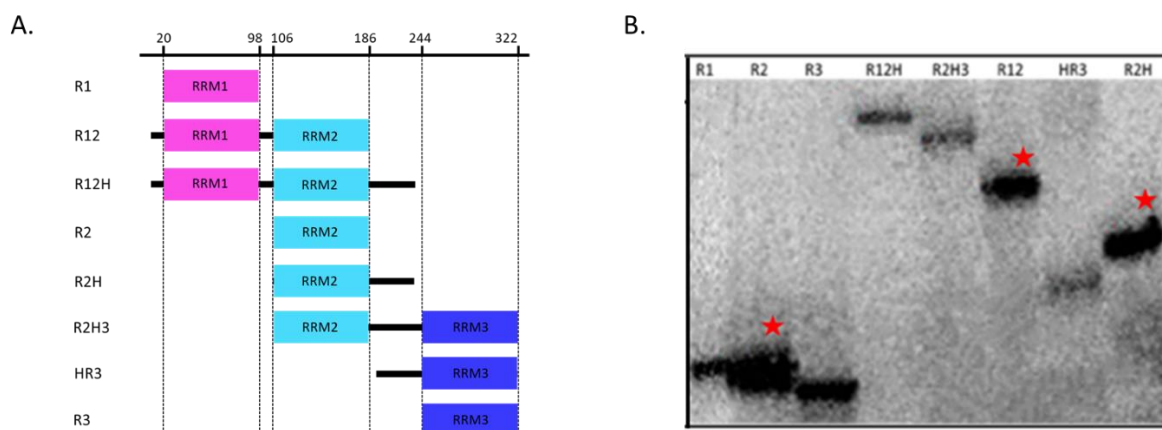


## RESULTATS

Le projet HuR est un projet collaboratif, mené avec le Professeur Ray, chercheur à l'IISER (Indian Institute of Science Education and Research, Kolkata, India). Pour des raisons de clarté et pour appuyer notre démarche, certains résultats obtenus par nos collaborateurs seront mentionnés dans la légende des figures s'y rapportant.

### I. Etudes in vitro du tandem RRM1-2 de HuR

HuR est une RBP constituée de 3 RRM capables de se lier aux ARE de l'ARN. Dans un premier temps, l'implication des RRM à la liaison à miR-21 a été étudiée afin de déterminer s'il existait un domaine déterminant lors de la reconnaissance spécifique entre HuR et miR-21. Pour cela, différentes constructions de HuR ont été produites (Figure 30.A) et l'effet de leur liaison à miR-21 a été testée par des expériences d'U.V *crosslinking* utilisant un marquage radioactif de l'ARN au  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP (Uracile triphosphate) (Figure 30.B).



**Figure 30 :** Implication des RRM dans la liaison à miR-21. A : Troncations de HuR utilisées lors de cette expérience. B :  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-miR-21 incubé avec les différentes troncations de HuR, crosslinké, traité à la RNaseA puis résolu sur gel SDS-PAGE 10%. Les troncations se liant le plus à  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-miR-21 sont indiquées par des étoiles. (Source : collaboration IISER).

Comme attendu, les résultats indiquent que les 3 RRM de HuR peuvent se lier à miR-21. Cependant, en comparant l'intensité des bandes obtenues pour les différentes tronctions, le RRM2 semble être le déterminant majeur lors de l'accroche à miR-21 (Figure 30.B, étoiles).

Pour comprendre l'arrangement structural de HuR sur miR-21, des expériences de biochimie et de RMN sont nécessaires. Ces expériences nécessitent de travailler à des concentrations élevées de protéine. HuR-FL, de par sa longue région HNS non structurée, est peu soluble et précipite rapidement. Afin d'élucider au niveau atomistique le mécanisme conduisant à la reconnaissance spécifique de miR-21 par HuR, et au vu des résultats présentés dans la Figure 30, il a été choisi de travailler dans un premier temps avec une forme tronquée de HuR constituée du tandem RRM1-2 (M1 à N188). Cette troncation présente plusieurs avantages : elle est très soluble, a un poids moléculaire de 21 kDa permettant de l'obtenir à des concentrations optimales pour des expériences de RMN ou encore d'ITC. Cette première partie sera ainsi exclusivement consacrée à l'étude de HuR-RRM1-2.

### I.1 Identification des résidus d'acides aminés de HuR interagissant avec miR-21

Afin d'identifier les résidus d'acides aminés de HuR impliqués spécifiquement dans la liaison avec miR-21, des expériences de RMN ont été menées. Dans un premier temps, les spectres 2D de la protéine RRM1-2 libre et en complexe avec miR-21 ont été acquis. Les spectres de RRM1-2 sont résolus et caractéristiques d'une protéine repliée (Figure 31.A). La superposition de ces deux spectres met en évidence une modification de l'environnement électronique de certains résidus d'acides aminés lors de la complexation traduite par l'apparition de CSP et par la disparition totale de certaines résonances indiquant la liaison entre RRM1-2 et miR-21. Dans l'ensemble, les variations de déplacements chimiques observées sur le spectre 2D de RRM1-2 en

complexe sont caractéristiques d'un échange rapide voire intermédiaire, laissant entendre qu'une affinité faible à modérée existe entre RRM1-2 et miR-21 (Figure 31.B). Par la suite, le calcul des CSP a permis de mettre en évidence précisément les résidus les plus affectés par la liaison de RRM1-2 sur miR-21 (Figure 31.C). L'analyse des CSP indique que les résidus d'acides aminés de HuR impactés par la liaison à miR-21 se trouvent principalement dans les brins  $\beta_1$  et  $\beta_3$  du RRM1 et du RRM2 (Tableau 7) contenant respectivement les motifs RNP2 et RNP1 conservés dans les RRM et connus pour être le lieu d'accroche aux ARN.

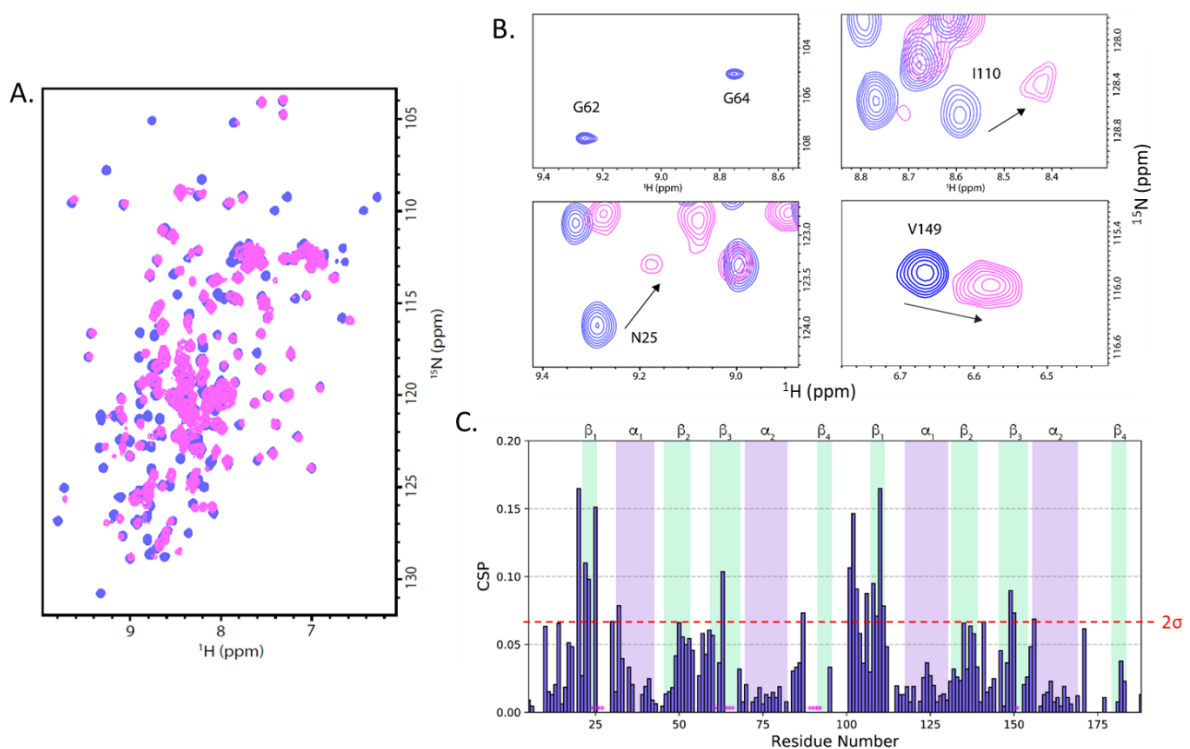
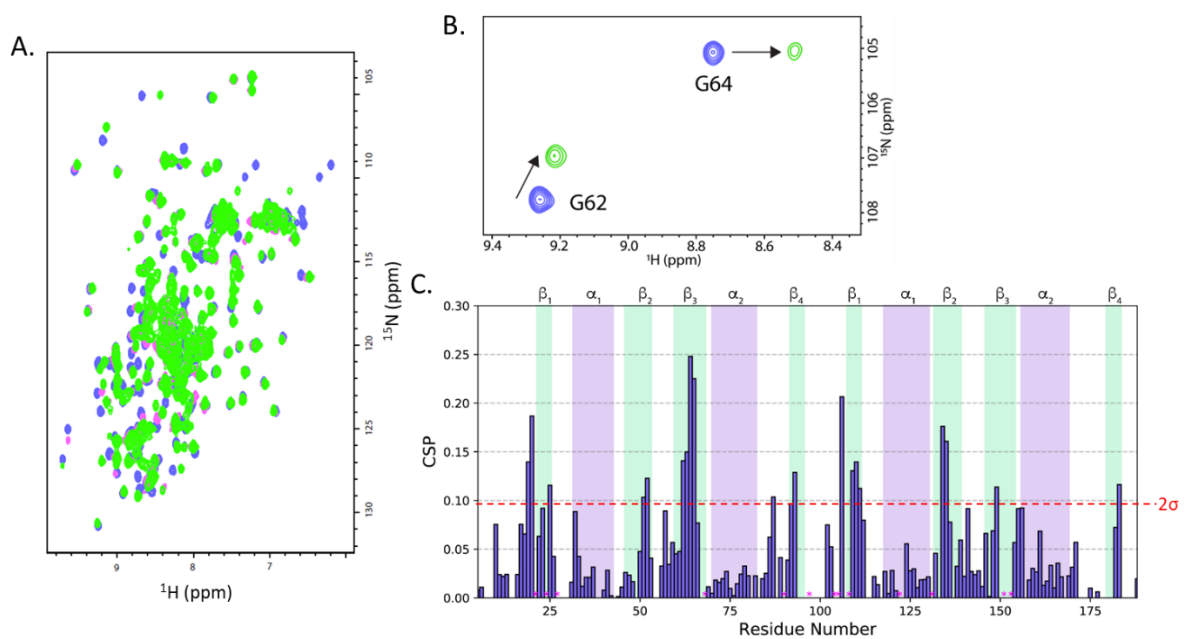


Figure 31 : Identification des résidus d'acides aminés de RRM1-2 critiques dans la liaison à miR-21. A : Spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST de RRM1-2 libre (bleu) et complexée à miR-21 à un ratio 1 :1,2 (magenta) obtenus à 600 MHz et à 310 K. B : Zoom sur des résidus impactés par la liaison à miR-21. C : CSP et disparitions (étoiles) induits par la liaison de RRM1-2 à miR-21. La ligne rouge indique 2 fois l'écart-type ( $2\sigma$ ). Non représentés : prolines et signaux non attribués.

Pour identifier l'éventuelle implication spécifique de résidus d'acides aminés de HuR ainsi que de nucléotides essentiels à l'accroche dans miR-21, la stratégie a consisté à

tester RRM1-2 en présence de mutants de miR-21. Compte-tenu du nombre de mutants à tester (Matériels et méthodes, II.2), des homologues ADN de miR-21 ont été choisis. Outre un coût de production moins élevé, l'utilisation d'ADN conduit à des spectres 2D mieux résolus et plus exemptés des phénomènes d'échange intermédiaire conduisant à la disparition des signaux. Bien que l'affinité pour l'ADN soit plus faible, puisque HuR est une protéine de liaison à l'ARN, il est essentiel pour la caractérisation de la liaison de pouvoir suivre les variations des déplacements chimiques (Figure 32.B).



**Figure 32 :** Comparaison de la liaison de RRM1-2 avec miR-21 ou ADN-21. A : Spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST de RRM1-2 libre (bleu), complexée à miR-21, ratio 1 :1,2 (magenta) ou à ADN-21, ratio 1 :1,2 (vert) obtenus à 600 MHz et 310 K. B : Zoom sur des résidus impactés par la liaison à ADN-21. C : CSP et disparitions (étoiles) induits par la liaison de RRM1-2 à ADN21. La ligne rouge indique 2 fois l'écart-type ( $2\sigma$ ). Non représentés : prolines et signaux non attribués.

Le spectre 2D de RRM1-2 en complexe avec ADN-21, homologue ADN de miR-21, est similaire à celui obtenu avec miR-21 (Figure 32.A) indiquant une structuration globale identique à celui du complexe avec miR-21. Le calcul des CSP conforte ces observations puisque les CSP les plus élevés (supérieurs à  $2\sigma$ ) sont retrouvés principalement au

niveau des mêmes résidus d'acides aminés qu'avec miR-21(Figure 32.C et Tableau 7).

Sur la base de la structure 3D du tandem RRM1-2 en interaction avec un ARN chimérique de 11 nucléotides riche en ARE obtenue par diffraction des rayons X (PDB : 4ED5), les résidus d'acides aminés en interaction avec cet ARN ont été extraits grâce au serveur Mapiya (Badaczewska-Dawid et al. 2022), en imposant un seuil de distance de 5 Å entre la protéine et l'ARN. Cette liste a été comparée aux résidus d'acides aminés impactés par la liaison à miR- ou ADN-21 (CSP>2σ et disparitions) afin de caractériser l'existence d'un recrutement spécifique de certains résidus de RRM1-2 lors de cette interaction particulière (Tableau 7).

Complexe Domaine	4ED5 (seuil 5Å)	RRM1-2 : miR-21	RRM1-2 : ADN21
<b>RRM1</b>	N21 I23 N25 Y26 Q29 K50 I52 H59 S60 L61 G62 Y63 F65 S88 K89 T90 I91 K92 S94 Y95 A96 R97 P98	T20 L22 I23 V24 N25 Y26 L27 N30 T32 L61 G62 Y63 G64 F65 V66 Q87 K89 T90 I91 K92	R19 T20 N21 V24 N25 L27 L51 I52 G62 Y63 G64 F65 Y68 Q87 T90 V93 R97
<b>Linker</b>	S99 S100 I103 K104 D105	E101 V102 I103	K104 D105
<b>RRM2</b>	N107 Y109 S111 I133 N134 R136 L138 R147 V149 F151 R153 K182 A184 A185	A106 L108 Y109 I110 S111 Q141 V149 A150 F151 K156	A106 L108 Y109 I110 S111 V122 R131 N134 S135 V149 F151 R153 F183

Tableau 7: Résidus d'acides aminés de RRM1-2 en interaction avec i) un ARN 5'-AUUUUUUUUUU-3' (PDB : 4ED5), ii) miR-21 et iii) ADN-21. En vert, les résidus des RNP1 et RNP2 impliqués dans la liaison aux 3 oligonucléotides. En rouge, les résidus possiblement spécifiques à miR-21 et ADN-21.

Certains résidus des RNP1 et RNP2 sont impliqués dans la liaison aux 3 oligonucléotides comme par exemple N25, Y63, Y109, S111 ou encore V149 révélant leur importance dans le mécanisme général de liaison de RRM1-2 à l'ARN. Hormis ces

résidus, d'autres semblent être impliqués spécifiquement dans la liaison à miR- et ADN-21 comme V24 et L108 du RNP2 et RNP1 mais également T20 et A106, montrant une possible adaptabilité de RRM1-2 vis-à-vis de miR- et ADN-21 (Figure 33). Compte-tenu de ces résultats, la suite de l'étude a été menée avec ADN-21.

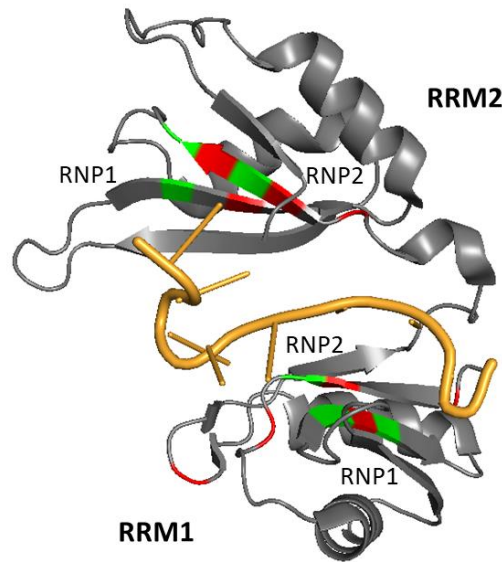
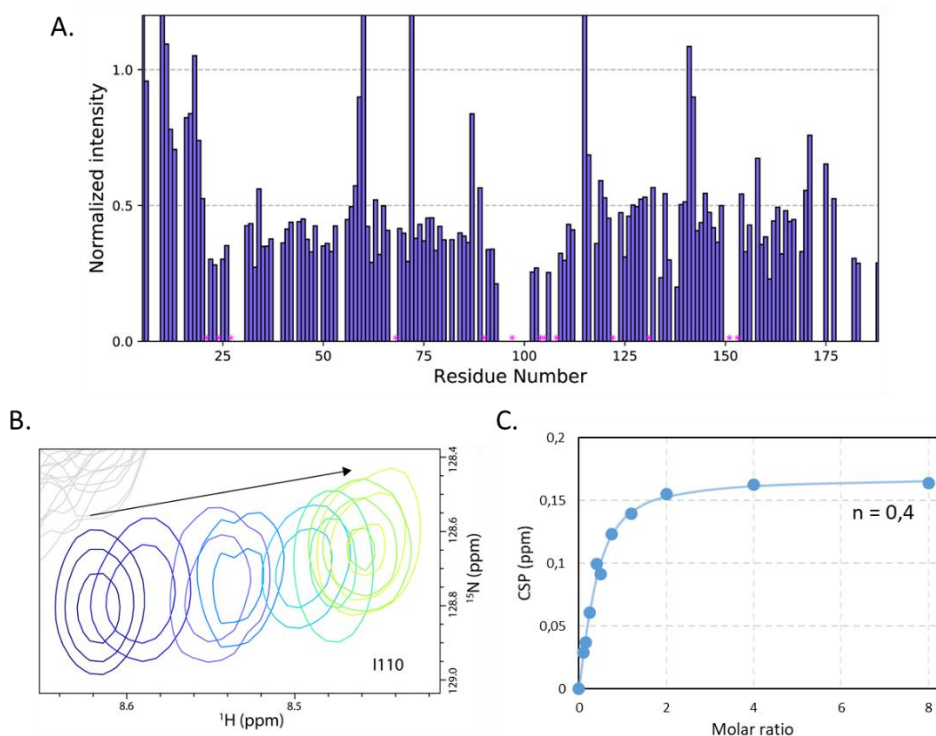


Figure 33 : Résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison à ADN-21 (vert : résidus retrouvés dans 4ED5 et rouge : résidus spécifiques à ADN-21).

## I.2 Elucidation de la stœchiométrie du complexe HuR-ADN-21

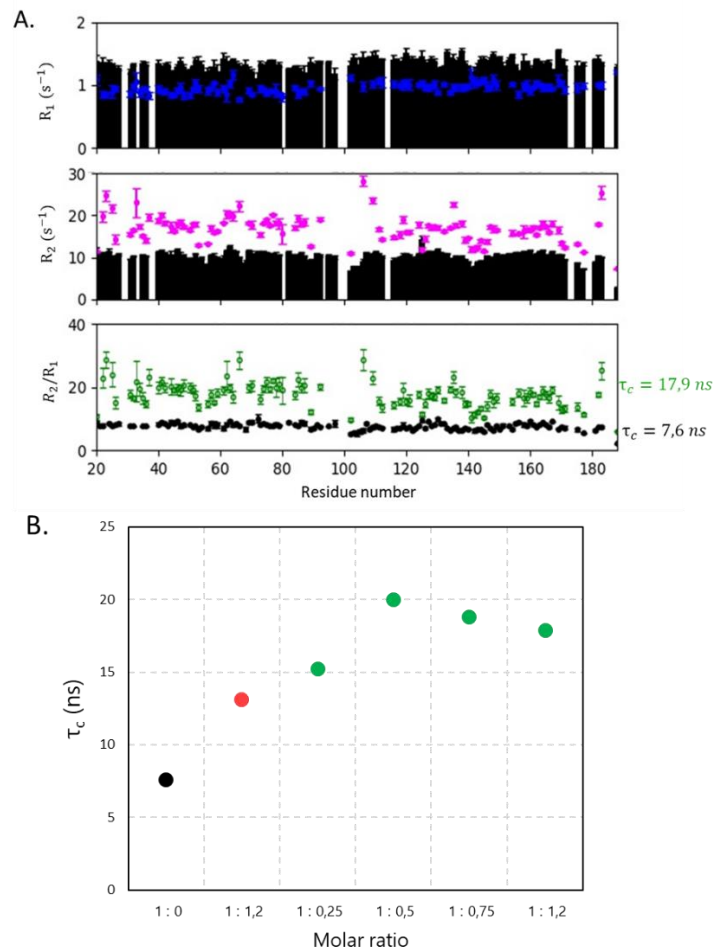
Jusqu'à présent, les études structurales portant sur RRM1-2 montrent son interaction avec des oligonucléotides de petite taille ne permettant la liaison que d'une seule protéine RRM1-2. Cependant, la longueur de ADN-21 (22 nt) laisse envisager la liaison de plusieurs RRM1-2 comme indiqué par la chute importante des intensités spectrales lors de la complexation (Figure 34.A). Des expériences de titration, dans lesquelles des concentrations croissantes d'ADN-21 ont été ajoutées à RRM1-2, semblent indiquer une éventuelle dimérisation du tandem lors de la liaison à ADN-21 (Figure 34.B et C).



**Figure 34 :** Effets de la liaison de RRM1-2 à ADN-21 sur les intensités et les CSP. A : Intensités normalisées correspondant au rapport des intensités de RRM1-2 complexée (ratio 1 :1,2) par les intensités de RRM1-2 libre (disparitions représentées par des étoiles, non représentés : prolines et signaux non attribués). B : Effet de la titration sur les CSP de I110 (gradient de concentrations d'ADN-21 correspondant à des ratios allant de 1 : 0 à 1 : 8). C : Evolution du CSP en fonction du ratio des concentrations ADN-21 sur RRM1-2 et extraction de la stœchiométrie n (Williamson 2013).

Afin de déterminer plus précisément la stœchiométrie du complexe formé, la dynamique du système, c'est-à-dire la nature des mouvements résultant des interactions entre RRM1-2 et ADN-21, a été sondée. Pour ce faire, des expériences conduisant à la mesure des vitesses de relaxation  $R_1$  (vitesse de relaxation longitudinale  $1/T_1$ ) et  $R_2$  (vitesse de relaxation transversale  $1/T_2$ ) ont été menées pour RRM1-2 libre et complexé à ADN-21 à un ratio 1 : 1,2 (Figure 35.A). Dans le cas de mouvements moléculaires lents, le ratio  $R_2/R_1$  conduit à la détermination d'une quantité caractérisant la mobilité moléculaire, appelée temps de corrélation  $\tau_c$  (temps nécessaire à une

molécule pour se réorienter d'un radian) (Rossi et al. 2010).

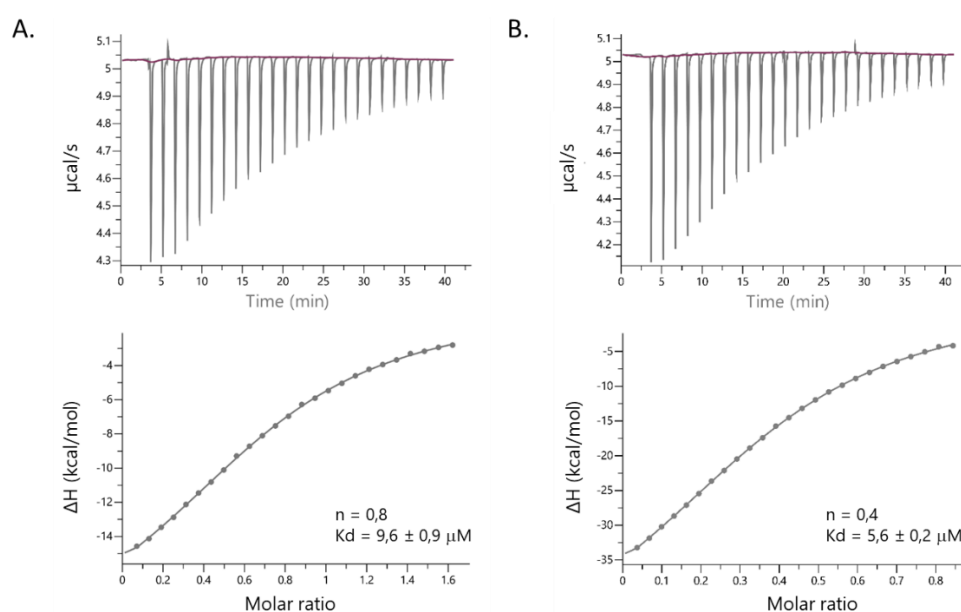


**Figure 35 :** Etude de la dynamique du complexe RRM1-2 : ADN-21. A : Vitesses de relaxation ( $R_1$  et  $R_2$ ) et temps de corrélation ( $\tau_c$ ) en fonction des résidus d'acides aminés, obtenus à 600 MHz et 310 K. En noir : relaxation de RRM1-2 libre. En couleur : relaxation de RRM1-2 complexée à ADN-21 (ratio 1 : 1,2). B : Evolution du  $\tau_c$  moyen de RRM1-2 libre (noir), RRM1-2 avec ADN-12 (rouge) et pour différents ratios d'ADN-21 (vert).

Ainsi, les valeurs de  $\tau_c$  pour RRM1-2 ont été déterminées pour les résidus T20 à N188 à partir des ratios  $R_2/R_1$  (la partie N-terminale non-structurée ayant été exclue). Sous sa forme libre, RRM1-2 est caractérisée par un  $\tau_c$  moyen de 7,6 ns. Lors de sa liaison à ADN-21, la valeur moyenne du  $\tau_c$  passe cette fois à 17,9 ns (Figure 35.A), ce qui laisserait supposer une réorientation globale du complexe 2,4 fois plus lente : ADN-21 ne pouvant être responsable à lui-seul de l'augmentation dans les  $\tau_c$  observée. Pour comprendre ces résultats, d'une part, ces mêmes expériences ont été reproduites avec



ADN-12, un ADN de 12 nt représentant la partie 5' d'ADN-21, sur lequel RRM1-2 ne peut se fixer que sous une forme monomérique. En présence d'ADN-12, la valeur moyenne du  $\tau_c$  est cette fois-ci trouvée à 13,1 ns. D'autre part, une titration par relaxation (Figure 35.B), dans laquelle le ratio RRM1-2 : ADN-21 varie, montre que l'augmentation de la concentration d'ADN-21 induit l'augmentation du  $\tau_c$  jusqu'à atteindre une valeur maximale de 20 ns au ratio 1 : 0,5 (2 RRM1-2 pour 1 ADN-21), confirmant la saturation d'ADN-21 par un dimère du tandem de HuR observée précédemment (Figure 34.C). Au-delà de ce ratio, la valeur de  $\tau_c$  diminue légèrement ( $\tau_c = 17.9$  ns au ratio 1 : 1,2) indiquant qu'un excès d'ADN-21 laisse à HuR la possibilité d'occuper davantage de sites uniques de liaison. Des expériences ITC ont également confirmé les stœchiométries  $n$  des complexes formés avec ADN-12 et ADN-21 (Figure 36.A et B), caractérisés par un  $n$  de 0,8 et de 0,4 correspondant respectivement à un état monomérique et dimérique de RRM1-2 sur ces oligonucléotides. Les valeurs de la constante de dissociation du complexe ( $K_d$ ) obtenues sont de l'ordre du  $\mu\text{M}$  ( $K_d_{\text{RRM1-2}:\text{ADN-12}} = 9,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$  et  $K_d_{\text{RRM1-2}:\text{ADN-21}} = 5,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ) et sont en adéquation avec l'échange chimique rapide observé par RMN (Figure 32.A), traduisant une affinité faible du tandem de HuR pour ADN-21.



**Figure 36 :** Expériences ITC en fonction du ratio molaire [ADN]/[RRM1-2], thermogrammes (haut) et courbes ITC (bas) de la titration de RRM1-2 (30  $\mu\text{M}$ ) par A : ADN-12 (250  $\mu\text{M}$ ) et B : ADN-21 (130  $\mu\text{M}$ ).

### I.3 Caractérisation thermodynamique et structurale de la formation du dimère de HuR le long d'ADN-21

Après avoir identifié la présence d'un dimère du tandem sur ADN-21, le positionnement de chaque unité monomérique de RRM1-2 sur ADN-21 a été suivi par RMN pour comprendre l'organisation structurale du complexe. De ce fait, RRM1-2 a été titrée avec des formes tronquées d'ADN-21 dont les tailles varient de 6 à 20 nt, par pas de deux (Matériels et méthodes, Tableau 4, ADN-6 à ADN-20), afin de visualiser au niveau de chaque RMM les changements structuraux induits par l'ajout successif de 2 nucléotides. A partir des spectres 2D acquis pour chaque ADN en présence de RRM1-2 (ratio 1 :1,2), les CSP entre RRM1-2 libre et complexée ont été calculés. Afin d'identifier l'implication progressive des RRM1 et 2 en fonction de la taille des oligonucléotides, la stratégie a consisté à travailler sur la différence des CSP (valeur absolue  $|\Delta\text{CSP}|$ ) obtenue entre un ADN de taille  $x$  nt et  $x+2$  nt par exemple (Figure 37.A). L'ensemble des résultats est représenté à l'aide d'une *heatmap* (Figure 37.B). En parallèle, des expériences ITC, menées avec ces oligonucléotides à taille variable, ont permis de suivre la progression cinétique ( $n$  et  $K_d$ ) et thermodynamique (variation d'enthalpie  $\Delta H$ ) du passage de l'état monomérique vers l'état dimérique de RRM1-2 sur ADN-21 (Tableau 8).

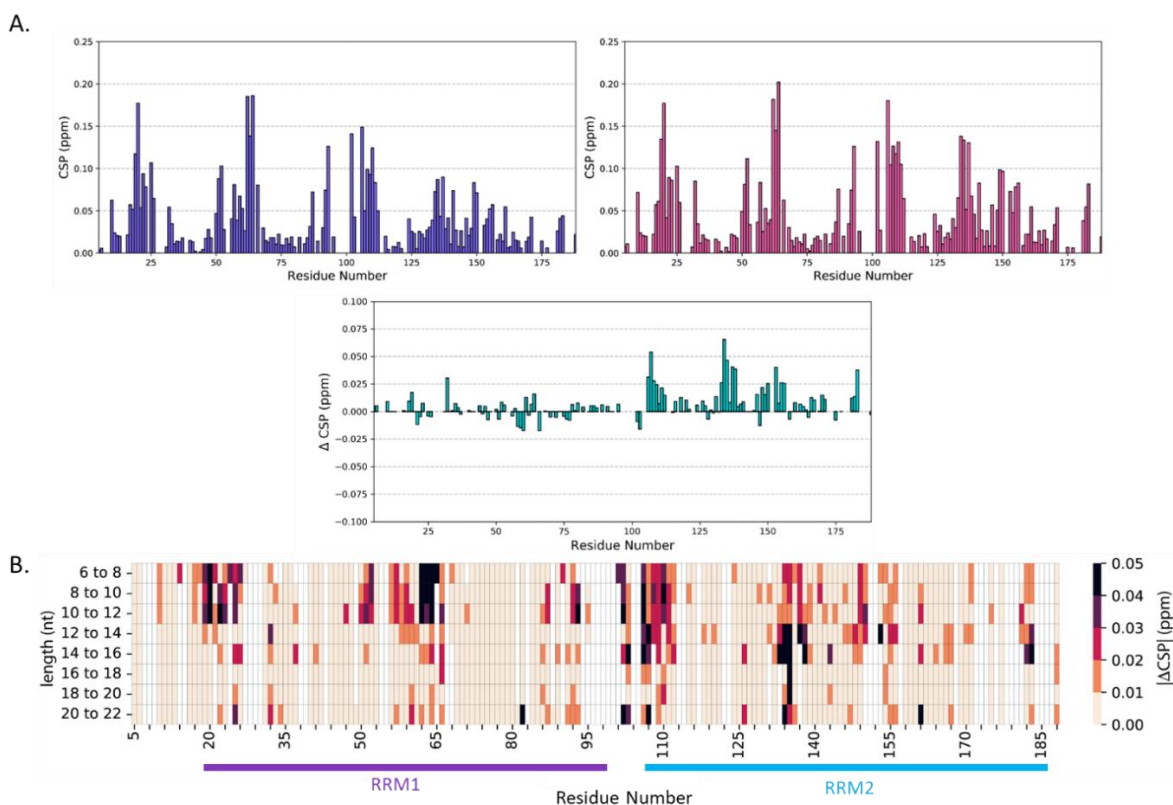


Figure 37 : Effet de l'allongement des nucléotides sur la structure de RRM1-2. A : CSP du complexe RRM1-2 : ADN-12 (gauche), du complexe RRM1-2 : ADN-14 (droite) et  $\Delta$ CSP obtenus (centre). B : *Heatmap* regroupant les  $|\Delta$ CSP| en fonction des résidus d'acides aminés de RRM1-2 pour les ADN testés.

Oligonucléotides	n	$K_d$ ( $\mu$ M)	$\Delta H$ (kcal/mol)
ADN-12 (250 $\mu$ M)	0,8	$9,6 \pm 0,9$	$-20,4 \pm 0,9$
ADN-14 (220 $\mu$ M)	0,7	$8,6 \pm 0,3$	$-28,1 \pm 0,4$
ADN-16 (200 $\mu$ M)	0,6	$4,9 \pm 0,1$	$-29,8 \pm 0,4$
ADN-18 (180 $\mu$ M)	0,5	$5,7 \pm 0,2$	$-30,1 \pm 0,4$
ADN-20 (150 $\mu$ M)	0,5	$6,5 \pm 0,3$	$-43,5 \pm 0,8$
ADN-21 (130 $\mu$ M)	0,4	$5,6 \pm 0,2$	$-52,8 \pm 1,0$

Tableau 8 : Paramètres ITC obtenus lors de la titration de RRM1-2 (30  $\mu$ M) par les ADN-12 à ADN-21.

Au long des expériences RMN, le linker entre RRM1 et RRM2 (S99-D105) ressent des  $\Delta$ CSP importants illustrant son caractère adaptatif lors du positionnement des RRM sur ADN-21. Dans le RRM1 (T20-P98), des  $\Delta$ CSP importants (supérieur à 0,05) sont

observés en présence de ADN-6 à 12 au niveau des résidus du  $\beta_1$  T20-N25 et du  $\beta_3$  G62-V66. Les  $\Delta$ CSP du RRM2 sont plus modérés et s'atténuent en fonction de l'allongement de l'ADN jusqu'à une taille de 12 nt. Ces résultats indiquent un positionnement antérieur du RRM2 vis-à-vis du RRM1, en accord avec la directionnalité du tandem révélée dans la structure 3D du PDB 4ED5 dans laquelle RRM2 puis RRM1 suivent la polarité 5'-3' de l'ARN. En d'autres termes, sur les 12 premiers nucléotides, RRM2 se lie en premier suivi par RRM1 formant ainsi la première unité monomérique de tandem, confirmée par la stœchiométrie du complexe sur ADN-12 obtenue par ITC. Lors de la complexation aux ADN de 12 à 16 nt, RRM2 semble plus affecté que RRM1. Les  $\Delta$ CSP les plus élevés sont retrouvés au niveau des résidus du  $\beta_1$  Y109-G112 et du  $\beta_2$  I133-R136 suggérant le début de l'accroche de la deuxième unité monomérique guidée par le RRM2. En effet, les titrations ITC sur ces mêmes oligonucléotides indiquent pour ADN-16 une stœchiométrie intermédiaire ( $n = 0,6$ ) qui pourrait correspondre à la liaison du premier tandem suivie par celle du RRM2 appartenant au second. L'accroche de ce second RRM2 se reflète également sur les valeurs de  $\Delta$ H qui traduit de façon générale la chaleur libérée lors de la formation d'interactions, qu'elles soient de nature liaisons hydrogènes, Van Der Waals, ioniques ou encore électrostatiques.  $\Delta$ H associé à la formation du monomère vaut -20,4 kcal/mol. En supposant qu'à partir de cette valeur, la liaison de chaque RRM, si leur contribution est équivalente, engendre un  $\Delta$ H hypothétique de -10 kcal/mol. Dans ce cas, la valeur de  $\Delta$ H obtenue lors de la titration de RRM1-2 par ADN-16 ( $\Delta$ H = -29.8 kcal/mol) confirme la liaison du RRM2 de la seconde unité monomérique. La liaison du RRM1 de la seconde unité monomérique semble avoir lieu entre 18 et 22 nt comme observé par l'augmentation modérée des  $\Delta$ CSP au niveau des résidus du  $\beta_1$  L22 et N25, de  $\alpha_1$  T32 et D34 ainsi que du  $\beta_3$  pour les résidus S60 à V66. Ces observations sont appuyées par la variation subite des paramètres ITC, indiquant la formation de nouvelles liaisons ( $\Delta$ H plus négatif). Le dimère de RRM1-2 est établi à 22 nt ( $n = 0,4$ ). Les valeurs de  $K_d$  et  $\Delta$ H indiquent que le complexe dimérique est plus favorable cinétiquement et thermodynamiquement que le complexe monomérique obtenu sur ADN-12.

L'ensemble de ces résultats attestent de l'établissement d'un dimère formé par le positionnement symétrique RRM2-RRM1-RRM2'-RRM1' (le « prime » se réfère à la deuxième unité monomérique) suivant le sens 5'-3' d'ADN-21 (Figure 38). Fait intéressant, le  $\Delta H$  du dimère est supérieur à  $2\Delta H$  du monomère signifiant l'apparition de liaisons supplémentaires indiquant l'établissement éventuel de liaisons intermoléculaires entre RRM1 et RRM2' de chaque monomère de tandem nécessaires à la stabilisation du dimère le long d'ADN-21.

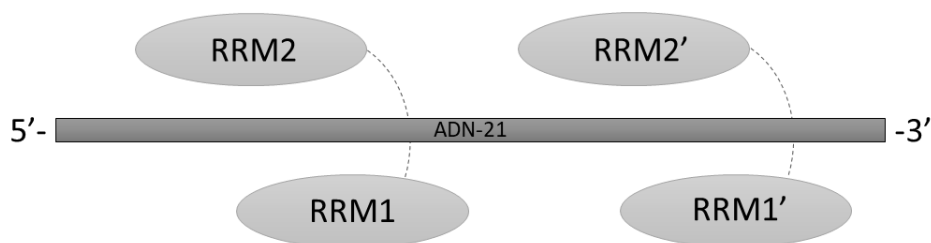
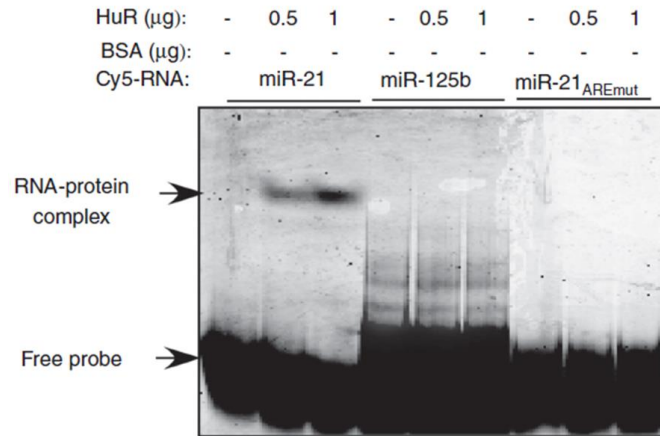


Figure 38 : Schéma du positionnement des deux unités monomériques RRM2-RRM1-RRM2'-RRM1' selon la direction 5'-3' d'ADN21.

#### I.4 Détermination des nucléotides d'ADN-21 ciblés par HuR

Précédemment, l'étude comparative entre les résidus d'acides aminés dérivés de la structure 3D 4ED5 et ceux obtenus par le calcul des CSP dans le cas de ces travaux a montré que certains résidus de RRM1-2 étaient potentiellement exclusifs à l'interaction avec ADN-21. A partir de ces observations, la question a été de savoir s'il existait des motifs au sein d'ADN-21 pouvant expliquer la spécificité de reconnaissance entre HuR et ADN-21. En se basant sur l'affinité connue de HuR pour les ARE, la séquence nucléotidique d'ADN-21 a révélé la présence de 3 régions ARE constituées chacune de 4 nucléotides : T<sub>5</sub>T<sub>6</sub>A<sub>7</sub>T<sub>8</sub>, T<sub>14</sub>G<sub>15</sub>A<sub>16</sub>T<sub>17</sub> et T<sub>17</sub>G<sub>18</sub>T<sub>19</sub>T<sub>20</sub>. Des expériences de retard sur gel EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) publiées par l'équipe de notre collaborateur avaient révélé l'importance de la séquence T<sub>5</sub>T<sub>6</sub>A<sub>7</sub>T<sub>8</sub> dans la liaison de HuR à miR-21 (Poria et al. 2016) (Figure 39).



**Figure 39 :** Expérience EMSA utilisant des ARN fluorescents (marquage Cy5) correspondant à miR-21, miR-125b (ARN non reconnu par HuR) et à miR-21 muté aux positions U<sub>5</sub>U<sub>6</sub>A<sub>7</sub>U<sub>8</sub> par CGCG incubés avec la protéine HuR puis résolus sur gel natif 8% (adapté de Poria et al. 2016).

RRM1-2 dimérisant le long d'ADN-21, il est possible d'imaginer que chaque monomère de tandem cible un motif spécifique dans la séquence d'ADN-21. Le motif T<sub>5</sub>T<sub>6</sub>A<sub>7</sub>T<sub>8</sub> en 5' d'ADN-21 pourrait alors accommoder la première unité monomérique constituée par RRM1 et RRM2. En tenant compte de l'encombrement stérique généré par la présence du dimère, le second motif T<sub>17</sub>G<sub>18</sub>T<sub>19</sub>T<sub>20</sub> en 3' d'ADN-21 pourrait, de ce fait, accueillir la seconde unité monomérique constituée cette fois par RRM1' et RRM2'. Puisque les ADN utilisés dans cette étude ne sont pas marqués isotopiquement, appliquer la même démarche d'investigation des CSP (identique à celle effectuée du côté de la protéine) n'est alors pas envisageable. Sur la base des résultats EMSA indiquant une non-affinité de HuR pour les répétitions CG, ADN-CG1 et ADN-CG2 mutés aux positions 5' et 3' indiquées (T<sub>5</sub>T<sub>6</sub>A<sub>7</sub>T<sub>8</sub> et T<sub>17</sub>G<sub>18</sub>T<sub>19</sub>T<sub>20</sub>) ont été, par conséquent, testés par ITC afin d'identifier leur impact sur la liaison à RRM1-2 (Tableau 9).

Oligonucléotides	n	Kd ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta\text{H}$ (kcal/mol)
ADN-21	0,4	$5,6 \pm 0,2$	$-52,8 \pm 1,0$
ADN-CG1	0,5	$5,5 \pm 0,2$	$-36,0 \pm 0,6$
ADN-CG2	0,5	$6,2 \pm 0,2$	$-48,8 \pm 0,9$
ADN-CG3	PAS DE LIAISON		

Tableau 9 : Paramètres ITC obtenus lors de la titration de RRM1-2 (30  $\mu\text{M}$ ) par ADN-21 et ses mutants CG (ADN-CG1 à ADN-CG3, 130  $\mu\text{M}$ ).

La mutation du premier motif  $\text{T}_5\text{T}_6\text{A}_7\text{T}_8$  (ADN-CG1) permet toujours la dimérisation de RRM1-2. Cependant, comparativement à ADN-21, cette mutation engendre une augmentation du  $\Delta\text{H}$  de +16,8 kcal/mol traduisant une déstabilisation du complexe formé par une perte de liaisons. Ces résultats indiquent effectivement l'importance de ce motif pour la liaison de RRM1-2 à ADN-21. La mutation du deuxième motif  $\text{T}_{17}\text{G}_{18}\text{T}_{19}\text{T}_{20}$  (ADN-CG2) potentiellement ciblé par HuR induit très peu de variations : la stœchiométrie du complexe est maintenue et une légère augmentation du  $\Delta\text{H}$  (+4 kcal/mol) est observée, traduisant ainsi une non-spécificité de HuR vis-à-vis des nucléotides trouvés entre les positions 17 à 20 sur ADN-21. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'il n'existe pas 2 motifs spécifiques ciblés respectivement par chaque unité monomérique de tandem de HuR. Finalement, le troisième motif ARE,  $\text{T}_{14}\text{G}_{15}\text{A}_{16}\text{T}_{17}$  (ADN-CG3), a été muté puis testé par ITC afin de valider l'hypothèse du ciblage motif-spécifique d'ADN-21 par HuR. Étonnamment, cette mutation a permis d'abolir complètement la liaison de RRM1-2 à ADN-21 (Tableau 9) indiquant le rôle critique de ce motif pour la formation du dimère. En effet, l'analyse rétrospective des résultats de la partie I.3 (Figure 37.B) a également mis en évidence l'importance de ces nucléotides pour l'accroche de RRM1-2 à ADN-21. Néanmoins, leur implication structurale au niveau des RRM de chaque monomère de tandem reste encore à éclaircir.

Pour déterminer les nucléotides responsables de la complexation suivant l'ordre RRM2-RRM1-RRM2'-RRM1' sur ADN-21 (Figure 38, partie I.3), les CSP issus de chacun

des spectres 2D de RRM1-2 en présence de mutants ponctuels d'ADN-21 (ADN-T1G à ADN-A22C) ont été calculés (Figure 40.A). Les CSP sommés individuellement sur RRM1 et RRM2 ont permis de mettre en lumière l'importance de certains nucléotides dans la liaison. ADN-21 étant simple brin et non structuré tout un ensemble de conformations est envisageable au sein du complexe. Ainsi connaître l'orientation des nucléobases vis-à-vis de certains résidus d'acides aminés pourrait servir de point de départ pour construire le modèle d'interaction entre RRM1-2 et ADN-21 (Figure 40.B).

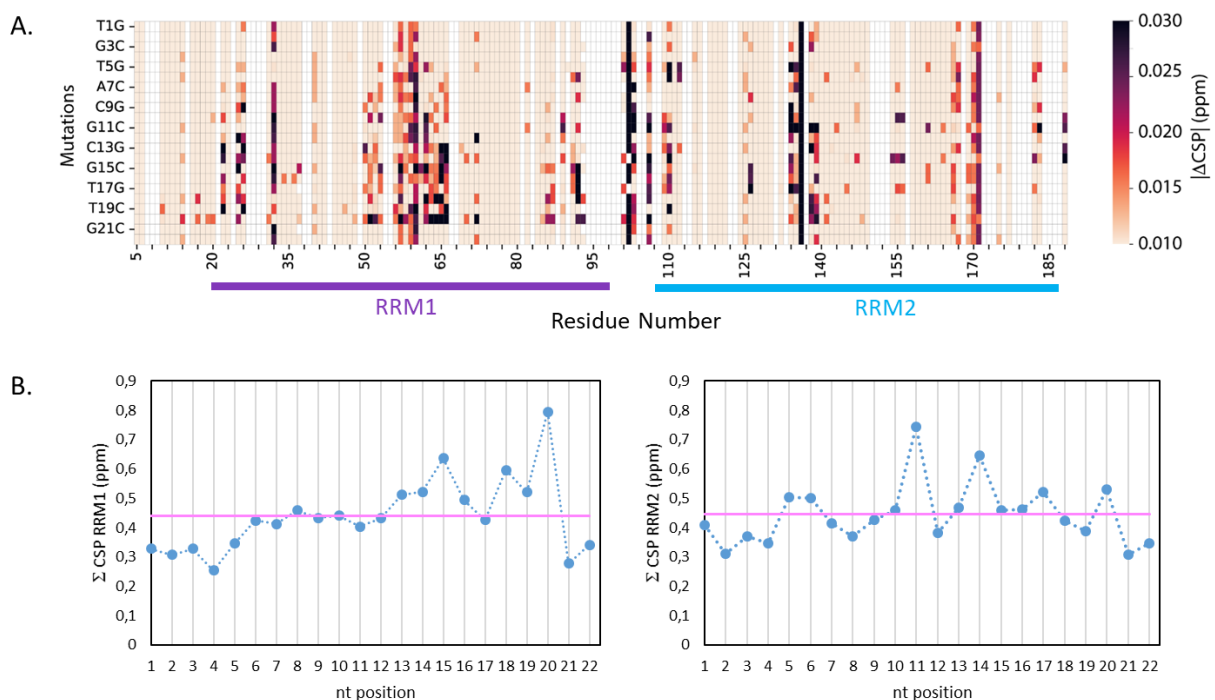
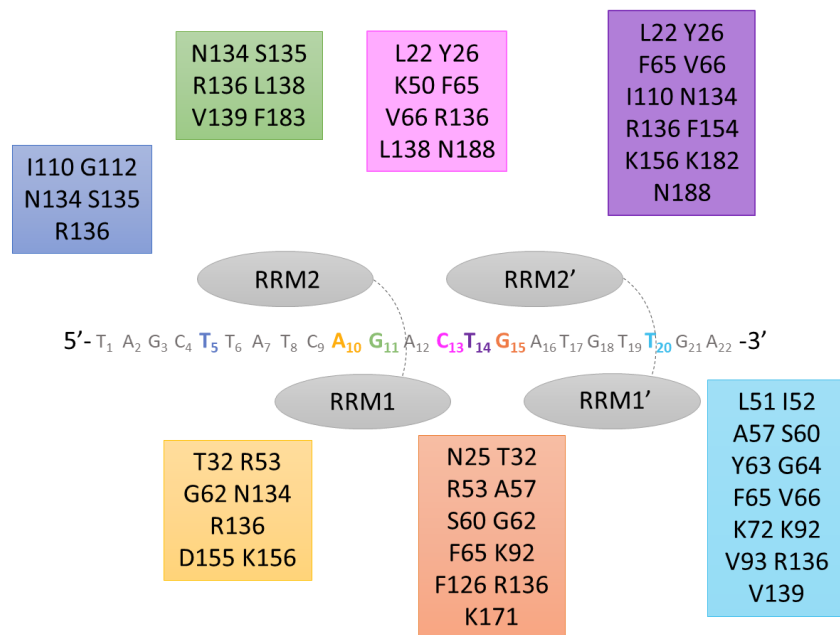


Figure 40 : CSP obtenus pour les mutations ponctuelles d'ADN-21. A : Heatmap des  $|\Delta\text{CSP}|$  obtenus entre RRM1-2 : ADN-21 et RRM1-2 en présence des ADN mutés (ADN-T1G à ADN-A22C). B : Somme des  $|\Delta\text{CSP}|$  pour RRM1 (gauche) et RRM2 (droite) en présence des ADN mutés (moyenne en magenta).

D'après les résultats présentés ci-dessus, l'évaluation des  $|\Delta\text{CSP}|$  semble indiquer une non implication des 4 premiers nucléotides à la liaison de RRM1-2 sur ADN-21. Comme démontré précédemment, l'initiation à la liaison se fait bien par RRM2 au niveau de T5-T6, deux nucléotides appartenant au motif ARE dont la mutation impactait la formation du complexe. La mutation des nucléotides T<sub>8</sub> et A<sub>10</sub> perturbe majoritairement les résidus d'acides aminés du RRM1 en accord avec le modèle selon lequel RRM1 vient



se positionner en aval de RRM2. Les  $|\Delta\text{CSP}|$  élevés observés dans RRM2 lors de la mutation du nucléotide G<sub>11</sub> semblent désigner la fin de son interaction avec ADN-21. La présence de  $|\Delta\text{CSP}|$  sur les résidus du RRM1 lors de la mutation des nucléotides C<sub>13</sub> et T<sub>14</sub> laisse penser que RRM1 peut interagir avec les nucléotides centraux d'ADN-21. La mutation du résidu T<sub>14</sub> induit également des  $|\Delta\text{CSP}|$  importants dans RRM2 pouvant alors correspondre au premier nucléotide nécessaire à l'accroche de la deuxième unité monomérique conduite par RRM2', RRM1' débutant quant à lui sa liaison au nucléotide G<sub>15</sub>. La présence du nucléotide T<sub>17</sub> et du couple G<sub>18</sub>-T<sub>19</sub> joue un rôle probable dans le maintien respectif de RRM2' et de RRM1'. La dernière mutation perturbant les résidus d'acides aminés de RRM1-2 est celle effectuée sur T<sub>20</sub>, désignant ce résidu comme le dernier nécessaire à l'accroche de la deuxième unité monomérique RRM2'-RRM1'. Ainsi l'organisation du dimère sur ADN-21 semble indiquer un positionnement de RRM2 allant de T<sub>5</sub> à G<sub>11</sub>, de RRM<sub>1</sub> de T<sub>8</sub> à T<sub>14</sub> puis pour le deuxième monomère RRM2' allant de C<sub>14</sub> à T<sub>20</sub> pour finir avec RRM1' de G<sub>15</sub> à T<sub>20</sub> (Figure 41).



**Figure 41 :** Schéma du positionnement potentiel des deux unités monomériques sur ADN-21 et mise en évidence des résidus d'acides aminés impactés par les différentes mutations ponctuelles d'ADN-21.

## I.5 Identification de la proximité spatiale entre unités monomériques

Les résultats ITC de l'étude comparative entre monomère et dimère (I.3, Tableau 8) suggéraient à travers les valeurs  $\Delta H$  obtenues l'éventualité d'interactions intermoléculaires stabilisatrices à la formation du dimère. Les mutations ponctuelles effectuées sur ADN-21 (partie I.4, Figure 41) indiquent un partage de certains nucléotides ( $C_{13}$  et  $T_{14}$ ) entre RRM1 et RRM2', appartenant à chacune des unités monomériques.  $T_{14}$  est retrouvé dans le motif ARE  $T_{14}G_{15}A_{16}T_{17}$  pour lequel la mutation en CGCG inhibait complètement l'interaction entre RRM1-2 et ADN-21 et qui semblait se situer à l'interface entre RMM1 et RRM2'. Pour confirmer l'éventuelle proximité entre ces RRM, d'une part, des expériences RMN PRE basées sur l'introduction d'une sonde paramagnétique MTSL sur un résidu d'acide aminé préalablement muté en Cystéine (Matériels et méthodes, III.6) ont été conduites. 4 mutants greffés au MTSL aux positions RRM1-2-C13A-N21C (N21C), RRM1-2-C13A-D34C (D34C), RRM1-2-C13A-L138C (L138C) et RRM1-2-C13A-A184C (A184C) ont été sélectionnés à partir de la structure 3D 4ED5 sur laquelle ils apparaissent proches des extrémités 5' et 3' de l'ARN (Figure 42).

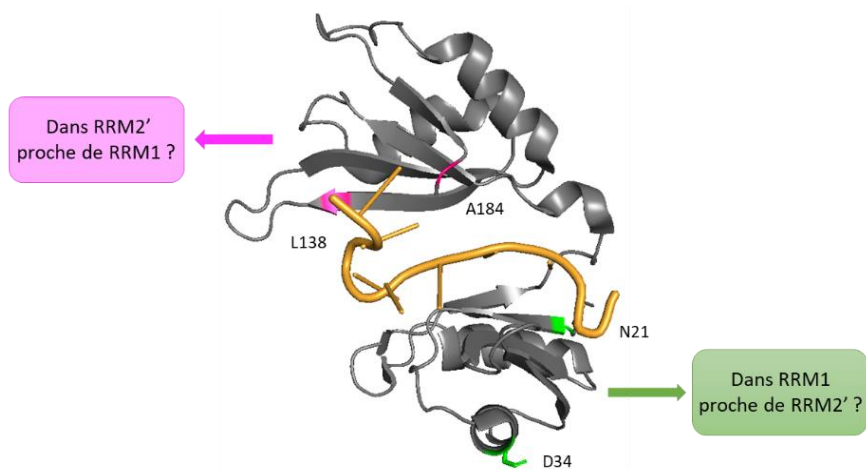


Figure 42 : Position dans la structure 3D 4ED5 des mutants sélectionnés pour les expériences RMN PRE et leurs effets supposés.

Des spectres 2D de ces mutants en présence d'ADN-21 (ratio 1 : 0,5) ont été enregistrés dans leurs formes paramagnétique et diamagnétique. Le ratio des intensités ( $I_{para}/I_{dia}$ ) relevées dans chacun des deux spectres a été déterminé pour l'ensemble des résidus de RRM1-2 (Figure 43.A et B).

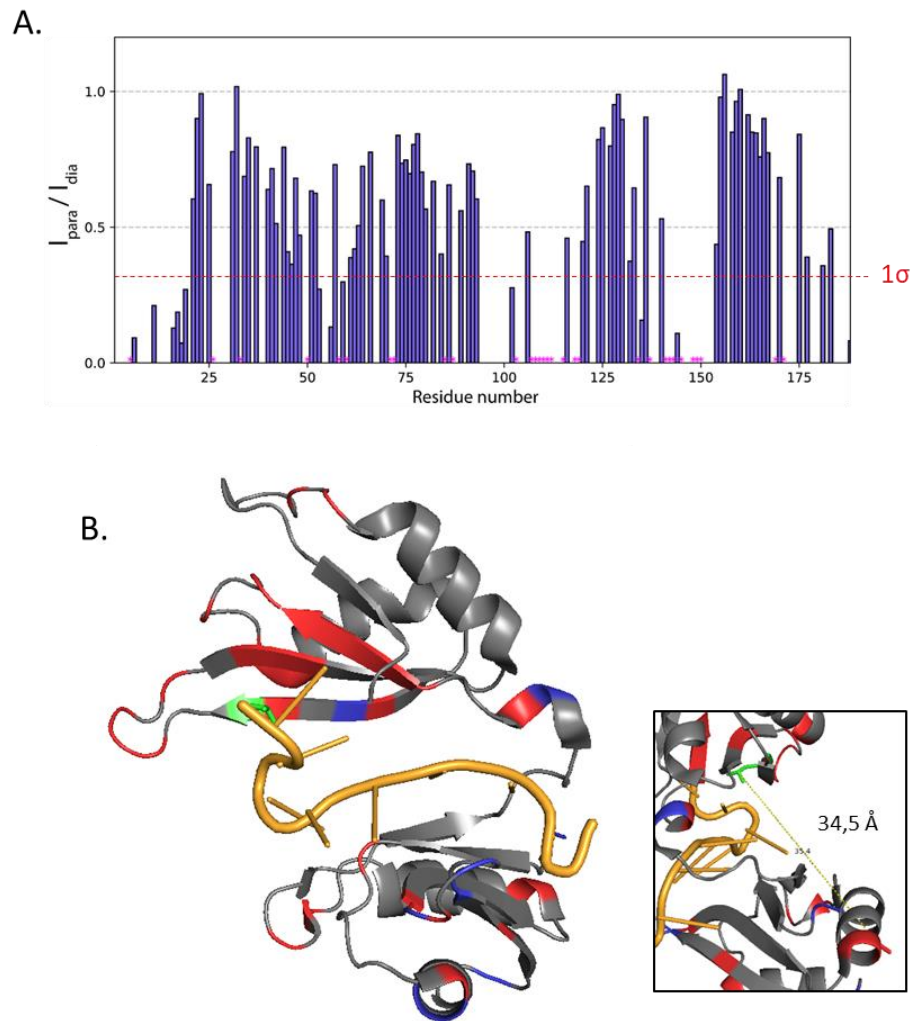
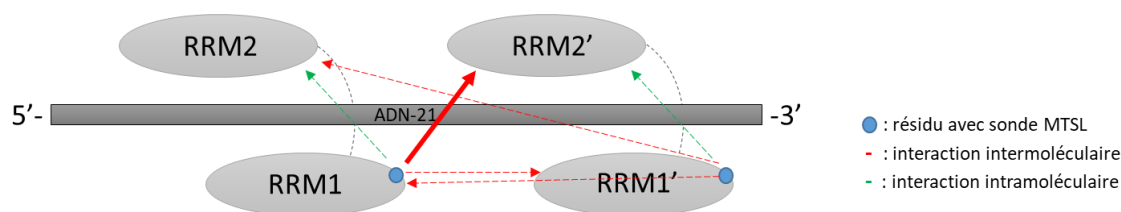


Figure 43 : Proximité entre les deux unités monomériques. A : Résultats MTSL ( $I_{para}/I_{dia}$ ) obtenus sur l'exemple du mutant L138C (étoiles : disparitions provoquées par la sonde MTSL et ligne rouge à  $1\sigma$ ). B : Effets reportés sur la structure 3D 4ED5. Résidu L138C en vert, disparitions en rouge et résidus possédant un ratio  $I_{para}/I_{dia}$  inférieur à  $1\sigma$  en bleu (encart : distance entre L138 et K72).

Les expériences MTSL ont été réalisées sur des échantillons contenant uniquement des protéines RRM1-2 marquées au MTSL. De ce fait, les résultats obtenus correspondent à une moyenne d'interactions intra et intermoléculaires (Figure 44). Seuls les résidus

apparaissant à une distance supérieure à 20 Å sur la structure 3D 4ED5 ont été considérés comme pertinents puisque leur position au sein du monomère respectivement à celle du MTSL ne peut a priori pas conduire à une réduction drastique de l'intensité du signal ou à sa disparition totale (Tableau 10).



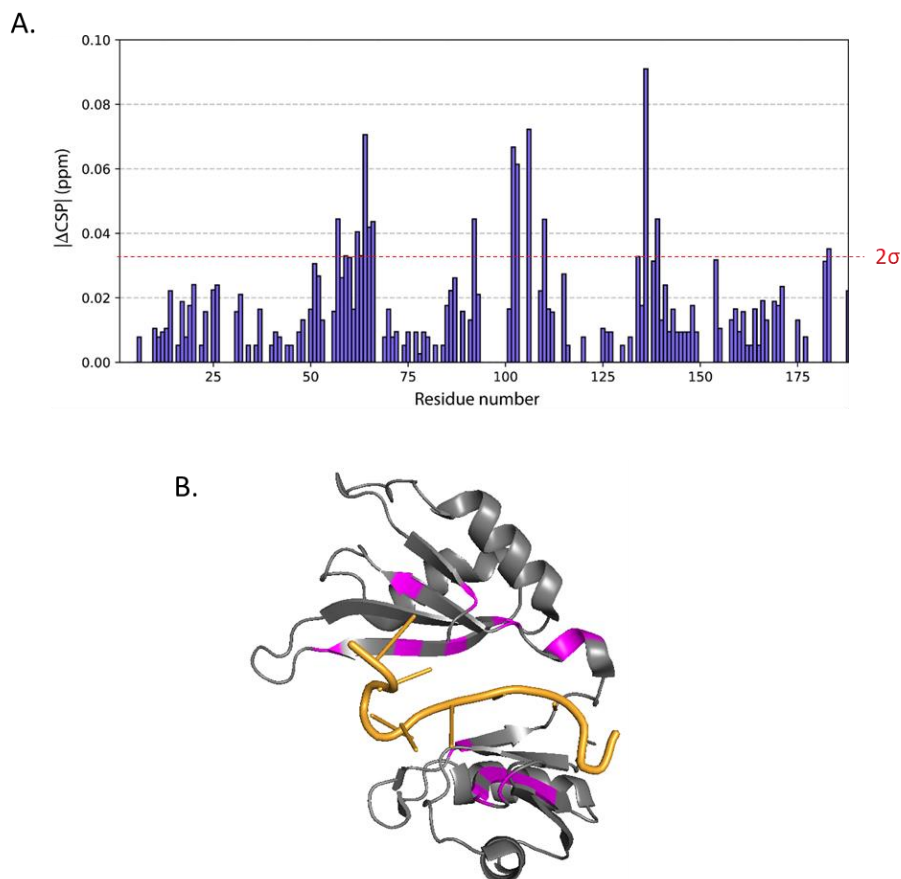
**Figure 44 :** Schéma représentant les différents types d'interactions (intra et intermoléculaire) au sein du dimère RRM1-2 : ADN-21 liées à la présence de la sonde MTSL sur un résidu d'acide aminé.

	RRM1	RRM2
N21C	V56 Q87	R115 Q141 S158
D34C	A71	Q119 Q141 T142 F183
L138C	Q33 K50 R53 V56 G58 H59 S60 A71 K72 Q87	
A184C	L22 D34 F40 G64 T70 A71 K72 Q87 Y95	Q141

**Tableau 10 :** Liste des résidus impactés par les mutants MTSL à une distance supérieure à 20 Å (en rouge, résidus dont les signaux RMN disparaissent et en bleu, résidus caractérisés par un ratio  $I_{para}/I_{dia}$  inférieur à 1σ).

Les mutants L138C et A184C semblent influencer un certain nombre de résidus du RRM1 situés à plus de 20 Å dans la structure 3D 4ED5 (encart Figure 43.B) ne pouvant être la résultante d'interactions intramonomériques. Les résidus d'acides aminés L138 et A184 de RRM2' pourraient alors se trouver à proximité de l'interface avec RRM1. Suivant le même raisonnement, le résidu D34 de RRM1 serait alors à proximité de l'interface avec RRM2'. Le mutant N21C affecte les mêmes résidus de RRM2' cependant

de façon plus modérée indiquant l'éloignement de ce résidu vis-à-vis de l'interface. En parallèle de ces expériences MTSL, des expériences 2D ont conduit au calcul des CSP lors de la formation du complexe RRM1-2 : ADN-CG3 (ratio 1 :1,2). Bien que les expériences ITC ont conclu à une absence de liaison de RRM1-2 à ADN-CG3, le spectre RMN de ce même complexe montre que des CSP persistent, indiquant que la liaison s'effectue à une  $K_d$  très défavorable, non détectée lors de la titration ITC. De ce fait, les  $|\Delta\text{CSP}|$  entre RRM1-2 : ADN-21 et ce complexe ont été déterminées afin de visualiser l'impact de la mutation du motif ARE  $T_{14}G_{15}A_{16}T_{17}$  en CGCG à la frontière des deux unités monomériques (Figure 45.A et B). Ces résultats ont été confrontés à l'impact des mutations MTSL engendré d'une unité monomérique à l'autre (Figure 42).



**Figure 45 :** Etude du complexe RRM1-2 : ADN-CG3 par RMN. A :  $|\Delta\text{CSP}|$  obtenus entre RRM1-2 : ADN-21 et RRM1-2 : ADN-CG3 (ligne rouge à  $2\sigma$ ). B :  $|\Delta\text{CSP}|$  supérieurs à  $2\sigma$  issus reportés sur la structure 3D 4ED5 (en magenta).

La mutation de l'ADN en position T<sub>14</sub>G<sub>15</sub>A<sub>16</sub>T<sub>17</sub> (ADN-CG3) induit des ΔCSP élevés sur des résidus d'acides aminés (A57, H59, S60, G62, Y63, G64, F65, V66, K92, I110, N134, R136, V139, F154 et F183, Figure 45.B) appartenant aux mêmes régions que ceux impactés par la sonde MTSL des mutants D34C, L138C et A184C confirmant le partage de ce motif ARE entre RRM1 et RRM2' de chaque unité monomérique, comme suggéré en partie I.4 (Figure 46).

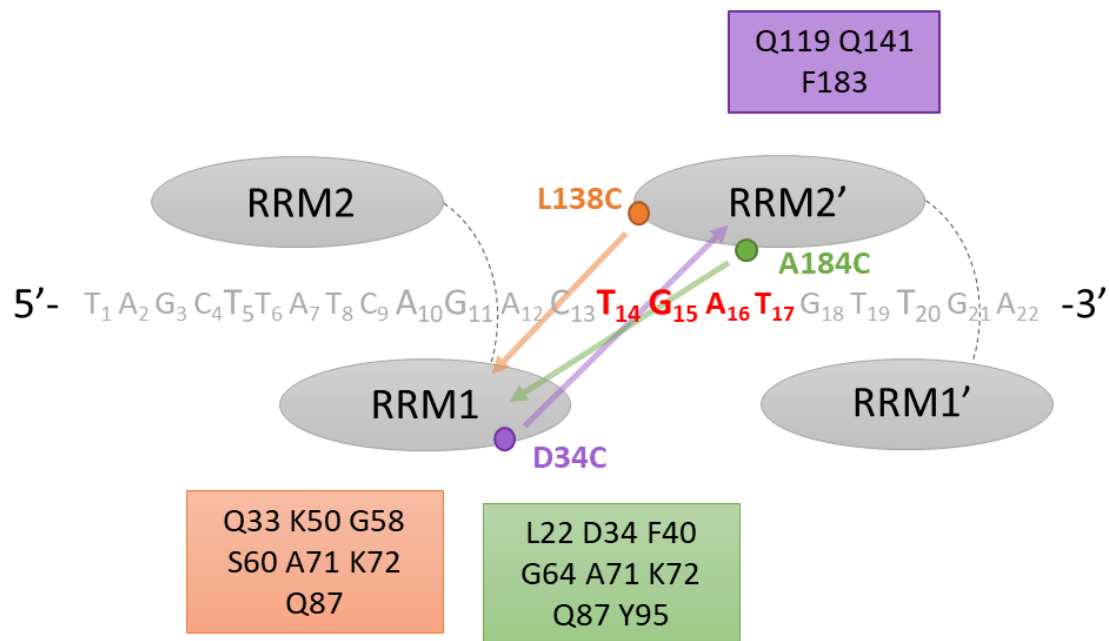
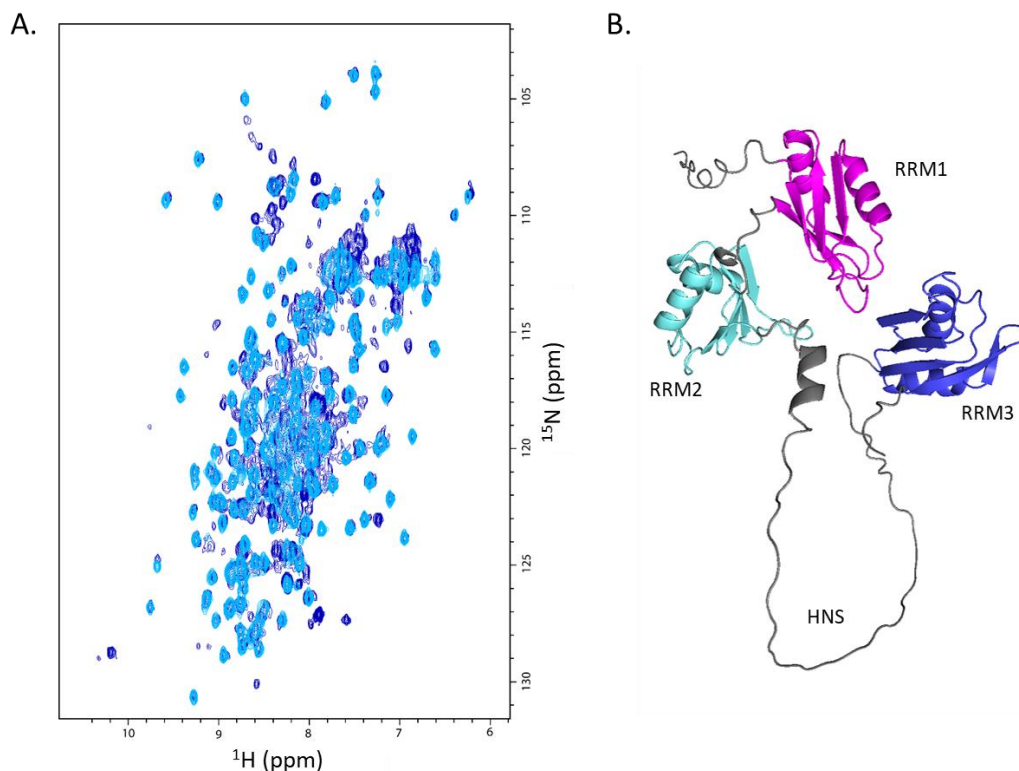


Figure 46 : Schéma représentant le dimère RRM1-2 sur ADN-21 indiquant la proximité entre RRM1 et RRM2', confirmée par les expériences MSTL (flèche : effets des mutants MTSL), interagissant via le partage du motif T<sub>14</sub>G<sub>15</sub>A<sub>16</sub>T<sub>17</sub> d'ADN-21.

## II. Etude in vitro de HuR pleine longueur

Au cours de ces travaux, après plusieurs étapes d'optimisation et grâce aux techniques d'ingénierie protéique développées au laboratoire, la protéine sauvage pleine longueur de HuR (HuR-FL) a été produite et purifiée avec succès. Cet accomplissement a ainsi offert la possibilité d'étudier HuR au plus proche des conditions natives afin de confronter les nouvelles données aux résultats dérivés de la partie I et de caractériser lors de la liaison à ADN-21 le rôle de chaque RRM.

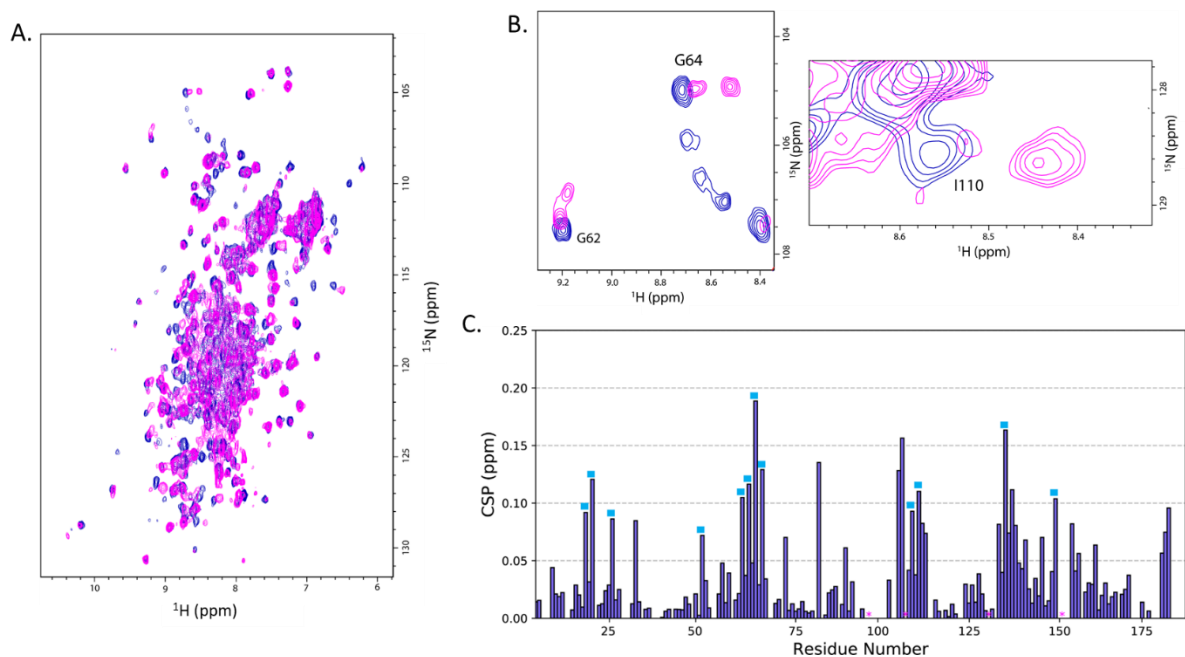
Les expériences RMN ont conduit à un spectre 2D de HuR-FL libre en solution dont les signaux dans l'ensemble sont bien résolus et caractéristiques d'une protéine repliée. La comparaison de ce spectre à celui de RRM1-2(MOPS) indique la présence du RRM3 et du domaine HNS dont les résonances sont moins intenses et moins résolues comparativement à celles émanant du tandem, conséquences intrinsèques aux problèmes de solubilité du RRM3 déjà reportés (Scheiba et al. 2014; Pabis et al. 2019; Ripin et al. 2019). Cette comparaison montre surtout que la structure du tandem dans HuR-FL est identique à la forme tronquée RRM1-2 étudiée précédemment (Figure 47.A). Ces observations illustrent l'individualité respective du tandem RRM1-2 et de RRM3, probablement liée à la présence d'une soixantaine de résidus d'acides aminés constituant la région HNS non structurée. En effet, la flexibilité apportée par cette région permet au tandem et à RRM3 d'avoir une dynamique qui leur est propre (Figure 47.B).



**Figure 47 :** HuR-FL. A : Spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de HuR-FL libre (bleu foncé, HSQC) et RRM1-2(MOPS) libre (bleu clair, SOFAST) obtenus à 600 MHz et à 310 K. B : Structure 3D de HuR-FL prédite par AlphaFold (AF-Q15717-F1) (Varadi et al. 2022; Jumper et al. 2021).

## II.1 Dimérisation coopérative de HuR sur ADN-21

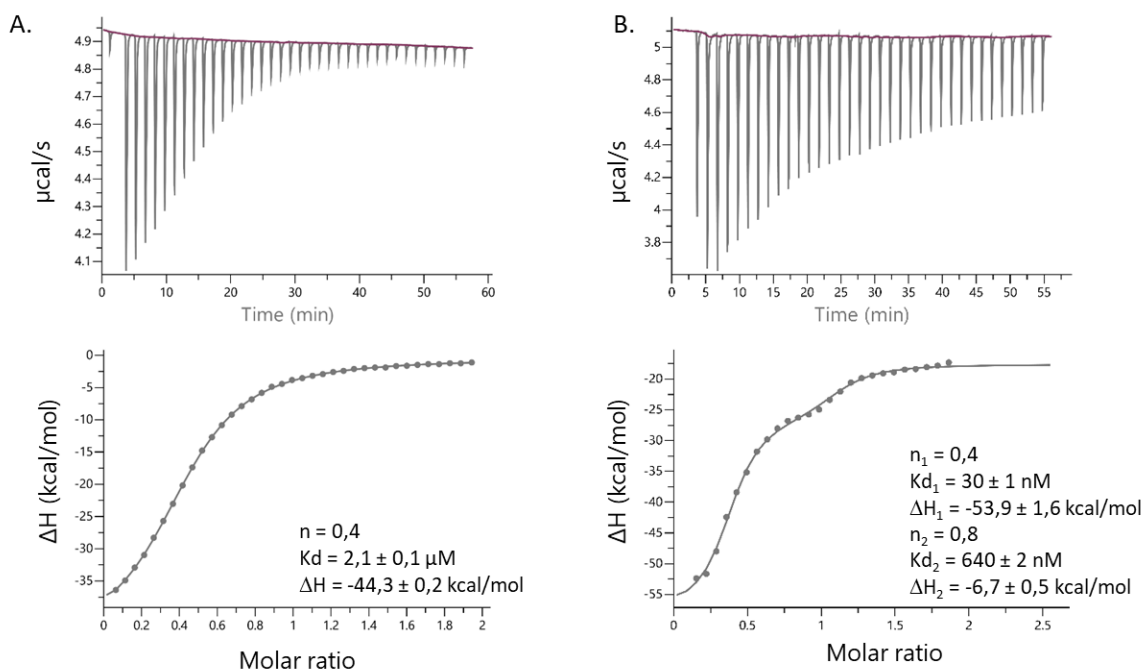
Dans un premier temps, le spectre 2D de HuR-FL en présence d'ADN-21 a été acquis (Figure 48.A). De même que pour la forme tronquée RRM1-2 (partie I.1, Figure 32.A) la liaison à ADN-21 de HuR-FL induit des CSP et des disparitions de résonances, signe de la formation du complexe. Néanmoins, la vitesse d'échange semble passer d'un régime rapide observé pour RRM1-2 (partie I.1, Figure 32.B) à lent pour RRM1-2 dans HuR-FL (RRM1-2-FL). En effet, deux populations en équilibre apparaissent aux déplacements chimiques des résidus d'acides aminés appartenant au tandem (Figure 48.B). Les résidus d'acides aminés caractérisés par des CSP supérieurs à  $2\sigma$  ou par des disparitions (Figure 48.C) sont les mêmes que ceux trouvés dans le cas de RRM1-2 : ADN-21 (partie I.1, Figure 32.C).



**Figure 48** : Liaison de HuR-FL à ADN-21. A : Spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de HuR-FL libre (bleu) et complexée à ADN-21 à un ratio 1 :1,2 (magenta) obtenus à 600 MHz et à 310 K. B : Zoom sur des résidus en échange lent. C : CSP du tandem (échange lent, carrés bleus) et disparitions (étoiles) induits par la liaison de HuR-FL à ADN-21. La ligne rouge indique 2 fois l'écart-type ( $2\sigma$ ). Non représentés : prolines et signaux non attribués.



Par la suite, la complexation de HuR-FL a été étudiée par ITC afin de caractériser la cinétique et la thermodynamique du système et de comparer ces résultats à ceux de la titration de RRM1-2 par ADN21 (Figure 49.A). L'isotherme ITC obtenue pour le complexe HuR-FL : ADN-21 résulte de la superposition de deux sigmoïdes caractérisant respectivement un état dimérique ( $n = 0,4$ ) et monomérique ( $n = 0,8$ ) du complexe formé (Figure 49.B). Chaque sigmoïde est caractérisée par des valeurs de  $K_d$  et  $\Delta H$  qui lui sont propres : à l'état dimérique, le complexe possède une  $K_{d1}$  de 30 nM, 20 fois plus faible que la  $K_{d2}$  de 640 nM pour l'état monomérique. Un facteur 10 est retrouvé entre les valeurs  $\Delta H_1$  et  $\Delta H_2$ . Ces valeurs de  $K_d$  et de  $\Delta H$  montrent une affinité et une stabilité accrues du dimère pour ADN-21, traduisant une coopérativité d'interaction lors de la dimérisation.

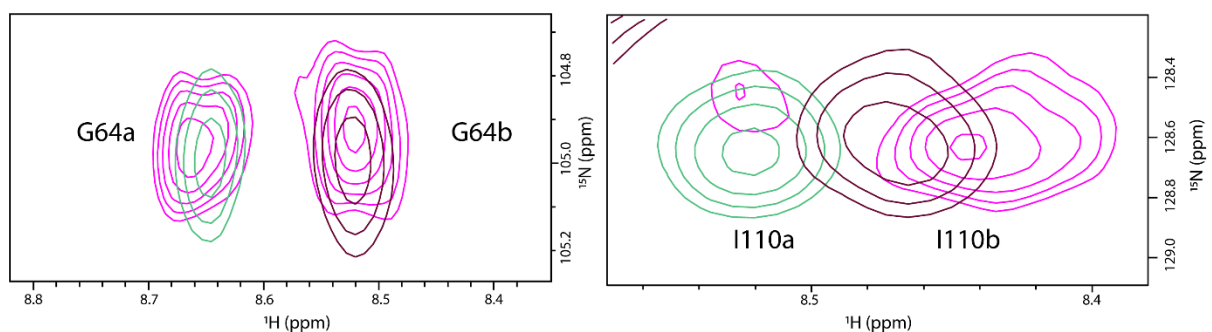


**Figure 49:** Expériences ITC en fonction du ratio molaire [ADN]/[HuR-FL]. Thermogrammes et isothermes ITC obtenus à la suite de la titration par ADN-21 (230  $\mu\text{M}$ ) de RRM1-2 20  $\mu\text{M}$  (A) et de HuR-FL 20  $\mu\text{M}$  (B).

La comparaison entre la titration de HuR-FL et celle du tandem montre que la constante de dissociation  $K_d$  lors de la formation du dimère ( $n = 0,4$ ) passe du  $\mu\text{M}$  pour le tandem RRM1-2 au nM pour HuR-FL ( $K_{d1}$ ), traduisant une affinité environ cent fois plus forte pour ADN-21. Structuralement, l'unique différence entre ces deux systèmes

est liée à la présence de la région HNS et du RRM3. Ces domaines semblent alors jouer un rôle dans le maintien et la stabilisation de HuR le long d'ADN-21, se reflétant également sur la valeur du  $\Delta H_1$  qui passe de  $-44,3$  kcal/mol à  $-53,9$  kcal/mol. L'augmentation de la stabilité du complexe serait la conséquence de la création de liaisons supplémentaires comme indiqué par la valeur du  $|\Delta\Delta H|$  ( $9,6$  kcal/mol). Ces liaisons supplémentaires peuvent être la résultante de l'homodimérisation du RRM3 par le biais du résidu d'acide aminé W261 (Introduction IV.1) et d'interactions entre tandems puisqu'une proximité entre RRM1 et RRM2' a été évoquée plus tôt (partie I.5).

A l'issue des expériences ITC, un équilibre de complexes monomériques et dimériques a été mis en évidence lors de la titration de HuR-FL par ADN-21 (Figure 49.B). De plus, les spectres RMN ont montré que les résidus d'acides aminés du tandem RRM1-2-FL étaient en échange lent lors de la complexation. La comparaison du spectre 2D HuR-FL : ADN-21 aux spectres 2D RRM1-2(MOPS) respectivement en complexe avec ADN-21 et ADN-12 a permis d'identifier que cet équilibre implique des monomères et dimères de tandems. En effet, sur l'exemple de plusieurs résidus, les déplacements chimiques respectifs des deux états *a* et *b*, dont les populations sont égales comme en atteste l'intensité de leur signal RMN respectif, coïncident avec le déplacement chimique obtenu lors de la formation du complexe RRM1-2(MOPS) : ADN-21 (dimère) et celui résultant de la formation du complexe RRM1-2(MOPS) : ADN-12 (monomère) (Figure 50).



**Figure 50 :** Equilibre entre monomères et dimères de tandems RRM1-2 exemplifié par les résidus G64a et b (RRM1) et I110a et b (RRM2). Superpositions et zooms sur les spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HuR-FL en complexe avec ADN-21 (magenta, HSQC), RRM1-2(MOPS) en complexe avec ADN-21 (marron, SOFAST) et avec ADN-12 (vert, SOFAST), obtenus à 600 MHz et 310K.

## II.2 Rôle du RRM3

Les résultats présentés ci-dessus indiquent que la présence du RRM3 dans HuR-FL (RRM3-FL) semble importante pour la stabilisation du dimère. La question de la participation directe ou indirecte du RRM3 à la formation du complexe HuR-FL : ADN-21 se pose alors. En effet, récemment, il a été montré que le RRM3 est capable de se lier aux ARE d'ARN (Ripin et al. 2019b; Pabis et al. 2019b) et cette liaison est également observée par RMN et ITC lors de la titration de RRM3 par ADN-21 (Figure 51.A, B et C).

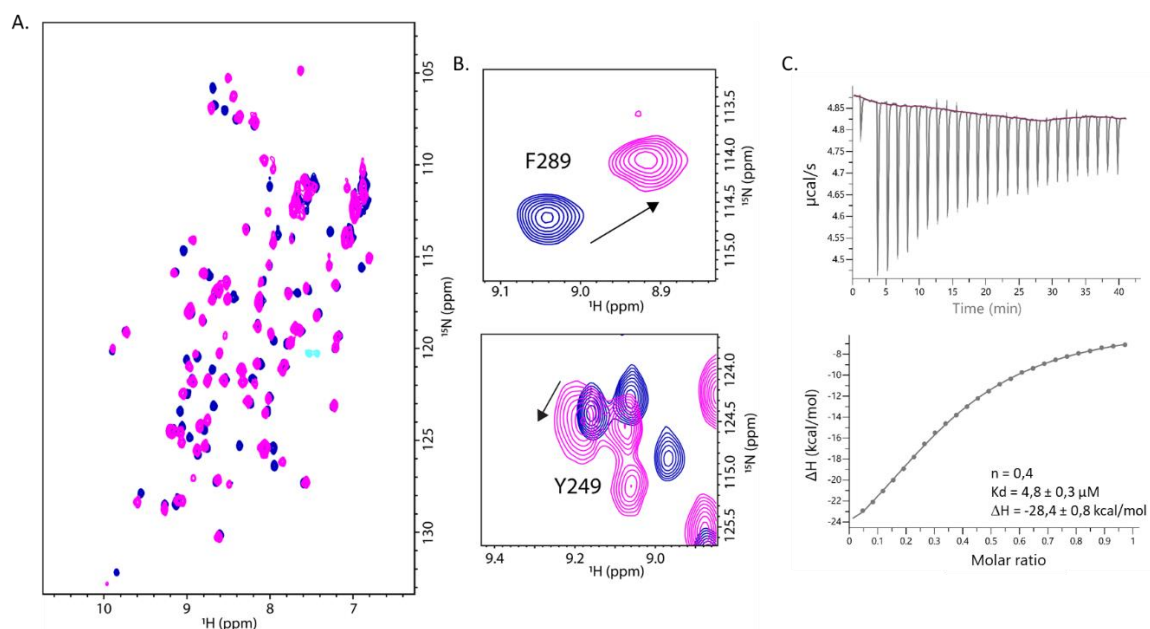
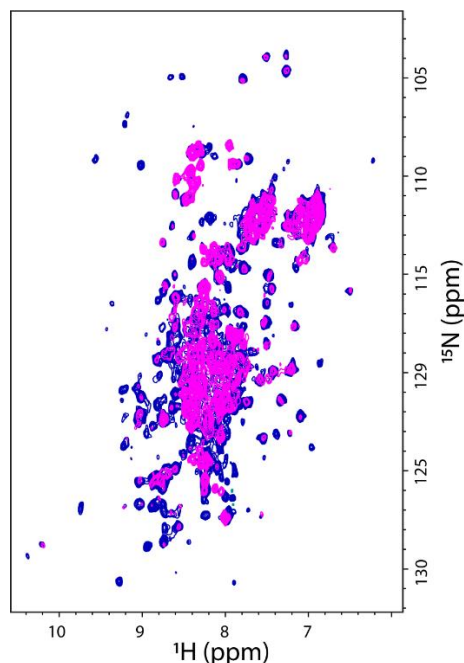


Figure 51 : Etude de RRM3. A : Spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST de RRM3 libre (bleu) et complexée à ADN-21 à un ratio 1 :1,2 (magenta) obtenus à 600 MHz et 310 K. B : Zoom sur des résidus impactés par la liaison à ADN-21 montrant des CSP. C : Thermogramme (haut) et courbe ITC (bas) de la titration de RRM3 (20  $\mu\text{M}$ ) par ADN-21 (230  $\mu\text{M}$ ).

Le spectre RMN 2D de RRM3 en complexe avec ADN-21 est caractéristique d'un échange rapide et montre notamment l'apparition de CSP sur les résidus d'acides aminés de liaison à l'ARN (Figure 51.A et B). L'expérience ITC indique la formation d'un dimère de RRM3 sur ADN-21 avec une affinité de l'ordre du  $\mu\text{M}$  comparable au  $K_d$

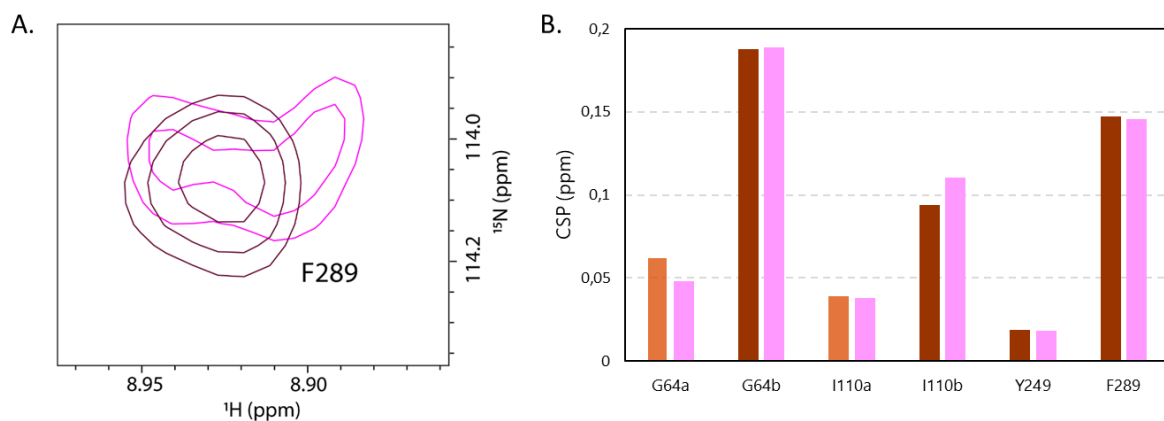
obtenu lors de la titration de RRM1-2. La variation d'enthalpie  $\Delta H$  (-28,4 kcal/mol) est environ 2 fois plus faible que celle obtenue dans le cas du tandem (-44,3 kcal/mol; Figure 49), cohérent avec la titration de 2 RRM3 contre 2 RRM1-2 (soit 4 RRM).

L'étude de HuR-FL en présence d'ADN-21 a laissé apparaître qu'il existait un équilibre entre monomères *a* et dimères *b* de tandems RRM1-2-FL (Figure 50). Dans le cas du dimère RRM1-2-FL ( $K_{d1} = 30$  nM), l'hypothèse selon laquelle RRM3-FL se lie conjointement aux tandems sur ADN-21 semble peu probable. En effet, dû à l'encombrement stérique, les 22 nucléotides d'ADN-21 ne permettent pas la liaison supplémentaire de RRM3-FL. La question reste à savoir si, dans le cas du monomère de tandem ( $K_{d2} = 640$  nM), RRM3-FL se lie également à ADN-21. En présence d'ADN-21, les résonances de RRM3-FL sont difficiles à qualifier visuellement dû à la faible solubilité de ce domaine comme déjà observée dans le spectre de HuR-FL libre. Généralement un excès d'ADN en solution permet d'accroître la solubilité des RBP. Cependant, dans le cas de HuR-FL, cette stratégie a conduit à l'effet inverse amenant à une diminution voire une perte des signaux sur certains résidus (Figure 52).



**Figure 52 :** Spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de HuR-FL complexée à ADN-21 à un ratio 1 :1,2 (bleu) et à un ratio 1 : 5 (magenta) obtenus à 600 MHz et à 310 K.

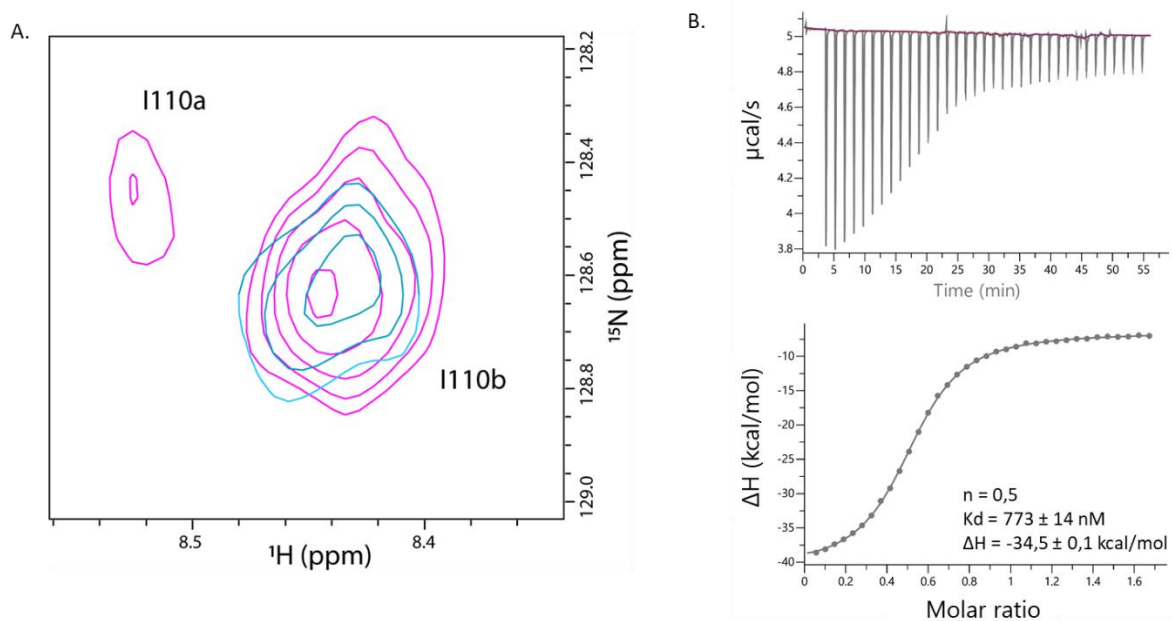
De ce fait, il a été convenu de maintenir le ratio HuR-FL : ADN-21 à 1 : 1,2 dans les expériences RMN pour lesquelles il est possible d'observer que les signaux de RRM3-FL subissent des CSP et des disparitions indicatifs d'un régime d'échange rapide à intermédiaire. Ces résultats confirment que RRM3-FL a la capacité de former conjointement au monomère RRM1-2-FL un complexe sur ADN-21. En effet, la comparaison des CSP de RRM3 avec ceux de RRM3-FL en présence d'ADN-21 indique que RRM3-FL se lie sous forme dimérique (Figure 53.A) sur ADN-21 accompagné d'un tandem RRM1-2-FL dont la présence est caractérisée par les déplacements chimiques des états *a* monomériques (Figure 53.B). Lors de la complexation de HuR-FL à ADN-21, il existerait alors deux complexes en équilibre : le complexe A constitué par la liaison d'un tandem RRM1-2-FL (état *a*,  $K_{d2}$ ) et de 2 RRM3-FL et le complexe B caractérisé uniquement par la liaison de 2 tandems RRM1-2-FL (état *b*,  $K_{d1}$ ) le long d'ADN-21.



**Figure 53 :** Populations en équilibre dans HuR-FL. A : Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HuR-FL en complexe avec ADN-21 (magenta, HSQC) et RRM3 en complexe avec ADN-21 (marron, SOFAST), obtenus à 600 MHz et 310K, zoom sur le résidu F289. B : CSP obtenus pour des résidus du tandem en échange lent (*a* et *b*) et de RRM3-FL en présence d'ADN-21 (magenta) comparés aux CSP relevés dans les formes tronquées RRM1-2 et RRM3 en présence d'ADN-12 (marron clair) et d'ADN-21 (marron).

Le tandem RRM1-2-FL forme un dimère sur ADN-21 avec une affinité forte ( $K_{d1} = 30$  nM) pour lequel RRM3-FL n'intervient pas dans la liaison mais contribue drastiquement à l'augmentation de l'affinité et de la stabilité du dimère HuR-FL formé. L'effet de la

mutation du résidu W261, responsable de l'homodimérisation entre RRM3, a été testé par RMN et ITC. Les résultats illustrent que la mutation impacte la formation du complexe HuR-FL : ADN-21. Le spectre RMN 2D de HuR-FL-W261E en présence d'ADN-21 montre, sur la majorité des résidus d'acides aminés du tandem, la perte d'échange lent au profit d'un échange rapide pour lequel une population tendant majoritairement vers la formation d'un dimère reste visible (Figure 54.A), confirmée par la stœchiométrie dérivée par ITC ( $n = 0,5$ ) (Figure 54.B).



**Figure 54 :** Analyse des populations HuR-FL-W261E sur ADN-21. A : Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC HuR-FL (magenta) et HuR-FL-W261E (cyan) en complexe avec ADN-21, obtenus à 600 MHz et 310K, zoom sur le résidu I110. B : Thermogramme (haut) et courbe ITC (bas) de la titration de HuR-FL-W261E (20  $\mu\text{M}$ ) par ADN-21 (230  $\mu\text{M}$ ).

L'échange rapide se reflète également sur la  $K_d$  dont la valeur se voit augmentée d'un facteur 25 environ, proche du  $\mu\text{M}$  ( $K_d = 773 \text{ nM}$ ). De plus, W261E induit une augmentation de la variation d'enthalpie (+ 19,6 kcal/mol par rapport à  $\Delta H_1$  HuR-FL). Outre l'abolissement de l'interaction W261-W261 entre RRM3, la mutation semble entraîner la perte de liaisons supplémentaires dans le tandem RRM1-2-FL qui voit sa fixation à ADN-21 déstabilisée indiquant que *i*) la dimérisation du RRM3-FL est essentielle à la formation d'un complexe rigide de HuR-FL sur ADN-21 et *ii*) RRM3-FL a un rôle crucial dans la coopérativité de la liaison (Figure 55).

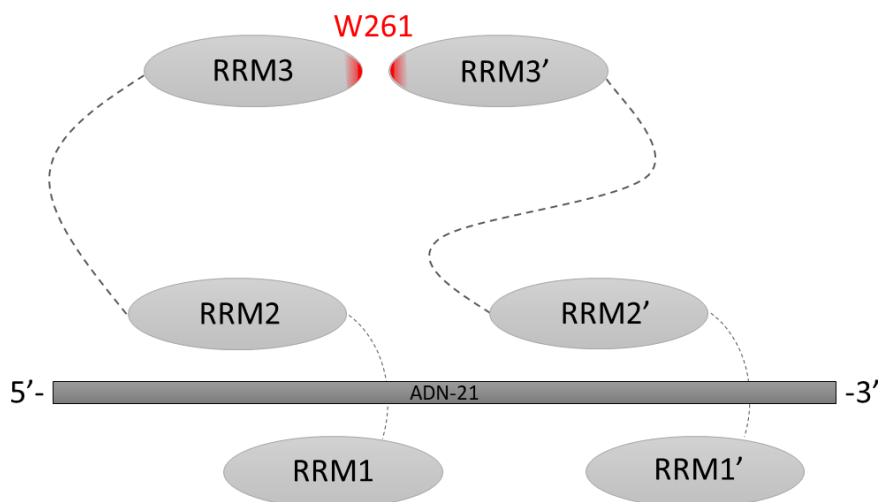


Figure 55 : Schéma représentant le complexe B constitué du positionnement de deux monomères RRM1-2 maintenus via l'interaction W261-W261 entre RRM3.

Cependant, la mutation n'affecte pas les CSP de RRM3-FL dans HuR-FL-W261E et donc n'affecte pas sa dimérisation le long d'ADN-21 dans le complexe A (Figure 56.A). En effet, ce complexe est toujours présent bien que très faiblement peuplé comme en atteste l'intensité de la résonance de G64a (Figure 56.B) pour lequel ce phénomène est visible.

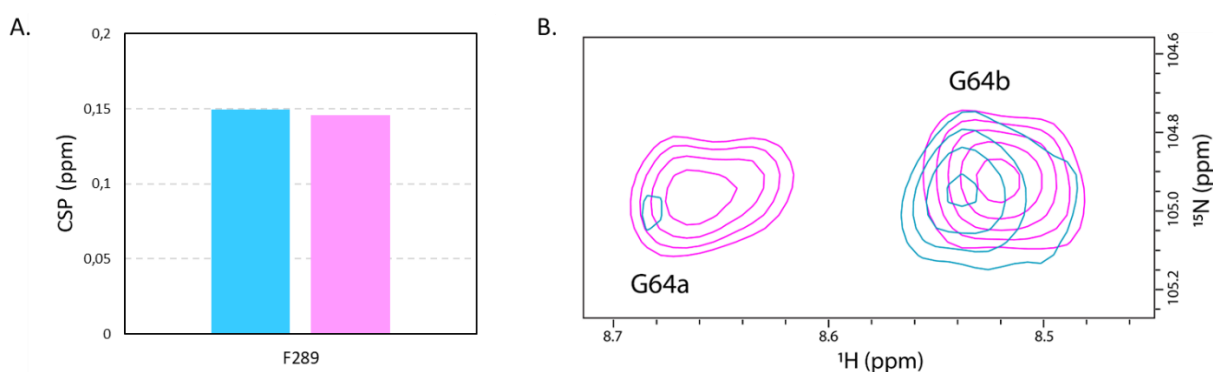


Figure 56 : Analyse du mutant HuR-FL-W261E en présence d'ADN-21. A : CSP obtenus pour le résidu F289 dans HuR-FL-W261E (cyan) comparés aux CSP relevés dans HuR-FL (magenta) en présence d'ADN-21. B : Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC HuR-FL (magenta) et HuR-FL-W261E (cyan) en complexe avec ADN-21, obtenus à 600 MHz et 310K, zoom sur les résidus G64a et b.

Des expériences ITC effectuées avec les formes tronquées RRM1-2 et RRM3 en présence d'ADN-12 et ADN-11, ADN représentant respectivement la moitié 5' (12 nt)

et 3' (12 nt) d'ADN-21, n'ont pas permis de caractériser le positionnement préférentiel de RRM1-2 et RRM3 sur ADN-21 (Tableau 11).

Oligonucléotides	RRM	n	K <sub>d</sub> (μM)
ADN-11	RRM1-2	0,9	13,4 ± 0,7
	RRM3	0,6	13 ± 1
ADN-12	RRM1-2	0,8	9,6 ± 0,9
	RRM3	0,4	7,2 ± 0,6

Tableau 11: Paramètres ITC obtenus lors de la titration de RRM1-2 et RRM3 (30 μM) par ADN-11 et ADN-12 (230 μM).

Néanmoins la comparaison des K<sub>d</sub> obtenues laisse à supposer que RRM3 puisse se lier dimériquement du côté 5' d'ADN-21, suivi par le positionnement du monomère RRM1-2 (Figure 57).

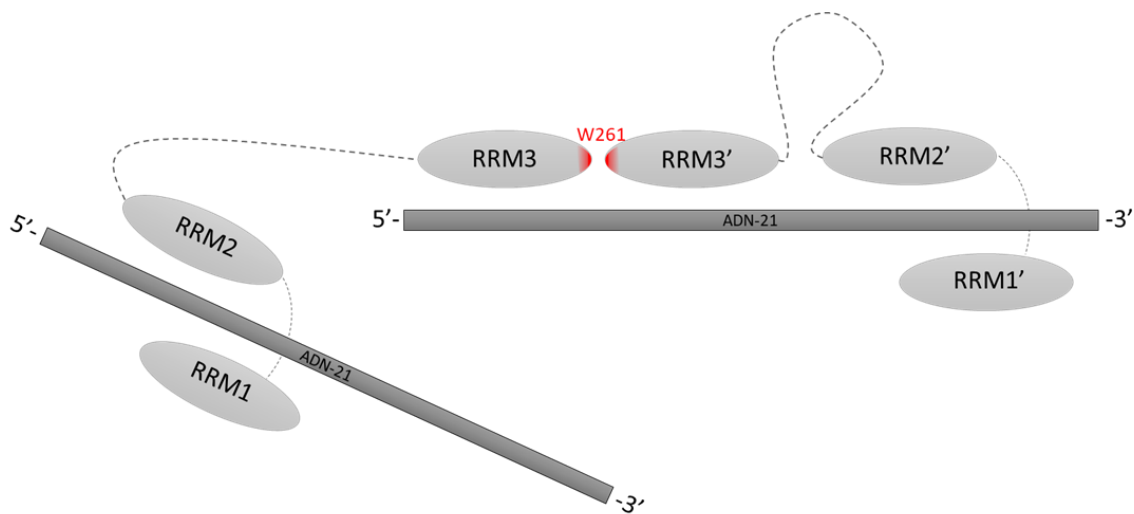


Figure 57: Schéma représentant le complexe A dans lequel la position du RRM3 en 5' d'ADN-21 est suggérée.



### III. Etude de mutants de HuR dans un contexte cellulaire

Les résultats obtenus dans les parties précédentes ont permis de mettre en lumière que lors de liaison de HuR à ADN-21, un équilibre entre deux complexes A et B apparaissait *in vitro* dont le maintien est assuré par des interactions protéine-protéine. Dans le complexe A, l'interaction protéine-protéine résulte de l'homodimérisation entre RRM3 (Figure 57). Dans le complexe B, cette même interaction assure la stabilité du dimère de tandem RRM2-RRM1-RRM2'-RRM1' (Partie II, Figure 55) au sein duquel existent probablement des interactions protéine-protéine supplémentaires entre RRM1 et RRM2' (Partie I, Figure 46). Pour valider l'ensemble de ces résultats *in vitro*, une sélection de mutants sur chacun des RRM de HuR a été faite et testée dans la cellule par la technique développée au laboratoire, la MT Bench. Les interactions intermoléculaires entre RRM1 et RRM2', si elles existent, impliquent probablement des interactions similaires aux interactions intramoléculaires entre RRM1 et RRM2, assurant la conformation fermée du tandem autour de l'ARN. Il a été montré dans la structure 3D du tandem en interaction avec un ARN (PDB : 4ED5, Wang et al. 2013) l'existence d'interactions entre les brins  $\beta_4$  du RRM1 et  $\beta_2$  du RRM2, impliquant la chaîne latérale de K92 et la chaîne principale de I133, créant ainsi une interface intramoléculaire entre RRM1 et RRM2 (Figure 58.A). Sur le brin  $\beta_4$ , K92 fait partie d'un enchaînement de 4 résidus d'acides aminés : TIKV (T90 à V93). Sur la base du schéma d'interactions (Figure 58.B), l'interface intermoléculaire engagerait a priori la fin du RRM2' sur lequel est retrouvé l'enchaînement ITVK (I179 à K182) semblable à celui pour lequel K92 maintient l'interface entre RRM1 et RRM2. L'interface intermoléculaire pourrait alors impliquer par analogie K182 du  $\beta_4$  de RRM2' ou des résidus dans son entourage proche (F183 et N188) qui interagiraient avec des résidus du brin  $\beta_2$  de RRM1 comme E47 ou d'autres structuralement proches (E45 et K72). La sélection des mutants (Figure 58.B) inclue également T32 pour lequel des CSP élevés ont souvent été observés lors des expériences RMN impliquant des mutants d'ADN-21 et Y63, utilisé comme contrôle

positif du fait de son implication dans la liaison à l'ARN (RNP1) dont la mutation engendrera a priori un *demixing* lors de l'expérience MT Bench. Concernant le RRM3, W261 a montré son importance dans la stabilisation et dans l'augmentation de l'affinité du complexe HuR : ADN-21. De ce fait, ce résidu a été inclus à la liste de ceux sélectionnés précédemment pour les expériences MT Bench pour lesquelles, s'ils sont impliqués dans une quelconque interface jouant sur la coopérativité de la liaison, doivent conduire à un *demixing*. Le *mixing-demixing* résultant de ces mutations a été quantifié par rapport au *mixing* quasi parfait de HuR-WT avec lui-même (contrôle négatif).

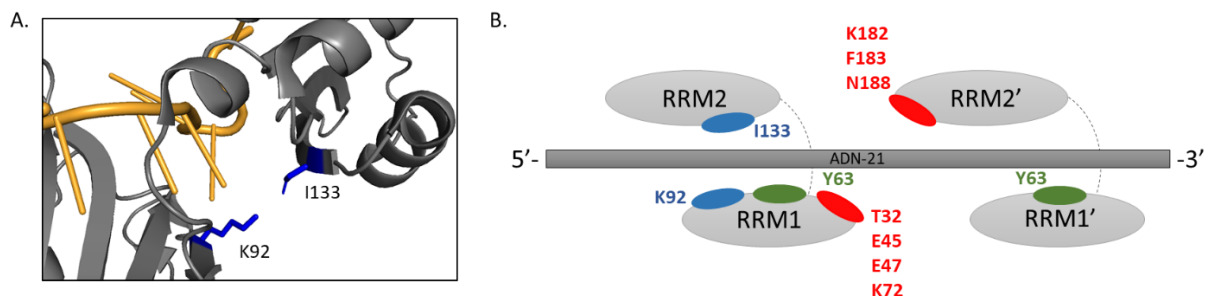


Figure 58 : Sélection des mutants MT Bench. A : Zoom sur les résidus K92 et I133 nécessaires à l'interface intramoléculaire RRM1-RRM2 (PDB : 4ED5). B : Schéma d'interactions faisant apparaître les zones d'interactions intramoléculaires (bleu), intermoléculaires (rouge) et les zones d'interactions protéine-ARN (vert).

Brièvement, pour rappeler, les mutants de HuR cités ci-dessus ainsi que la protéine sauvage ont été respectivement fusionnés au domaine MBD puis co-transfectés permettant ainsi d'observer le *mixing* et le *demixing* des protéines chimériques par fluorescence (Matériels et méthodes partie IV.1 Figure 29 et Figure 59).

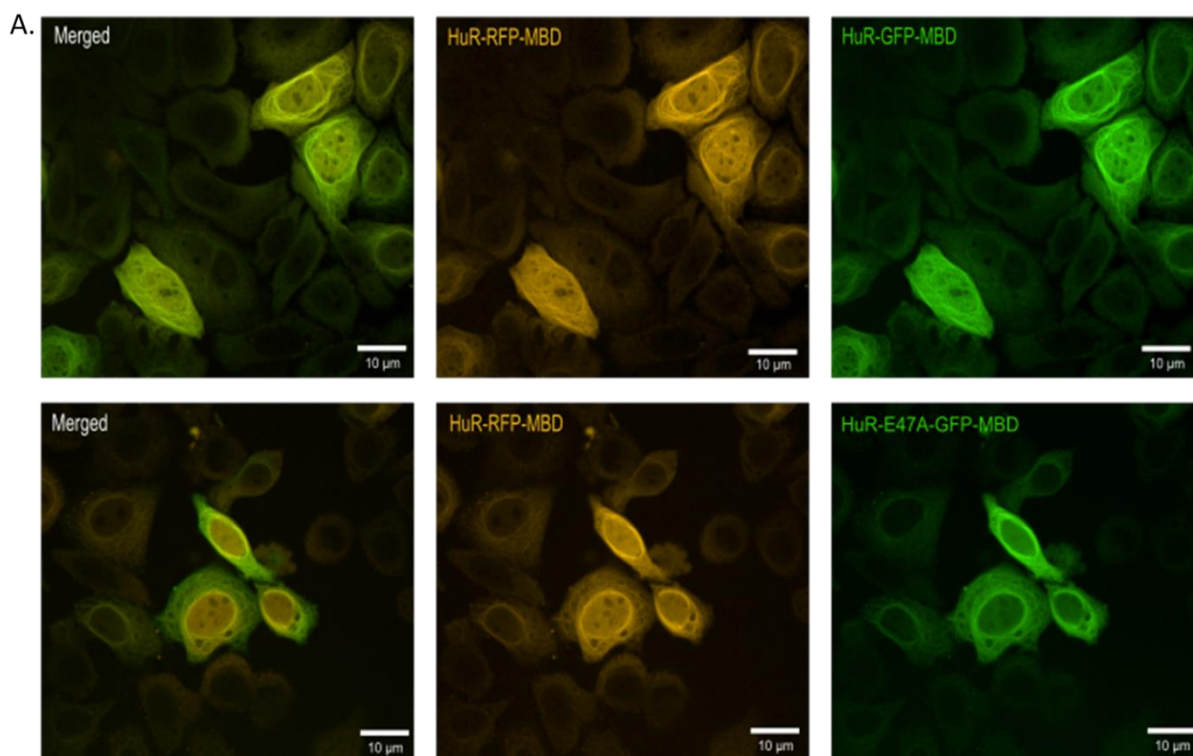


Figure 59: Image de cellules HeLa co-transfectées acquises sur l'imageur HCS (x40) illustrant le *mixing* (haut) et le *demixing* (bas).

Les résultats indiquent, comme attendu, un fort *demixing* (4 étoiles de significativité) entre le mutant Y63A et HuR sauvage dont le score ( $R^2$ ) est proche du contrôle positif YB-1, une RBP demixant fortement avec HuR. L'incapacité du mutant Y63A à se lier à l'ARN entraîne alors deux compartiments différents sur les microtubules. Les mutants K72A et F183A (3 étoiles) et les mutants E47A et K182A (4 étoiles) induisent un *demixing* important révélant leur possible proximité ou implication dans l'interface RRM1-RRM2'. W261E conduit à un  $R^2$  faible (4 étoiles) confirmant l'importance de son homodimérisation dans l'assemblage des protéines HuR-HuR. Contrairement aux CSP élevés relevés dans les différentes expériences RMN, le mutant T32A n'induit pas de compartimentation le long des microtubules. Bien que structurellement proches des mutants conduisant à un *demixing* élevé, les mutants E45A et N188A ne changent pas de façon significative le *mixing* avec HuR sauvage indiquant la précision de la méthode MT Bench (Figure 60).

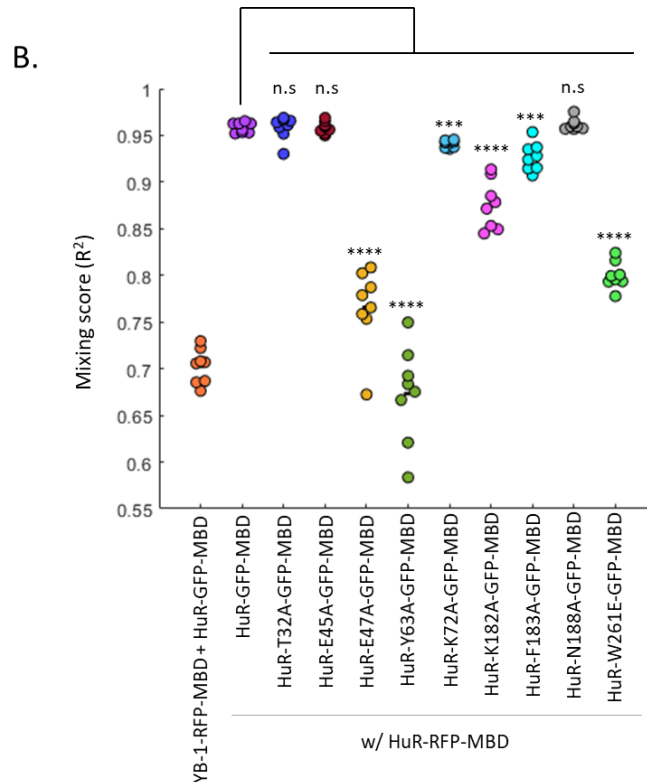
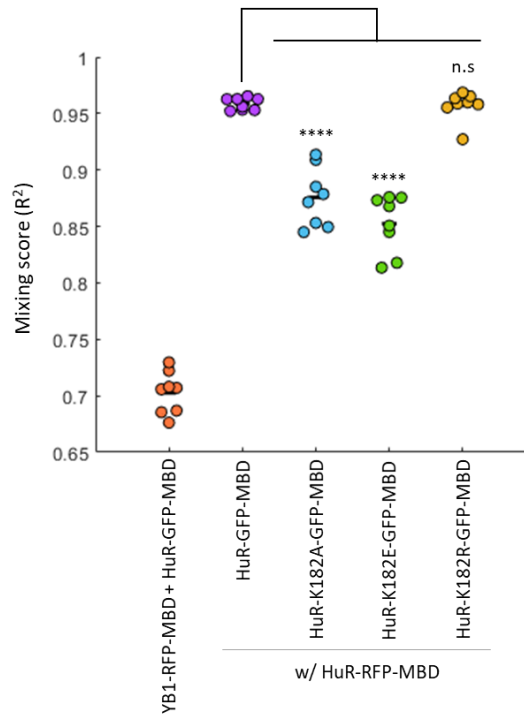


Figure 60 : Résultats des mutants de HuR étudiés par MT Bench. Scores du *mixing* ( $R^2$ ) de différents mutants de HuR comparés au score de HuR-WT (statistiques t-test, \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , n.s : non significatif)

Bien que le *demixing* observé sur le résidu K182A pourrait être la résultante de la déstabilisation de l'interface entre RRM1 et RRM2' (Figure 58.B), ce résultat a nécessité une investigation supplémentaire. En effet, la Lysine 182 est essentielle pour l'ubiquitination et la protéolyse de HuR (Abdelmohsen et al. 2009). Afin de s'assurer que la compartimentation observée le long des microtubules à la suite de la mutation de K182 ne soit pas biaisée une altération de la fonction de cette Lysine, une nouvelle série d'expériences MT Bench incluant les mutants K182A, K182E et K182R a été réalisée (Figure 61).



**Figure 61 :** Rôle de la Lysine K182. Scores du *mixing* ( $R^2$ ) de différents mutants K182 de HuR comparés au score de HuR-WT (statistiques t-test, \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ , n.s : non significatif).

L'absence de *demixing* avec K182R (fonction de la chaîne latérale altérée, charge conservée) semble appuyer le fait que les résultats du mutant K182A ne sont pas la conséquence d'un défaut d'ubiquitination. Les *demixing* résultant des mutations K182A et K182E (significativité 4 étoiles) prouvent que la charge positive portée par la chaîne latérale de K182 assure le *mixing* avec HuR-WT. De plus, le score plus faible de K182E comparativement à K182A oriente vers l'idée d'une interaction ionique entre K182 de RRM2' et un résidu chargé négativement de RRM1 qui pourrait correspondre à E47 dont la mutation avait également conduit à un fort *demixing* (Figure 60).

## DISCUSSION

---

Pour comprendre les interactions fonctionnelles directes existant entre RBP et miARN, le complexe HuR : miR-21 a servi de base au travail présenté dans ce manuscrit. L'intérêt a consisté à utiliser un complexe pour lequel *i)* un mécanisme fonctionnel a déjà été proposé (Poria et al. 2016) et pour lequel *ii)* l'intégrité séquentielle et structurale a pu être conservée au cours de cette étude. En effet, les miARN étant des ARN courts (22 nucléotides dans le cas de miR-21), le poids moléculaire du complexe formé reste raisonnable et permet l'utilisation de techniques *in vitro* comme la RMN, offrant ainsi la possibilité d'obtenir des informations à l'échelle de l'atome. Les détails structuraux dérivés peuvent ainsi conduire à la compréhension de la spécificité de reconnaissance et donc à la fonction qui en découle.

L'étude du tandem de HuR en présence d'ADN-21, homologue ADN de miR-21, a montré que la liaison s'accompagnait d'une dimérisation du tandem, impliquant des résidus d'acides aminés des RNP1 et RNP2 de chaque RRM. Du côté de HuR, il a été montré que certains de ces résidus étaient recrutés de façon spécifique lors de la liaison (Figure 33) indiquant une possible adaptabilité de HuR vis-à-vis de sa cible. De plus, plusieurs motifs riches en ARE du côté d'ADN-21 ont indiqué leur importance lors de la formation du complexe. La mutation du motif ARE T<sub>5</sub>T<sub>6</sub>A<sub>7</sub>T<sub>8</sub> en CGCG a conduit à une augmentation de la variation d'enthalpie  $\Delta H$  ou encore une perte de liaisons pouvant indiquer l'importance de ce motif pour l'ancrage de la première unité monomérique de tandem en partie 5' d'ADN-21. Plus intéressant encore, la perte de liaison complète, lors de la titration ITC du tandem avec ADN-CG3, illustre l'importance des positions T<sub>14</sub>G<sub>15</sub>A<sub>16</sub>T<sub>17</sub> pour chaque monomère de tandem. Ce résultat met en évidence un partage commun entre chaque monomère de ce motif, strictement nécessaire au maintien de HuR sur ADN-21, ce résultat ayant été observé également lors de la titration de HuR-FL avec ce même ADN (non indiqué dans le manuscrit). Les positions des nucléotides 14 à 17 d'un miARN ont déjà suscité un intérêt. Dans le cas de miR-122, ces nucléotides en 3', loin de la région graine, jouent un rôle dans la modulation

de la traduction de l'ARNm HCV (*Hepatitis C virus*) auquel il s'apparie (Roberts et al. 2011). Bien que cette interaction soit différente de celle étudiée dans le complexe HuR : ADN-21, la question reste à savoir s'il existe une prédominance de ces positions dans le cas précis d'interactions impliquant des miARN et des RBP. Une analyse des données du serveur miRBase (Kozomara et al. 2019), abritant l'archivage de 1917 séquences de miARN humaines, a permis d'isoler 15 miARN possédant le motif UGAU aux positions 14 à 17. Parmi cette liste, miR-155, un miARN supposé interagir avec HuR (Al-Haidari et al. 2017), est retrouvé. Néanmoins, contrairement à ADN-21, des expériences ITC avec ADN-155 ont indiqué une liaison suite à la mutation de ce même motif caractéristique par CGCG ( $n = 0,4$  ;  $K_d = 2,88 \pm 0,05$  ;  $\Delta H = -42,6 \pm 0,3$  kcal/mol). Ces résultats indiquent que le motif UGAU est probablement spécifique pour la reconnaissance de miR-21 par HuR.

L'étude de HuR-FL en présence d'ADN-21 illustre l'importance de RRM3 dans le mécanisme conduisant à la formation du complexe. En effet, les expériences RMN indiquent l'établissement d'un équilibre 50/50 entre deux complexes HuR-FL : ADN-21 dans lesquels le tandem RRM1-2 apparaît sous forme dimérique (Figure 55) ou monomérique (Figure 57). Ces deux complexes sont la conséquence de  $K_d$  similaires entre RRM1-2 et RRM3 (environ 5  $\mu$ M pour les formes tronquées) (Figure 49.A et 51.C respectivement) qui entrent alors en compétition pour ADN-21 conduisant à l'échange lent observé par RMN en solution lorsque les concentrations HuR : ADN-21 sont équimolaires.

Lorsque RRM1-2 guide la liaison, le tandem dimérise le long d'ADN-21, entraînant l'homodimérisation des RRM3 à travers l'empilement  $\pi$ - $\pi$  des cycles aromatiques des résidus d'acides aminés W261. Les interactions, qu'elles soient d'origine protéine-ADN ou protéine-protéine, conduisent à la formation du complexe B très stable ( $K_{d1} = 30$  nM, Figure 49.B) comparativement au dimère de la forme tronquée RRM1-2 ( $K_d = 2,1$   $\mu$ M, Figure 49.A). La mutation W261E déstabilise fortement l'affinité de HuR pour ADN-21 faisant passer la valeur de  $K_{d1}$  à 773 nM signifiant que le rapprochement des RRM3

rigidifie le complexe. Ce mécanisme conduit alors à la compaction de l'interface entre RRM1 et RRM2' (déjà observée dans l'étude de la forme tronquée du tandem) à travers la formation de liaisons supplémentaires, traduites par une diminution de  $\Delta H$  d'environ 10 kcal/mol (Figure 49). Certains résidus d'acides aminés permettent d'expliquer dans la cellule la structuration du complexe B proposée, validée par les *demixing* significatifs observés à l'issu des mutations de W261 et de E47 et K182 qui pourraient, tous les deux, interagir via des interactions ioniques (Figure 60).

Lorsque RRM3 dirige cette fois la liaison, RRM3 dimérise le long d'ADN-21 ciblant probablement le motif ARE en 5' d'ADN-21 (Tableau 11), laissant la place au tandem RRM1-2 pour se lier aux nucléotides de la partie 3' (Figure 57). Dans les conditions de concentrations équimolaires, ces interactions donnent lieu à la formation du complexe A, décrit par une  $K_{d2}$  environ 20 fois plus élevée que celle du complexe B (Figure 49). Puisque  $K_{d2}$  du complexe A est plus défavorable que  $K_{d1}$  du complexe B (lorsque HuR-FL sauvage est étudiée), la mutation W261E du RRM3 déstabilise alors plus facilement le complexe A conduisant à une disparition quasi-totale de cette population comme indiqué par les expériences RMN et ITC (Figure 54 et 56). Dans la conformation du complexe A telle que supposée, il est difficile de comprendre le *demixing* des résidus W261E, E47A et K182A cités ci-dessus. Dans les expériences cellulaires de MT Bench, les compartiments formés contiennent également de l'ARN, représenté majoritairement par des ARNm. En effet, l'occurrence de liaison de HuR à des miARN est probablement plus faible que celle concernant sa liaison à des ARNm, sur la base des articles scientifiques publiés. Si l'hypothèse des ARNm est vraie, comment comprendre les résultats obtenus par MT Bench ? En présence d'un excès d'ADN ou plus généralement lorsque des nucléotides sont libres, le complexe B dimérique a tendance à se décrocher (visible déjà sur la forme tronquée RRM1-2, Figure 35). Le zoom sur le spectre RMN de HuR-FL complexée à un excès d'ADN-21 indique que le complexe B a quasiment disparu (Figure 62).



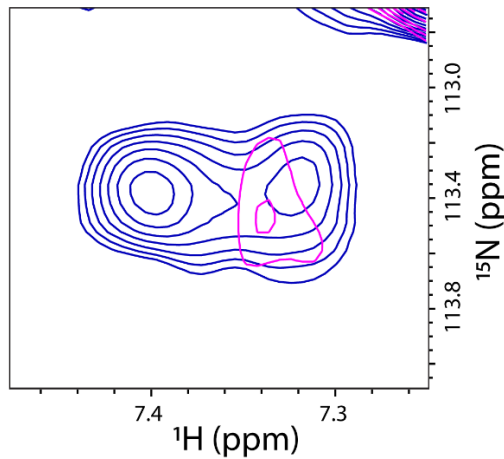


Figure 62 : Superposition des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC HuR-FL en présence d'ADN-21 (bleu : ratio 1 : 1,2 et magenta : ratio 1 : 5) obtenus à 600 MHz et 310K, zoom sur le résidu Y63.

De façon surprenante, les signaux du complexe A n'apparaissent pas du tout. HuR étant connue pour ses propriétés à multimériser (Fialcowitz-White et al. 2007; Scheiba et al. 2014), l'excès d'ADN entraîne également la dissociation du complexe A, décrochant cette fois-ci RRM1-2 de l'ADN contenant le dimère de RRM3. Un nouveau complexe C multimérique est formé dans lequel le tandem RRM1-2 et RRM3 dimérisent individuellement sur chaque brin d'ADN-21 disponible (Figure 63). Les signaux dans le spectre RMN disparaissent en raison du poids moléculaire élevé de cet auto-assemblage et de sa précipitation probable. En effet, la titration ITC de HuR-FL par ADN-21 (Figure 49.B) ne semble pas atteindre le plateau final de la deuxième sigmoïde indiquant une saturation incomplète du système.

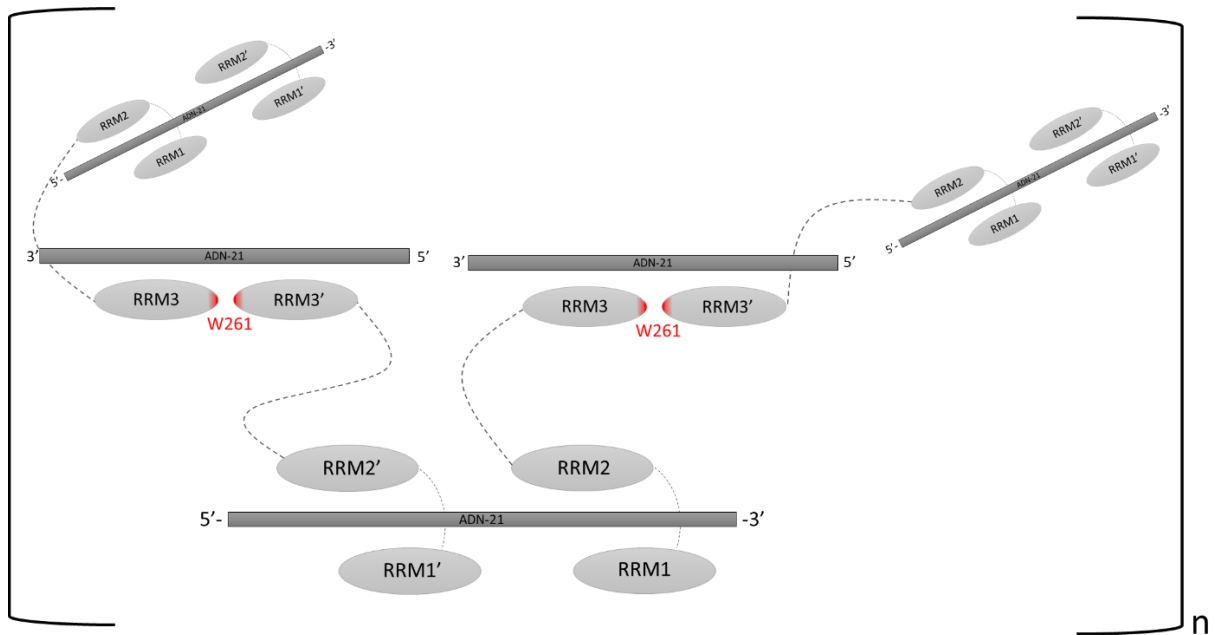


Figure 63 : Schéma représentant le complexe C dans lequel des dimères de tandem RRM1-2 et de RRM3 se lient indépendamment à ADN-21, provoquant une multimérisation en excès d'ADN.

La multimérisation observée dans le complexe C va également avoir lieu dans les expériences de MT Bench dans lesquelles HuR se lie probablement à des ARNm, longs en général de plusieurs milliers de bases. Dans cette conformation, les scores de *mixing* associés aux mutants E47A, K182A et W261E sont alors cohérents (Figure 60).

En se basant uniquement sur les expériences *in vitro* et si l'affinité guide la fonction du complexe, le complexe B (Figure 55) reflète probablement l'interaction HuR : ADN-21. Néanmoins, dans la cellule, plusieurs conformations sont envisageables : le complexe B et C dont les formations sont dépendantes des concentrations intracellulaires de HuR et miR-21.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

La régulation post-transcriptionnelle des gènes assure l'adaptation de la synthèse des protéines aux différentes étapes du cycle cellulaire et aux besoins spécifiques de chaque type de cellule. Afin de maintenir des conditions normales, ce mécanisme est finement orchestré par une armada d'acteurs moléculaires comme les RBP et les miARN. Ces régulateurs jouent un rôle central dans le contrôle de l'expression génique où leurs dysfonctionnements sont souvent associés au développement de pathologies telles que le cancer qui représente la première cause de mortalité prématurée en France (*source : Fondation ARC*). Au vu de l'incidence globale des cancers et de leur hétérogénéité, le développement de nouvelles thérapies basées sur une approche de traitements spécifiques nécessite la connaissance des mécanismes dans lesquels RBP et miARN interviennent afin de les moduler soit par activation ou par inhibition.

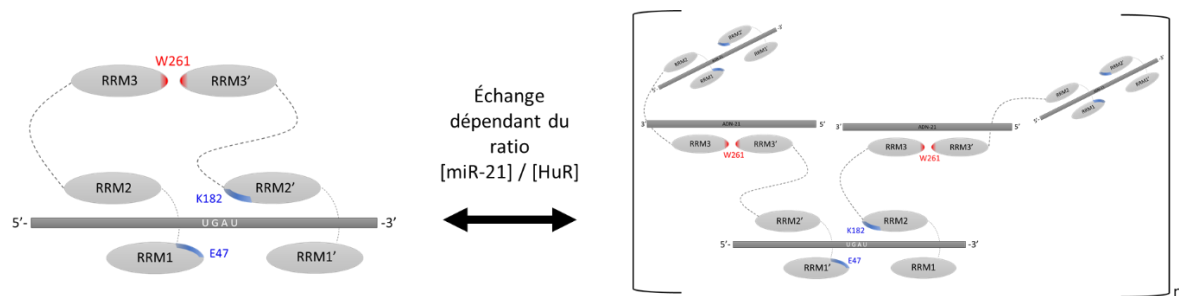
Parmi les acteurs majeurs du cancer, la RBP HuR et le miARN oncogène miR-21 possèdent des niveaux d'expression anormaux bien souvent associé à un mauvais pronostic vital. Bien que HuR et miR-21 agissent individuellement sur de nombreux ARNm liés à la maladie, un nouveau niveau de régulation post-transcriptionnelle caractérisé par une interaction directe entre HuR et miR-21 a été mis en évidence. En effet, en condition de stress inflammatoire, HuR, une RBP ubiquitaire nucléaire, est transportée vers le cytoplasme où elle se lie directement à miR-21 empêchant alors son appariement via RISC à l'ARNm PDCD4 pro-apoptotique, activant ainsi sa traduction (Poria et al. 2016). De ce fait, connaître les détails mécanistiques de cette interaction pourrait conduire à trouver des moyens pour renforcer la séquestration de miR-21 par HuR dans le but de réactiver l'apoptose au sein des cellules cancéreuses. Pour cibler ce mécanisme, les éléments structuraux à l'origine de la formation du complexe doivent être connus puisque la structure du système dicte souvent sa fonction biologique. En effet, cette thèse, basée sur une approche intégrative combinant biologie structurale, biochimie et biologie cellulaire, a été majoritairement

dédiée à la détermination des éléments structuraux existant dans HuR et miR-21 pouvant être à l'origine de leur reconnaissance spécifique. En effet, la taille du complexe HuR : miR-21 s'adaptant parfaitement à des études *in vitro*, il a été possible d'obtenir, grâce à des techniques *in vitro* impliquant la RMN, des caractéristiques au niveau de l'atome. Le fait d'avoir conservé l'intégrité du complexe a permis son étude au plus proche des conditions natives. En effet, alors que les études structurales publiées à ce jour ont été dédiées à HuR en complexe avec des ARN chimériques courts, l'originalité réside ici dans le fait que ce travail de thèse s'intéresse à la liaison de HuR à un miARN mature, généralement surexprimé dans les cellules cancéreuses.

En accord avec la littérature (Fialcowitz-White et al. 2007; Scheiba et al. 2014), HuR conserve sa propension à multimériser à travers la liaison de ses RRM, tous les trois capables de se lier aux ARE des ARN. Dans le cas de la liaison à ADN-21, homologue ADN de miR-21, les expériences RMN et ITC ont montré que HuR formait un dimère très affiné à ADN-21. Lors de sa liaison, le recrutement spécifique de certains résidus d'acides aminés appartenant aux tandems RRM1-2 et RRM1'-2' permet leur organisation autour du motif T<sub>14</sub>G<sub>15</sub>A<sub>16</sub>T<sub>17</sub>, nécessaire au maintien de chaque unité monomérique. La fixation des deux tandems conduit à l'homodimérisation du RRM3 à travers le résidu W261, cruciale à la stabilité du complexe formé et engendrant une compaction des unités monomériques du tandem, probablement maintenues par des interactions intermoléculaires ioniques entre les résidus E47 et K182. RRM3 est ainsi essentiel à la fonctionnalité du complexe puisqu'il est responsable de la coopérativité pour la spécificité de l'interaction entre HuR et miR-21.

L'étude de la protéine HuR dans un contexte cellulaire, par la technique MT Bench, a permis de corroborer les données expérimentales obtenues *in vitro* confirmant l'importance des résidus cités précédemment dans les interactions HuR : HuR qui pourraient avoir indirectement une conséquence sur la liaison de HuR à miR-21. L'ensemble de ces travaux a montré qu'il existait un échange entre le dimère rigide et une conformation multimérique, modulé par les concentrations de HuR et miR-21

disponibles (Figure 65). Compte-tenu des variations rapides de concentrations pouvant avoir lieu dans la cellule, le caractère bimodal de HuR (Figure 65) apporte un nouveau niveau de régulation, en particulier lorsque HuR est transportée dans le cytoplasme au cours du stress cellulaire.



**Figure 64 :** Schéma représentant les différentes conformations résultant de l'interaction HuR : miR-21 possiblement en échange dans les cellules.

Dans la continuité de ce projet de thèse, il sera nécessaire d'utiliser l'ensemble des données structurales dérivées de cette étude pour modéliser la structure 3D du complexe HuR : miR-21 et suivre son évolution au cours du temps. Ces expériences de dynamiques moléculaires permettraient de confirmer l'établissement du complexe ainsi que sa stabilité à travers les interactions intermoléculaires W261-W261 et E47-K182 et d'identifier éventuellement d'autres résidus maintenant l'interaction entre tandems RRM1-2 qui pourraient alors être testés dans la cellule. Le modèle 3D obtenu apporterait peut-être des informations quant à l'éventuel rôle du HNS, une région non étudiée dans le cadre de cette étude. A l'issue, un criblage *in silico* de chimiothèques permettrait de trouver des petites molécules *drug like* qui renforceraient l'interaction entre HuR et miR-21.

Grâce à la connaissance de la conformation de HuR adoptée sur miR-21, ces résultats ont peut-être, d'une part, permis d'ouvrir la voie à la compréhension de la multimérisation de HuR sur des ARN longs, qu'ils soient messagers ou non-codants, en se liant sur les parties simple brin ou en pontant différentes structures secondaires des ARN. D'autre part, ces mêmes résultats pourraient servir de base à l'étude d'autres

miARN séquestrés par HuR (s'ils existent) ou encore, par extension, à d'autres systèmes protéiques maintenus par des interactions homotypiques ou hétérotypiques qui, par le biais de la liaison à l'ARN, conduiraient à une augmentation d'affinité et de spécificité pour une cible. En effet, il serait intéressant de voir si les autres RBP de la famille Hu, retrouvées dans les neurones, suivent un mécanisme de liaison bimodal similaire à celui de HuR modulé par la cible rencontrée et leur niveau d'expression respectif dans la cellule.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Abdelmohsen, Kotb, Mihee M. Kim, Subramanya Srikantan, Evi M. Mercken, Sarah E. Brennan, Gerald M. Wilson, Rafael de Cabo, et Myriam Gorospe. 2010. « MiR-519 Suppresses Tumor Growth by Reducing HuR Levels ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (7): 1354-59. <https://doi.org/10.4161/cc.9.7.11164>.
- Abdelmohsen, Kotb, Rudolf Pullmann, Ashish Lal, Hyeon Ho Kim, Stefanie Galban, Xiaoling Yang, Justin D. Blethrow, et al. 2007. « Phosphorylation of HuR by Chk2 Regulates SIRT1 Expression ». *Molecular Cell* 25 (4): 543-57. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.011>.
- Abdelmohsen, Kotb, Subramanya Srikantan, Xiaoling Yang, Ashish Lal, Hyeon Ho Kim, Yuki Kuwano, Stefanie Galban, et al. 2009. « Ubiquitin-Mediated Proteolysis of HuR by Heat Shock ». *The EMBO Journal* 28 (9): 1271-82. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.67>.
- Abe, R, E Sakashita, K Yamamoto, et H Sakamoto. 1996. « Two different RNA binding activities for the AU-rich element and the poly(A) sequence of the mouse neuronal protein mHuC. » *Nucleic Acids Research* 24 (24): 4895-4901.
- Abouward, Reem, et Giampietro Schiavo. 2021. « Walking the Line: Mechanisms Underlying Directional mRNA Transport and Localisation in Neurons and Beyond ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 78 (6): 2665-81. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03724-3>.
- Akaike, Yoko, Kiyoshi Masuda, Yuki Kuwano, Kensei Nishida, Keisuke Kajita, Ken Kurokawa, Yuzuru Satake, Katsutoshi Shoda, Issei Imoto, et Kazuhito Rokutan. 2014. « HuR Regulates Alternative Splicing of the TRA2 $\beta$  Gene in Human Colon Cancer Cells under Oxidative Stress ». *Molecular and Cellular Biology* 34 (15): 2857-73. <https://doi.org/10.1128/MCB.00333-14>.
- Akool, El-Sayed, Hartmut Kleinert, Farid M. A. Hamada, Mohamed H. Abdelwahab, Ulrich Förstermann, Josef Pfeilschifter, et Wolfgang Eberhardt. 2003. « Nitric Oxide Increases the Decay of Matrix Metalloproteinase 9 mRNA by Inhibiting the Expression of mRNA-Stabilizing Factor HuR ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (14): 4901-16. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.14.4901-4916.2003>.
- Alami, Nael H., Rebecca B. Smith, Monica A. Carrasco, Luis A. Williams, Christina S. Winborn, Steve S. W. Han, Evangelos Kiskinis, et al. 2014. « Axonal Transport of TDP-43 mRNA Granules Is Impaired by ALS-Causing Mutations ». *Neuron* 81 (3): 536-43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.018>.
- Alarcón, Claudio R., Hyeeseung Lee, Hani Goodarzi, Nils Halberg, et Sohail F. Tavazoie. 2015. « N6-methyladenosine (m6A) marks primary microRNAs for processing ». *Nature* 519 (7544): 482-85. <https://doi.org/10.1038/nature14281>.
- Al-Haidari, Amr A., Ingvar Syk, et Henrik Thorlacius. 2017. « MiR-155-5p positively regulates CCL17-induced colon cancer cell migration by targeting RhoA ». *Oncotarget* 8 (9): 14887-96. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14841>.
- Al-Khalaf, Huda H., et Abdelilah Aboussekhra. 2014. « ATR Controls the UV-Related Upregulation of the CDKN1A mRNA in a Cdk1/HuR-Dependent Manner ». *Molecular Carcinogenesis* 53 (12): 979-87. <https://doi.org/10.1002/mc.22066>.
- Alles, Julia, Tobias Fehlmann, Ulrike Fischer, Christina Backes, Valentina Galata, Marie Minet, Martin Hart, et al. 2019. « An estimate of the total number of true human miRNAs ». *Nucleic Acids Research* 47 (7): 3353-64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz097>.
- Ardekani, Ali M., et Mozghan Moslemi Naeini. 2010. « The Role of MicroRNAs in Human Diseases ». *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 2 (4): 161-79.
- Asangani, I. A., S. a. K. Rasheed, D. A. Nikolova, J. H. Leupold, N. H. Colburn, S. Post, et H. Allgayer. 2008. « MicroRNA-21 (MiR-21) Post-Transcriptionally Downregulates Tumor Suppressor Pcd4 and Stimulates Invasion, Intravasation and Metastasis in Colorectal Cancer ». *Oncogene* 27 (15): 2128-36. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210856>.

- Badaczewska-Dawid, Aleksandra E, Chandran Nithin, Karol Wroblewski, Mateusz Kurcinski, et Sebastian Kmiecik. 2022. « MAPIYA contact map server for identification and visualization of molecular interactions in proteins and biological complexes ». *Nucleic Acids Research* 50 (W1): W474-82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac307>.
- Beauchamp, P., C. Nassif, S. Hillock, K. van der Giessen, C. von Roretz, B. J. Jasmin, et I.-E. Gallouzi. 2010. « The Cleavage of HuR Interferes with Its Transportin-2-Mediated Nuclear Import and Promotes Muscle Fiber Formation ». *Cell Death and Differentiation* 17 (10): 1588-99. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.34>.
- Beck, Christian, Hans Schreiber, et Donald A. Rowley. 2001. « Role of TGF- $\beta$  in Immune-Evasion of Cancer ». *Microscopy Research and Technique* 52 (4): 387-95. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20010215\)52:4<387::AID-JEMT1023>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010215)52:4<387::AID-JEMT1023>3.0.CO;2-W).
- Benoit Bouvrette, Louis Philip, Samantha Bovaird, Mathieu Blanchette, et Eric Lécuyer. 2020. « ORNament: A Database of Putative RNA Binding Protein Target Sites in the Transcriptomes of Model Species ». *Nucleic Acids Research* 48 (D1): D166-73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz986>.
- Benoit, Roger Marc, Nicole-Claudia Meisner, Joerg Kallen, Patrick Graff, René Hemmig, Régis Cèbe, Christian Ostermeier, Hans Widmer, et Manfred Auer. 2010. « The X-ray Crystal Structure of the First RNA Recognition Motif and Site-Directed Mutagenesis Suggest a Possible HuR Redox Sensing Mechanism ». *Journal of Molecular Biology* 397 (5): 1231-44. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.043>.
- Bhaskaran, M., et M. Mohan. 2014. « MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease ». *Veterinary pathology* 51 (4): 759-74. <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>.
- Blanco, Fernando F., Ranjan Preet, Andrea Aguado, Vikalp Vishwakarma, Laura E. Stevens, Alok Vyas, Subhash Padhye, et al. 2016. « Impact of HuR Inhibition by the Small Molecule MS-444 on Colorectal Cancer Cell Tumorigenesis ». *Oncotarget* 7 (45): 74043-58. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12189>.
- Boca, Mirela, Dmitry A. Kretov, Bénédicte Desforges, Alix Mephon-Gaspard, Patrick A. Curmi, et David Pastré. 2015. « Probing Protein Interactions in Living Mammalian Cells on a Microtubule Bench ». *Scientific Reports* 5 (1): 17304. <https://doi.org/10.1038/srep17304>.
- Bodenhausen, Geoffrey, et David J. Ruben. 1980. « Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy ». *Chemical Physics Letters* 69 (1): 185-89. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(80\)80041-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(80)80041-8).
- Bofill-De Ros, Xavier, Wojciech K. Kasprzak, Yuba Bhandari, Lixin Fan, Quinn Cavanaugh, Minjie Jiang, Lisheng Dai, et al. 2019. « Structural Differences between Pri-MiRNA Paralogs Promote Alternative Drosha Cleavage and Expand Target Repertoires ». *Cell Reports* 26 (2): 447-459.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.054>.
- Borchert, Glen M., William Lanier, et Beverly L. Davidson. 2006. « RNA Polymerase III Transcribes Human MicroRNAs ». *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (12): 1097-1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>.
- Brown, Alan. 2009. « Analysis of Cooperativity by Isothermal Titration Calorimetry ». *International Journal of Molecular Sciences* 10 (8): 3457-77. <https://doi.org/10.3390/ijms10083457>.
- Burd, C. G., et G. Dreyfuss. 1994. « Conserved Structures and Diversity of Functions of RNA-Binding Proteins ». *Science (New York, N.Y.)* 265 (5172): 615-21. <https://doi.org/10.1126/science.8036511>.
- Butovsky, Oleg, Mark P. Jedrychowski, Ron Cialic, Susanne Krasemann, Gopal Murugaiyan, Zain Fanek, David J. Greco, et al. 2015. « Targeting miR-155 restores abnormal microglia and attenuates disease in SOD1 mice ». *Annals of neurology* 77 (1): 75-99. <https://doi.org/10.1002/ana.24304>.
- Calin, George Adrian, Calin Dan Dumitru, Masayoshi Shimizu, Roberta Bichi, Simona Zupo, Evan Noch, Hansjuerg Aldler, et al. 2002. « Frequent Deletions and Down-Regulation of Micro-RNA Genes MiR15 and MiR16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24): 15524-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>.



- Calin, George Adrian, Cinzia Sevignani, Calin Dan Dumitru, Terry Hyslop, Evan Noch, Sai Yendamuri, Masayoshi Shimizu, et al. 2004. « Human MicroRNA Genes Are Frequently Located at Fragile Sites and Genomic Regions Involved in Cancers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (9): 2999-3004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307323101>.
- Castello, Alfredo, Bernd Fischer, Christian K. Frese, Rastislav Horos, Anne-Marie Alleaume, Sophia Foehr, Tomaz Curk, Jeroen Krijgsveld, et Matthias W. Hentze. 2016. « Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells ». *Molecular Cell* 63 (4): 696-710. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.029>.
- Castle, John C., Chaolin Zhang, Jyoti K. Shah, Amit V. Kulkarni, Thomas A. Cooper, et Jason M. Johnson. 2008. « Differential expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis-regulation in 48 tissues and cell lines ». *Nature genetics* 40 (12): 1416-25. <https://doi.org/10.1038/ng.264>.
- Chan, Jennifer A., Anna M. Krichevsky, et Kenneth S. Kosik. 2005. « MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells ». *Cancer Research* 65 (14): 6029-33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0137>.
- Chang, Tsung-Cheng, Lauren R. Zeitels, Hun-Way Hwang, Raghu R. Chivukula, Erik A. Wentzel, Michael Dews, Jason Jung, et al. 2009. « Lin-28B Transactivation Is Necessary for Myc-Mediated Let-7 Repression and Proliferation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (9): 3384-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808300106>.
- Chau, B. Nelson, Cuiyan Xin, Jochen Hartner, Shuyu Ren, Ana P. Castano, Geoffrey Linn, Jian Li, et al. 2012. « MicroRNA 21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways ». *Science translational medicine* 4 (121): 121ra18. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003205>.
- Chen, Chyi-Ying A., et Ann-Bin Shyu. 2011. « Mechanisms of deadenylation-dependent decay ». *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 2 (2): 167-83. <https://doi.org/10.1002/wrna.40>.
- Chen, Po Yu, Heiko Manninga, Krasimir Slanchev, Minchen Chien, James J. Russo, Jingyue Ju, Robert Sheridan, et al. 2005. « The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning ». *Genes & Development* 19 (11): 1288-93. <https://doi.org/10.1101/gad.1310605>.
- Chu, Jen-Fei, Pritha Majumder, Biswanath Chatterjee, Shih-Ling Huang, et Che-Kun James Shen. 2019. « TDP-43 Regulates Coupled Dendritic mRNA Transport-Translation Processes in Co-Operation with FMRP and Stauf1 ». *Cell Reports* 29 (10): 3118-3133.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.061>.
- Chu, Po-Chen, Hsiao-Ching Chuang, Samuel K. Kulp, et Ching-Shih Chen. 2012. « The mRNA-Stabilizing Factor HuR Protein Is Targeted by  $\beta$ -TrCP Protein for Degradation in Response to Glycolysis Inhibition ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (52): 43639-50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393678>.
- Ciafrè, Silvia Anna, et Silvia Galardi. 2013. « MicroRNAs and RNA-Binding Proteins: A Complex Network of Interactions and Reciprocal Regulations in Cancer ». *RNA Biology* 10 (6): 935-42. <https://doi.org/10.4161/rna.24641>.
- Clemens, K. R., V. Wolf, S. J. McBryant, P. Zhang, X. Liao, P. E. Wright, et J. M. Gottesfeld. 1993. « Molecular Basis for Specific Recognition of Both RNA and DNA by a Zinc Finger Protein ». *Science (New York, N.Y.)* 260 (5107): 530-33. <https://doi.org/10.1126/science.8475383>.
- Cléry, Antoine, Markus Blatter, et Frédéric H.-T. Allain. 2008. « RNA Recognition Motifs: Boring? Not Quite ». *Current Opinion in Structural Biology* 18 (3): 290-98. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.04.002>.
- Connerty, Patrick, Alireza Ahadi, et Gyorgy Hutvagner. 2015. « RNA Binding Proteins in the MiRNA Pathway ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (1): 31. <https://doi.org/10.3390/ijms17010031>.
- Corbett, Anita H. 2018. « Post-transcriptional Regulation of Gene Expression and Human Disease ». *Current opinion in cell biology* 52 (juin): 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.02.011>.

- Dai, Weijun, Gen Zhang, et Eugene V. Makeyev. 2012. « RNA-Binding Protein HuR Autoregulates Its Expression by Promoting Alternative Polyadenylation Site Usage ». *Nucleic Acids Research* 40 (2): 787-800. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr783>.
- Davis, Brandi N., Aaron C. Hilyard, Giorgio Lagna, et Akiko Hata. 2008. « SMAD Proteins Control DROSHA-Mediated MicroRNA Maturation ». *Nature* 454 (7200): 56-61. <https://doi.org/10.1038/nature07086>.
- De Conti, Laura, Marco Baralle, et Emanuele Buratti. 2017. « Neurodegeneration and RNA-Binding Proteins ». *WIREs RNA* 8 (2): e1394. <https://doi.org/10.1002/wrna.1394>.
- Degese, Maria Sol, Tamara Tanos, Julian Naipauer, Tim Gingerich, Diego Chiappe, Pablo Echeverria, Jonathan LaMarre, J. Silvio Gutkind, et Omar A. Coso. 2015. « An Interplay between the P38 MAPK Pathway and AUBPs Regulates C-Fos mRNA Stability during Mitogenic Stimulation ». *The Biochemical Journal* 467 (1): 77-90. <https://doi.org/10.1042/BJ20141100>.
- Desi, Ng, et Yvonne Tay. 2019. « The Butterfly Effect of RNA Alterations on Transcriptomic Equilibrium ». *Cells* 8 (12): 1634. <https://doi.org/10.3390/cells8121634>.
- Dias, David M., et Alessio Ciulli. 2014. « NMR Approaches in Structure-Based Lead Discovery: Recent Developments and New Frontiers for Targeting Multi-Protein Complexes ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 116 (2-3): 101-12. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.08.012>.
- Doller, Anke, Andrea Huwiler, Roswitha Müller, Heinfried H. Radeke, Josef Pfeilschifter, et Wolfgang Eberhardt. 2007. « Protein Kinase C Alpha-Dependent Phosphorylation of the mRNA-Stabilizing Factor HuR: Implications for Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase-2 ». *Molecular Biology of the Cell* 18 (6): 2137-48. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-09-0850>.
- Doller, Anke, Kai Schlepckow, Harald Schwalbe, Josef Pfeilschifter, et Wolfgang Eberhardt. 2010. « Tandem Phosphorylation of Serines 221 and 318 by Protein Kinase Cdelta Coordinates mRNA Binding and Nucleocytoplasmic Shuttling of HuR ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (6): 1397-1410. <https://doi.org/10.1128/MCB.01373-09>.
- Dominguez, Cyril, et Frédéric H.-T. Allain. 2006. « NMR Structure of the Three Quasi RNA Recognition Motifs (QRRMs) of Human HnRNP F and Interaction Studies with Bcl-x G-Tract RNA: A Novel Mode of RNA Recognition ». *Nucleic Acids Research* 34 (13): 3634-45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl488>.
- Dominguez, Cyril, Mario Schubert, Olivier Duss, et Sapna Ravindranathan. 2011. « Structure Determination and Dynamics of Protein-RNA Complexes by NMR Spectroscopy ». *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 61.
- Dong, Rui, Jian-Guo Lu, Qing Wang, Xian-Li He, Yan-Kui Chu, et Qing-Jiu Ma. 2007. « Stabilization of Snail by HuR in the Process of Hydrogen Peroxide Induced Cell Migration ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356 (1): 318-21. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.145>.
- Dormann, Dorothee, Ramona Rodde, Dieter Edbauer, Eva Bentmann, Ingeborg Fischer, Alexander Hruscha, Manuel E. Than, et al. 2010. « ALS-Associated Fused in Sarcoma (FUS) Mutations Disrupt Transportin-Mediated Nuclear Import ». *The EMBO Journal* 29 (16): 2841-57. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.143>.
- Dreyfuss, Gideon, V. Narry Kim, et Naoyuki Kataoka. 2002. « Messenger-RNA-Binding Proteins and the Messages They Carry ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 (3): 195-205. <https://doi.org/10.1038/nrm760>.
- Durie, D., S. M. Lewis, U. Liwak, M. Kisilewicz, M. Gorospe, et M. Holcik. 2011. « RNA-Binding Protein HuR Mediates Cytoprotection through Stimulation of XIAP Translation ». *Oncogene* 30 (12): 1460-69. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.527>.
- Eiring, Anna M., Jason G. Harb, Paolo Neviani, Christopher Garton, Joshua J. Oaks, Riccardo Spizzo, Shujun Liu, et al. 2010. « miR-328 Functions as an RNA Decoy to Modulate hnRNP E2 Regulation of mRNA Translation in Leukemic Blasts ». *Cell* 140 (5): 652-65. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.007>.

- Elcheva, Irina, Srikanta Goswami, Felicite K. Noubissi, et Vladimir S. Spiegelman. 2009. « CRD-BP protects the coding region of  $\beta$ TrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation ». *Molecular cell* 35 (2): 240-46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.007>.
- Embade, Nieves, David Fernández-Ramos, Marta Varela-Rey, Naiara Beraza, Marcella Sini, Virginia Gutiérrez de Juan, Ashwin Woodhoo, et al. 2012. « Murine Double Minute 2 Regulates Hu Antigen R Stability in Human Liver and Colon Cancer through NEDDylation ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (4): 1237-48. <https://doi.org/10.1002/hep.24795>.
- Fabbri, Muller, Alessio Paone, Federica Calore, Roberta Galli, Eugenio Gaudio, Ramasamy Santhanam, Francesca Lovat, et al. 2012. « MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (31): E2110-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209414109>.
- Fan, X. C., et J. A. Steitz. 1998. « Overexpression of HuR, a Nuclear-Cytoplasmic Shuttling Protein, Increases the in Vivo Stability of ARE-Containing MRNAs ». *The EMBO Journal* 17 (12): 3448-60. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3448>.
- Farazi, Thalia A., Jessica I. Hoell, Pavel Morozov, et Thomas Tuschl. 2013. « microRNAs in Human Cancer ». *Advances in experimental medicine and biology* 774: 1-20. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5590-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5590-1_1).
- Fawzi, Nicolas L., Mark R. Fleissner, Nicholas J. Anthis, Tamás Kálai, Kálmán Hideg, Wayne L. Hubbell, et G. Marius Clore. 2011. « A Rigid Disulfide-Linked Nitroxide Side Chain Simplifies the Quantitative Analysis of PRE Data ». *Journal of Biomolecular NMR* 51 (1-2): 105-14. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9545-x>.
- Fazi, Francesco, Serena Racanicchi, Giuseppe Zardo, Linda M. Starnes, Marco Mancini, Lorena Travaglini, Daniela Diverio, et al. 2007. « Epigenetic Silencing of the Myelopoiesis Regulator MicroRNA-223 by the AML1/ETO Oncoprotein ». *Cancer Cell* 12 (5): 457-66. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.09.020>.
- Feng, Yin-Hsun, Chao-Liang Wu, Chao-Jung Tsao, Jan-Gowth Chang, Pei-Jung Lu, Kun-Tu Yeh, Yih-Huei Uen, Jeng-Chang Lee, et Ai-Li Shiau. 2011. « Deregulated Expression of Sprouty2 and MicroRNA-21 in Human Colon Cancer: Correlation with the Clinical Stage of the Disease ». *Cancer Biology & Therapy* 11 (1): 111-21. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.1.13965>.
- Fialcowitz-White, Elizabeth J., Brandy Y. Brewer, Jeff D. Ballin, Chris D. Willis, Eric A. Toth, et Gerald M. Wilson. 2007a. « Specific Protein Domains Mediate Cooperative Assembly of HuR Oligomers on AU-Rich mRNA-Destabilizing Sequences ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (29): 20948-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701751200>.
- Filippova, Natalia, Xiuhua Yang, Peter King, et L. Burt Nabors. 2012. « Phosphoregulation of the RNA-Binding Protein Hu Antigen R (HuR) by Cdk5 Affects Centrosome Function ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (38): 32277-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.353912>.
- Frankel, Lisa B., Nanna R. Christoffersen, Anders Jacobsen, Morten Lindow, Anders Krogh, et Anders H. Lund. 2008. « Programmed Cell Death 4 (PDCD4) Is an Important Functional Target of the MicroRNA MiR-21 in Breast Cancer Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2): 1026-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707224200>.
- Fu, Mingui, et Perry J. Blackshear. 2017. « RNA-Binding Proteins in Immune Regulation: A Focus on CCCH Zinc Finger Proteins ». *Nature Reviews Immunology* 17 (2): 130-43. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.129>.
- Fujita, Shuji, Taiji Ito, Taketoshi Mizutani, Shigeru Minoguchi, Nobutake Yamamichi, Kouhei Sakurai, et Hideo Iba. 2008. « miR-21 Gene Expression Triggered by AP-1 Is Sustained through a Double-Negative Feedback Mechanism ». *Journal of Molecular Biology* 378 (3): 492-504. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.015>.
- Fulci, Valerio, Sabina Chiaretti, Marina Goldoni, Gianluca Azzalin, Nicoletta Carucci, Simona Tavolaro, Leandro Castellano, et al. 2007. « Quantitative Technologies Establish a Novel MicroRNA Profile of Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Blood* 109 (11): 4944-51. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-062398>.

- Galbán, Stefanie, et Myriam Gorospe. 2009. « Factors Interacting with HIF-1alpha mRNA: Novel Therapeutic Targets ». *Current Pharmaceutical Design* 15 (33): 3853-60. <https://doi.org/10.2174/138161209789649376>.
- Galbán, Stefanie, Yuki Kuwano, Rudolf Pullmann, Jennifer L. Martindale, Hyeon Ho Kim, Ashish Lal, Kotb Abdelmohsen, et al. 2008. « RNA-Binding Proteins HuR and PTB Promote the Translation of Hypoxia-Inducible Factor 1alpha ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (1): 93-107. <https://doi.org/10.1128/MCB.00973-07>.
- Galgano, Alessia, Michael Forrer, Lukasz Jaskiewicz, Alexander Kanitz, Mihaela Zavolan, et André P. Gerber. 2008. « Comparative Analysis of mRNA Targets for Human PUF-Family Proteins Suggests Extensive Interaction with the MiRNA Regulatory System ». *PLoS One* 3 (9): e3164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003164>.
- García-Mauriño, Sofía M., Francisco Rivero-Rodríguez, Alejandro Velázquez-Cruz, Marian Hernández-Vellisca, Antonio Díaz-Quintana, Miguel A. De la Rosa, et Irene Díaz-Moreno. 2017. « RNA Binding Protein Regulation and Cross-Talk in the Control of AU-Rich mRNA Fate ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 4 (octobre): 71. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00071>.
- Gerstberger, Stefanie, Markus Hafner, et Thomas Tuschl. 2014. « A Census of Human RNA-Binding Proteins ». *Nature Reviews. Genetics* 15 (12): 829-45. <https://doi.org/10.1038/nrg3813>.
- Godet, Anne-Claire, Florian David, Fransky Hantelys, Florence Tatin, Eric Lacazette, Barbara Garmy-Susini, et Anne-Catherine Prats. 2019. « IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (4): 924. <https://doi.org/10.3390/ijms20040924>.
- Grammatikakis, Ioannis, Kotb Abdelmohsen, et Myriam Gorospe. 2017. « Posttranslational control of HuR function ». *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 8 (1): 10.1002/wrna.1372. <https://doi.org/10.1002/wrna.1372>.
- Graumann, P. L., et M. A. Marahiel. 1998. « A Superfamily of Proteins That Contain the Cold-Shock Domain ». *Trends in Biochemical Sciences* 23 (8): 286-90. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01255-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01255-9).
- Grishin, Nick V. 2001. « KH domain: one motif, two folds ». *Nucleic Acids Research* 29 (3): 638-43. <https://doi.org/10.1093/nar/29.3.638>.
- Gu, Shuo, et Mark A Kay. 2010. « How do miRNAs mediate translational repression? » *Silence* 1 (mai): 11. <https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-11>.
- Guo, Jiawei, Jing Lv, Siyu Chang, Zhi Chen, Weiqiang Lu, Chuanliang Xu, Mingyao Liu, et Xiufeng Pang. 2016. « Inhibiting Cytoplasmic Accumulation of HuR Synergizes Genotoxic Agents in Urothelial Carcinoma of the Bladder ». *Oncotarget* 7 (29): 45249-62. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9932>.
- Guo, Xu, Yuehan Wu, et Rebecca S. Hartley. 2009. « MicroRNA-125a Represses Cell Growth by Targeting HuR in Breast Cancer ». *RNA Biology* 6 (5): 575-83. <https://doi.org/10.4161/rna.6.5.10079>.
- Guo, Xun, Yuehan Wu, et Rebecca S. Hartley. 2010. « Cold-Inducible RNA-Binding Protein Contributes to Human Antigen R and Cyclin E1 Deregulation in Breast Cancer ». *Molecular Carcinogenesis* 49 (2): 130-40. <https://doi.org/10.1002/mc.20582>.
- Hatley, Mark E., David M. Patrick, Matthew R. Garcia, James A. Richardson, Rhonda Bassel-Duby, Eva van Rooij, et Eric N. Olson. 2010. « Modulation of K-Ras-Dependent Lung Tumorigenesis by MicroRNA-21 ». *Cancer Cell* 18 (3): 282-93. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.08.013>.
- Hayashi, Toru, Noriko Koyama, Yukio Azuma, et Masanori Kashimata. 2011. « Mesenchymal MiR-21 Regulates Branching Morphogenesis in Murine Submandibular Gland in Vitro ». *Developmental Biology* 352 (2): 299-307. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.01.030>.
- Hayashita, Yoji, Hirotaka Osada, Yoshio Tatematsu, Hideki Yamada, Kiyoshi Yanagisawa, Shuta Tomida, Yasushi Yatabe, Katsunobu Kawahara, Yoshitaka Sekido, et Takashi Takahashi. 2005. « A Polycistronic MicroRNA Cluster, MiR-17-92, Is Overexpressed in Human Lung Cancers and Enhances Cell Proliferation ». *Cancer Research* 65 (21): 9628-32. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2352>.

- Hayes, Josie, Pier Paolo Peruzzi, et Sean Lawler. 2014. « MicroRNAs in Cancer: Biomarkers, Functions and Therapy ». *Trends in Molecular Medicine* 20 (8): 460-69. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005>.
- Heiner, Monika, Jingyi Hui, Silke Schreiner, Lee-Hsueh Hung, et Albrecht Bindereif. 2010. « HnRNP L-Mediated Regulation of Mammalian Alternative Splicing by Interference with Splice Site Recognition ». *RNA Biology* 7 (1): 56-64. <https://doi.org/10.4161/rna.7.1.10402>.
- Hendrickson, David G., Daniel J. Hogan, Heather L. McCullough, Jason W. Myers, Daniel Herschlag, James E. Ferrell, et Patrick O. Brown. 2009. « Concordant Regulation of Translation and mRNA Abundance for Hundreds of Targets of a Human MicroRNA ». Édité par Phillip D. Zamore. *PLoS Biology* 7 (11): e1000238. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000238>.
- Hentze, Matthias W., Alfredo Castello, Thomas Schwarzl, et Thomas Preiss. 2018. « A Brave New World of RNA-Binding Proteins ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (5): 327-41. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.130>.
- Hoek, K. S., G. J. Kidd, J. H. Carson, et R. Smith. 1998. « HnRNP A2 Selectively Binds the Cytoplasmic Transport Sequence of Myelin Basic Protein mRNA ». *Biochemistry* 37 (19): 7021-29. <https://doi.org/10.1021/bi9800247>.
- Huang, Huilin, Hengyou Weng, Wenju Sun, Xi Qin, Hailing Shi, Huizhe Wu, Boxuan Simen Zhao, et al. 2018. « Recognition of RNA N6-Methyladenosine by IGF2BP Proteins Enhances mRNA Stability and Translation ». *Nature Cell Biology* 20 (3): 285-95. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0045-z>.
- Huang, Wen, Xiao-Long Wei, WeiWei Ni, Mengda Cao, Ling Meng, et Haiwei Yang. 2017. « The Expression of RNA-Binding Protein RBM38 Decreased in Renal Cell Carcinoma and Represses Renal Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasion ». *Tumor Biology* 39 (5): 1010428317701635. <https://doi.org/10.1177/1010428317701635>.
- Hudson, Brian P., Maria A. Martinez-Yamout, H. Jane Dyson, et Peter E. Wright. 2004. « Recognition of the mRNA AU-Rich Element by the Zinc Finger Domain of TIS11d ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (3): 257-64. <https://doi.org/10.1038/nsmb738>.
- Huwiler, Andrea, el-Sayed Akool, Armaz Aschrafi, Farid M. A. Hamada, Josef Pfeilschifter, et Wolfgang Eberhardt. 2003. « ATP Potentiates Interleukin-1 Beta-Induced MMP-9 Expression in Mesangial Cells via Recruitment of the ELAV Protein HuR ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (51): 51758-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305722200>.
- Iino, Kaori, Yuichi Mitobe, Kazuhiro Ikeda, Ken-Ichi Takayama, Takashi Suzuki, Hidetaka Kawabata, Yutaka Suzuki, Kuniko Horie-Inoue, et Satoshi Inoue. 2020. « RNA-Binding Protein NONO Promotes Breast Cancer Proliferation by Post-Transcriptional Regulation of SKP2 and E2F8 ». *Cancer Science* 111 (1): 148-59. <https://doi.org/10.1111/cas.14240>.
- Inagaki, Fuyuhiko. 2013. « Protein NMR Resonance Assignment ». In *Encyclopedia of Biophysics*, édité par Gordon C. K. Roberts, 2033-37. Berlin, Heidelberg: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6\\_312](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_312).
- Ishimaru, Daniella, Sivakumar Ramalingam, Tapas K. Sengupta, Sumita Bandyopadhyay, Stephanie Dellis, Baby G. Tholanikunnel, Daniel J. Fernandes, et Eleanor K. Spicer. 2009. « Regulation of Bcl-2 Expression by HuR in HL60 Leukemia Cells and A431 Carcinoma Cells ». *Molecular Cancer Research: MCR* 7 (8): 1354-66. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0476>.
- Ishimaru, Daniella, Lisa Zuraw, Sivakumar Ramalingam, Tapas K. Sengupta, Sumita Bandyopadhyay, Adrian Reuben, Daniel J. Fernandes, et Eleanor K. Spicer. 2010. « Mechanism of Regulation of bcl-2 mRNA by Nucleolin and A+U-rich Element-binding Factor 1 (AUF1) ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (35): 27182-91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098830>.
- Izaurralde, E., A. Jarmolowski, C. Beisel, I. W. Mattaj, G. Dreyfuss, et U. Fischer. 1997. « A Role for the M9 Transport Signal of HnRNP A1 in mRNA Nuclear Export ». *The Journal of Cell Biology* 137 (1): 27-35. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.1.27>.
- Izquierdo, José M. 2008. « Hu Antigen R (HuR) Functions as an Alternative Pre-mRNA Splicing Regulator of Fas Apoptosis-Promoting Receptor on Exon Definition ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (27): 19077-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800017200>.

- Jenike, Ana E., et Marc K. Halushka. 2021. « miR-21: a non-specific biomarker of all maladies ». *Biomarker Research* 9 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00272-1>.
- Jiang, Peng, et Hilary Collier. 2012. « Functional Interactions Between microRNAs and RNA Binding Proteins ». *MicroRNA (Shariqah, United Arab Emirates)* 1 (1): 70-79.
- Jing, Qing, Shuang Huang, Sabine Guth, Tyler Zarubin, Andrea Motoyama, Jianming Chen, Franco Di Padova, Sheng-Cai Lin, Hermann Gram, et Jiahuai Han. 2005. « Involvement of MicroRNA in AU-Rich Element-Mediated mRNA Instability ». *Cell* 120 (5): 623-34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.038>.
- Jones, P G, R A VanBogelen, et F C Neidhardt. 1987. « Induction of proteins in response to low temperature in Escherichia coli. ». *Journal of Bacteriology* 169 (5): 2092-95.
- Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, et al. 2021. « Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold ». *Nature* 596 (7873): 583-89. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Jużwik, Camille A., Sienna S. Drake, Yang Zhang, Nicolas Paradis-Isler, Alexandra Sylvester, Alexandre Amar-Zifkin, Chelsea Douglas, Barbara Morquette, Craig S. Moore, et Alyson E. Fournier. 2019. « microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review ». *Progress in Neurobiology* 182 (novembre): 101664. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101664>.
- Kahvejian, Avak, Yuri V. Svitkin, Rami Sukarieh, Marie-Noël M'Boutchou, et Nahum Sonenberg. 2005. « Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms ». *Genes & Development* 19 (1): 104-13. <https://doi.org/10.1101/gad.1262905>.
- Kang, Min-Ju, Byung-Kyu Ryu, Min-Goo Lee, Jikhyon Han, Jin-Hee Lee, Tae-Kyu Ha, Do-Sun Byun, et al. 2008. « NF-KappaB Activates Transcription of the RNA-Binding Factor HuR, via PI3K-AKT Signaling, to Promote Gastric Tumorigenesis ». *Gastroenterology* 135 (6): 2030-42, 2042.e1-3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.08.009>.
- Karamanos, Theodoros K., Arnout P. Kalverda, Gary S. Thompson, et Sheena E. Radford. 2015. « Mechanisms of Amyloid Formation Revealed by Solution NMR ». *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 88-89 (août): 86-104. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2015.05.002>.
- Kaur, Kawaljit, Xiaoqing Wu, James K. Fields, David K. Johnson, Lan Lan, Miranda Pratt, Amber D. Somoza, et al. 2017. « The Fungal Natural Product Azaphilone-9 Binds to HuR and Inhibits HuR-RNA Interaction in Vitro ». *PLoS One* 12 (4): e0175471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175471>.
- Kawai, Tomoko, Ashish Lal, Xiaoling Yang, Stefanie Galban, Krystyna Mazan-Mamczarz, et Myriam Gorospe. 2006. « Translational Control of Cytochrome c by RNA-Binding Proteins TIA-1 and HuR ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (8): 3295-3307. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.3295-3307.2006>.
- Kim, Hyeon Ho, Kotb Abdelmohsen, Ashish Lal, Rudolf Pullmann, Xiaoling Yang, Stefanie Galban, Subramanya Srikantan, et al. 2008. « Nuclear HuR Accumulation through Phosphorylation by Cdk1 ». *Genes & Development* 22 (13): 1804-15. <https://doi.org/10.1101/gad.1645808>.
- Kim, Hyeon Ho, et Myriam Gorospe. 2008. « Phosphorylated HuR Shuttles in Cycles ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (20): 3124-26. <https://doi.org/10.4161/cc.7.20.6884>.
- Kim, Hyeon Ho, Yuki Kuwano, Subramanya Srikantan, Eun Kyung Lee, Jennifer L. Martindale, et Myriam Gorospe. 2009. « HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression ». *Genes & Development* 23 (15): 1743-48. <https://doi.org/10.1101/gad.1812509>.
- Kim, Jongpil, Keiichi Inoue, Jennifer Ishii, William B. Vanti, Sergey V. Voronov, Elizabeth Murchison, Gregory Hannon, et Asa Abeliovich. 2007. « A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons ». *Science (New York, N.Y.)* 317 (5842): 1220-24. <https://doi.org/10.1126/science.1140481>.
- Koromilas, A. E., A. Lazaris-Karatzas, et N. Sonenberg. 1992. « MRNAs Containing Extensive Secondary Structure in Their 5' Non-Coding Region Translate Efficiently in Cells Overexpressing Initiation Factor EIF-4E ». *The EMBO Journal* 11 (11): 4153-58. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05508.x>.

- Koutsoumpa, Marina, Hsiao-Wang Chen, Neil O'Brien, Filippos Koinis, Swapna Mahurkar-Joshi, Christina Vorvis, Artin Soroosh, et al. 2018. « MKAD-21 Suppresses the Oncogenic Activity of the MiR-21/PPP2R2A/ERK Molecular Network in Bladder Cancer ». *Molecular Cancer Therapeutics* 17 (7): 1430-40. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1049>.
- Kozomara, Ana, Maria Birgaoanu, et Sam Griffiths-Jones. 2019. « miRBase: from microRNA sequences to function ». *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D155-62. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.
- Kretov, Dmitry A, Marie-Jeanne Clément, Guillaume Lambert, Dominique Durand, Dmitry N Lyabin, Guillaume Bollot, Cyril Bauvais, et al. 2019. « YB-1, an Abundant Core mRNA-Binding Protein, Has the Capacity to Form an RNA Nucleoprotein Filament: A Structural Analysis ». *Nucleic Acids Research* 47 (6): 3127-41. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1303>.
- Kullmann, Michael, Ulrich Göpfert, Basile Siewe, et Ludger Hengst. 2002. « ELAV/Hu Proteins Inhibit P27 Translation via an IRES Element in the P27 5'UTR ». *Genes & Development* 16 (23): 3087-99. <https://doi.org/10.1101/gad.248902>.
- Kuwano, Yuki, Imed-Eddine Gallouzi, et Myriam Gorospe. 2010. « Role of the RNA-Binding Protein HuR in Apoptosis and Apoptosome Function ». In *Apoptosome: An up-and-Coming Therapeutical Tool*, édité par Francesco Cecconi et Marcello D'Amelio, 203-20. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3415-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3415-1_10).
- Lafarga, Vanesa, Ana Cuadrado, Isabel Lopez de Silanes, Rocio Bengoechea, Oscar Fernandez-Capetillo, et Angel R. Nebreda. 2009. « P38 Mitogen-Activated Protein Kinase- and HuR-Dependent Stabilization of P21(Cip1) mRNA Mediates the G(1)/S Checkpoint ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (16): 4341-51. <https://doi.org/10.1128/MCB.00210-09>.
- Lahr, Roni M, Bruno D Fonseca, Gabrielle E Ciotti, Hiba A Al-Ashtal, Jian-Jun Jia, Marius R Niklaus, Sarah P Blagden, Tommy Alain, et Andrea J Berman. 2017. « La-related protein 1 (LARP1) binds the mRNA cap, blocking eIF4F assembly on TOP mRNAs ». Édité par Cynthia Wolberger. *eLife* 6 (avril): e24146. <https://doi.org/10.7554/eLife.24146>.
- Lal, Ashish, Tomoko Kawai, Xiaoling Yang, Krystyna Mazan-Mamczarz, et Myriam Gorospe. 2005. « Antiapoptotic Function of RNA-Binding Protein HuR Effected through Prothymosin Alpha ». *The EMBO Journal* 24 (10): 1852-62. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600661>.
- Landgraf, Pablo, Mirabela Rusu, Robert Sheridan, Alain Sewer, Nicola Iovino, Alexei Aravin, Sébastien Pfeffer, et al. 2007. « A Mammalian MicroRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing ». *Cell* 129 (7): 1401-14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.040>.
- Lawrie, Charles H., Shamit Soneji, Teresa Marafioti, Christopher D. O. Cooper, Stefano Palazzo, Jennifer C. Paterson, Helen Cattan, et al. 2007. « MicroRNA Expression Distinguishes between Germinal Center B Cell-like and Activated B Cell-like Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma ». *International Journal of Cancer* 121 (5): 1156-61. <https://doi.org/10.1002/ijc.22800>.
- Lee, K M, D Cao, A Itami, P M Pour, R H Hruban, A Maitra, et M M Ouellette. 2007. « Class III  $\beta$ -Tubulin, a Marker of Resistance to Paclitaxel, Is Overexpressed in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Intraepithelial Neoplasia ». *Histopathology* 51 (4): 539-46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02792.x>.
- Lee, Kyue-Yim, Ji Hye Im, Weiwei Lin, Ho-Shin Gwak, Jong Heon Kim, Byong Chul Yoo, Tae Hoon Kim, et al. 2020. « Nanoparticles in 472 Human Cerebrospinal Fluid: Changes in Extracellular Vesicle Concentration and MiR-21 Expression as a Biomarker for Leptomeningeal Metastasis ». *Cancers* 12 (10): 2745. <https://doi.org/10.3390/cancers12102745>.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et V. Ambros. 1993. « The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14 ». *Cell* 75 (5): 843-54. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y).
- Lee, Soon-Tae, Kon Chu, Keun-Hwa Jung, Jin Hee Kim, Ji-Young Huh, Hyejin Yoon, Dong-Kyu Park, et al. 2012. « MiR-206 Regulates Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer Disease Model ». *Annals of Neurology* 72 (2): 269-77. <https://doi.org/10.1002/ana.23588>.
- Leibovich, Limor, Yael Mandel-Gutfreund, et Zohar Yakhini. 2010. « A structural-based statistical approach suggests a cooperative activity of PUM1 and miR-410 in human 3'-untranslated regions ». *Silence* 1 (septembre): 17. <https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-17>.

- Levy, N. S., S. Chung, H. Furneaux, et A. P. Levy. 1998. « Hypoxic Stabilization of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA by the RNA-Binding Protein HuR ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (11): 6417-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.11.6417>.
- Liao, Wan-Lin, Wei-Chiao Wang, Wen-Chang Chang, et Joseph T. Tseng. 2011. « The RNA-Binding Protein HuR Stabilizes Cytosolic Phospholipase A2 $\alpha$  mRNA under Interleukin-1 $\beta$  Treatment in Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (41): 35499-508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.263582>.
- Lindquist, Jonathan A., et Peter R. Mertens. 2018. « Cold Shock Proteins: From Cellular Mechanisms to Pathophysiology and Disease ». *Cell Communication and Signaling: CCS* 16 (1): 63. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0274-6>.
- Liu, Gang, Arnaud Friggeri, Yanping Yang, Jadranka Milosevic, Qiang Ding, Victor J. Thannickal, Naftali Kaminski, et Edward Abraham. 2010. « MiR-21 Mediates Fibrogenic Activation of Pulmonary Fibroblasts and Lung Fibrosis ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (8): 1589-97. <https://doi.org/10.1084/jem.20100035>.
- Liu-Yesucevitz, Liqun, Aylin Bilgutay, Yong-Jie Zhang, Tara Vanderweyde, Allison Citro, Tapan Mehta, Nava Zaarur, et al. 2010. « Tar DNA Binding Protein-43 (TDP-43) Associates with Stress Granules: Analysis of Cultured Cells and Pathological Brain Tissue ». *PLoS One* 5 (10): e13250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013250>.
- Löffler, Dennis, Katja Brocke-Heidrich, Gabriele Pfeifer, Claudia Stocsits, Jörg Hackermüller, Antje K. Kretschmar, Renate Burger, et al. 2007. « Interleukin-6 Dependent Survival of Multiple Myeloma Cells Involves the Stat3-Mediated Induction of MicroRNA-21 through a Highly Conserved Enhancer ». *Blood* 110 (4): 1330-33. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-081133>.
- Loffreda, Alessia, Aurora Rigamonti, Silvia M. L. Barabino, et Silvia C. Lenzken. 2015. « RNA-Binding Proteins in the Regulation of miRNA Activity: A Focus on Neuronal Functions ». *Biomolecules* 5 (4): 2363-87. <https://doi.org/10.3390/biom5042363>.
- Lu, Thomas X., Ariel Munitz, et Marc E. Rothenberg. 2009. « MicroRNA-21 Is up-Regulated in Allergic Airway Inflammation and Regulates IL-12p35 Expression ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (8): 4994-5002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803560>.
- Lu, Z., M. Liu, V. Stribinskis, C. M. Klinge, K. S. Ramos, N. H. Colburn, et Y. Li. 2008. « MicroRNA-21 Promotes Cell Transformation by Targeting the Programmed Cell Death 4 Gene ». *Oncogene* 27 (31): 4373-79. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.72>.
- Lucchesi, C., M. S. Sheikh, et Y. Huang. 2016. « Negative Regulation of RNA-Binding Protein HuR by Tumor-Suppressor ECRG2 ». *Oncogene* 35 (20): 2565-73. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.339>.
- Lunde, Bradley M., Claire Moore, et Gabriele Varani. 2007. « RNA-binding proteins: modular design for efficient function ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (6): 479-90. <https://doi.org/10.1038/nrm2178>.
- Ma, W J, S Chung, et H Furneaux. 1997. « The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. » *Nucleic Acids Research* 25 (18): 3564-69.
- Mangus, David A., Matthew C. Evans, et Allan Jacobson. 2003. « Poly(A)-Binding Proteins: Multifunctional Scaffolds for the Post-Transcriptional Control of Gene Expression ». *Genome Biology* 4 (7): 223. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-7-223>.
- Martin del Campo, Sara E., Nicholas Latchana, Kala M. Levine, Valerie P. Grignol, Ene T. Fairchild, Alena Cristina Jaime-Ramirez, Thao-Vi Dao, et al. 2015. « MiR-21 Enhances Melanoma Invasiveness via Inhibition of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3 Expression: In Vivo Effects of MiR-21 Inhibitor ». *PLoS One* 10 (1): e0115919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115919>.
- Masliah, Grégoire, Pierre Barraud, et Frédéric H-T Allain. 2013. « RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (11): 1875-95. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1119-x>.
- Maucuer, Alexandre, Bénédicte Desforges, Vandana Joshi, Mirela Boca, Dmitry A. Kretov, Loic Hamon, Ahmed Bouhss, Patrick A. Curmi, et David Pastré. 2018. « Microtubules as Platforms for Probing Liquid-Liquid Phase Separation in Cells - Application to RNA-Binding Proteins ». *Journal of Cell Science* 131 (11): jcs214692. <https://doi.org/10.1242/jcs.214692>.



- Mavrakis, Konstantinos J., Andrew L. Wolfe, Elisa Oricchio, Teresa Palomero, Kim de Keersmaecker, Katherine McJunkin, Johannes Zuber, et al. 2010. « Genome-wide RNAi screen identifies miR-19 targets in Notch-induced acute T-cell leukaemia (T-ALL) ». *Nature cell biology* 12 (4): 372-79. <https://doi.org/10.1038/ncb2037>.
- Mazan-Mamczarz, K., P. R. Hagner, S. Corl, S. Srikantan, W. H. Wood, K. G. Becker, M. Gorospe, J. D. Keene, A. S. Levenson, et R. B. Gartenhaus. 2008. « Post-Transcriptional Gene Regulation by HuR Promotes a More Tumorigenic Phenotype ». *Oncogene* 27 (47): 6151-63. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.215>.
- Mazan-Mamczarz, Krystyna, Stefanie Galbán, Isabel López de Silanes, Jennifer L. Martindale, Ulus Atasoy, Jack D. Keene, et Myriam Gorospe. 2003. « RNA-Binding Protein HuR Enhances P53 Translation in Response to Ultraviolet Light Irradiation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8354-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432104100>.
- Mazroui, Rachid, Sergio Di Marco, Eveline Clair, Christopher von Roretz, Scott A. Tenenbaum, Jack D. Keene, Maya Saleh, et Imed-Eddine Gallouzi. 2008. « Caspase-Mediated Cleavage of HuR in the Cytoplasm Contributes to Pp32/PHAP-I Regulation of Apoptosis ». *The Journal of Cell Biology* 180 (1): 113-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709030>.
- Mei, Mei, Yu Ren, Xuan Zhou, Xu-bo Yuan, Lei Han, Guang-xiu Wang, Zhifan Jia, Pei-yu Pu, Chun-sheng Kang, et Zhi Yao. 2010. « Downregulation of MiR-21 Enhances Chemotherapeutic Effect of Taxol in Breast Carcinoma Cells ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 9 (1): 77-86. <https://doi.org/10.1177/153303461000900109>.
- Miao, Lingling, Hailan Yao, Chenggang Li, Mengfan Pu, Xuan Yao, Hui Yang, Xinming Qi, Jin Ren, et Yizheng Wang. 2016. « A Dual Inhibition: MicroRNA-552 Suppresses Both Transcription and Translation of Cytochrome P450 2E1 ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1859 (4): 650-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.02.016>.
- Miki, Takashi, Keizo Takano, et Yoshihiro Yoneda. 2005. « The Role of Mammalian Staufen on mRNA Traffic: A View from Its Nucleocytoplasmic Shuttling Function ». *Cell Structure and Function* 30 (2): 51-56. <https://doi.org/10.1247/csf.30.51>.
- Milne, Anya N. A., Ralph Carvalho, Folkert M. Morsink, Alex R. Musler, Wendy W. J. de Leng, Ari Ristimäki, et G. Johan A. Offerhaus. 2006. « Early-Onset Gastric Cancers Have a Different Molecular Expression Profile than Conventional Gastric Cancers ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 19 (4): 564-72. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800563>.
- Mukherjee, Kamalika, Bartika Ghoshal, Souvik Ghosh, Yogaditya Chakrabarty, Shivaprasad Shwetha, Saumitra Das, et Suvendra N. Bhattacharyya. 2016. « Reversible HuR-MicroRNA Binding Controls Extracellular Export of MiR-122 and Augments Stress Response ». *EMBO Reports* 17 (8): 1184-1203. <https://doi.org/10.15252/embr.201541930>.
- Mukherjee, Neelanjan, David L. Corcoran, Jeffrey D. Nusbaum, David W. Reid, Stoyan Georgiev, Markus Hafner, Manuel Ascano, Thomas Tuschl, Uwe Ohler, et Jack D. Keene. 2011. « Integrative Regulatory Mapping Indicates That the RNA-Binding Protein HuR Couples Pre-mRNA Processing and mRNA Stability ». *Molecular Cell* 43 (3): 327-39. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.007>.
- Muralidharan, Ranganayaki, Anish Babu, Narsireddy Amreddy, Akhil Srivastava, Allshine Chen, Yan Daniel Zhao, Uday B. Kompella, Anupama Munshi, et Rajagopal Ramesh. 2017. « Tumor-Targeted Nanoparticle Delivery of HuR siRNA Inhibits Lung Tumor Growth In Vitro and In Vivo By Disrupting the Oncogenic Activity of the RNA-Binding Protein HuR ». *Molecular Cancer Therapeutics* 16 (8): 1470-86. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0134>.
- Nabors, L. B., G. Y. Gillespie, L. Harkins, et P. H. King. 2001. « HuR, a RNA Stability Factor, Is Expressed in Malignant Brain Tumors and Binds to Adenine- and Uridine-Rich Elements within the 3' Untranslated Regions of Cytokine and Angiogenic Factor MRNAs ». *Cancer Research* 61 (5): 2154-61.

- Neuhaus, David. 2022. « Zinc finger structure determination by NMR: Why zinc fingers can be a handful ». *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 130-131 (juin): 62-105. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2022.07.001>.
- Nguyen-Chi, Mai, et Dominique Morello. 2008. « Contribution De La Régulation post-transcriptionnelle À L'émergence De Maladies: L'enfance De L'are ». *médecine/sciences* 24 (3): 290-96. <https://doi.org/10.1051/medsci/2008243290>.
- Niklasson, Markus, Renee Otten, Alexandra Ahlner, Cecilia Andresen, Judith Schlagnitweit, Katja Petzold, et Patrik Lundström. 2017. « Comprehensive Analysis of NMR Data Using Advanced Line Shape Fitting ». *Journal of Biomolecular NMR* 69 (2): 93-99. <https://doi.org/10.1007/s10858-017-0141-6>.
- Nutter, Curtis A., Elizabeth A. Jaworski, Sunil K. Verma, Vaibhav Deshmukh, Qiongling Wang, Olga B. Botvinnik, Mario J. Lozano, et al. 2016. « Dysregulation of RBFOX2 is an early event in cardiac pathogenesis of diabetes ». *Cell reports* 15 (10): 2200-2213. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.002>.
- O'Brien, Jacob, Heyam Hayder, Yara Zayed, et Chun Peng. 2018. « Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation ». *Frontiers in Endocrinology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00402>.
- Ørom, Ulf Andersson, Finn Cilius Nielsen, et Anders H. Lund. 2008. « MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein MRNAs and Enhances Their Translation ». *Molecular Cell* 30 (4): 460-71. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.001>.
- Pabis, Marta, Grzegorz M Popowicz, Ralf Stehle, David Fernández-Ramos, Sam Asami, Lisa Warner, Sofía M García-Mauriño, et al. 2019a. « HuR Biological Function Involves RRM3-Mediated Dimerization and RNA Binding by All Three RRM3 ». *Nucleic Acids Research* 47 (2): 1011-29. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1138>.
- . 2019b. « HuR Biological Function Involves RRM3-Mediated Dimerization and RNA Binding by All Three RRM3 ». *Nucleic Acids Research* 47 (2): 1011-29. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1138>.
- Pan, Xuan, Zhao-Xia Wang, et Rui Wang. 2010. « MicroRNA-21: A novel therapeutic target in human cancer ». *Cancer Biology & Therapy* 10 (12): 1224-32. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.12.14252>.
- Pang, Lijun, Haiyan Tian, Na Chang, Jie Yi, Lixiang Xue, Bin Jiang, Myriam Gorospe, Xiaowei Zhang, et Wengong Wang. 2013. « Loss of CARM1 Is Linked to Reduced HuR Function in Replicative Senescence ». *BMC Molecular Biology* 14 (juillet): 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-14-15>.
- Papagiannakopoulos, Thales, Alice Shapiro, et Kenneth S. Kosik. 2008. « MicroRNA-21 Targets a Network of Key Tumor-Suppressive Pathways in Glioblastoma Cells ». *Cancer Research* 68 (19): 8164-72. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1305>.
- Park, Seokju, Hee Doo Yang, Jwa-Won Seo, Jin-Wu Nam, et Suk Woo Nam. 2022. « HnRNPC Induces Isoform Shifts in MiR-21-5p Leading to Cancer Development ». *Experimental & Molecular Medicine* 54 (6): 812-24. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00792-2>.
- Paronetto, Maria Paola, Tilman Achsel, Autumn Massiello, Charles E. Chalfant, et Claudio Sette. 2007. « The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x ». *The Journal of Cell Biology* 176 (7): 929-39. <https://doi.org/10.1083/jcb.200701005>.
- Peng, S S, C Y Chen, N Xu, et A B Shyu. 1998. « RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. ». *The EMBO Journal* 17 (12): 3461-70. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3461>.
- Peng, Yong, et Carlo M Croce. 2016. « The role of MicroRNAs in human cancer ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 1 (janvier): 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>.
- Piñol-Roma, S., M. S. Swanson, J. G. Gall, et G. Dreyfuss. 1989. « A Novel Heterogeneous Nuclear RNP Protein with a Unique Distribution on Nascent Transcripts ». *The Journal of Cell Biology* 109 (6 Pt 1): 2575-87. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.6.2575>.
- Poon, Evon, Adrian L. Harris, et Margaret Ashcroft. 2009. « Targeting the Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Pathway in Cancer ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11 (août): e26. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001173>.

- Poria, D K, A Guha, I Nandi, et P S Ray. 2016a. « RNA-Binding Protein HuR Sequesters MicroRNA-21 to Prevent Translation Repression of Proinflammatory Tumor Suppressor Gene Programmed Cell Death 4 ». *Oncogene* 35 (13): 1703-15. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.235>.
- Ramachandra, Raghuvver K., Mohamed Salem, Scott Gahr, Caird E. Rexroad, et Jianbo Yao. 2008. « Cloning and Characterization of MicroRNAs from Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*): Their Expression during Early Embryonic Development ». *BMC Developmental Biology* 8 (avril): 41. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-41>.
- Raspaglio, Giuseppina, Ilaria De Maria, Flavia Filippetti, Enrica Martinelli, Gian Franco Zannoni, Silvia Prislei, Gabriella Ferrandina, Shohreh Shahabi, Giovanni Scambia, et Cristiano Ferlini. 2010. « HuR Regulates Beta-Tubulin Isotype Expression in Ovarian Cancer ». *Cancer Research* 70 (14): 5891-5900. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4656>.
- REBANE, ANA, ALAR AAB, et JOAN A. STEITZ. 2004. « Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR ». *RNA* 10 (4): 590-99. <https://doi.org/10.1261/rna.5224304>.
- Rejeski, Kai, Jesús Duque-Afonso, et Michael Lübbert. 2021. « AML1/ETO and Its Function as a Regulator of Gene Transcription via Epigenetic Mechanisms ». *Oncogene* 40 (38): 5665-76. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01952-w>.
- Rengifo-Gonzalez, Juan Carlos, Krystel El Hage, Marie-Jeanne Clément, Emilie Steiner, Vandana Joshi, Pierrick Craveur, Dominique Durand, David Pastré, et Ahmed Bouhss. 2021. « The Cooperative Binding of TDP-43 to GU-Rich RNA Repeats Antagonizes TDP-43 Aggregation ». *ELife* 10 (septembre): e67605. <https://doi.org/10.7554/eLife.67605>.
- Rhim, Jiho, Woosun Baek, Yoona Seo, et Jong Heon Kim. 2022. « From Molecular Mechanisms to Therapeutics: Understanding MicroRNA-21 in Cancer ». *Cells* 11 (18): 2791. <https://doi.org/10.3390/cells11182791>.
- Ripin, Nina, Julien Boudet, Malgorzata M. Duszczuk, Alexandra Hinniger, Michael Faller, Miroslav Krepl, Abhilash Gadi, et al. 2019a. « Molecular basis for AU-rich element recognition and dimerization by the HuR C-terminal RRM ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (8): 2935-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808696116>.
- Roberts, Ashley P. E., Andrew P. Lewis, et Catherine L. Jopling. 2011. « miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components ». *Nucleic Acids Research* 39 (17): 7716-29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr426>.
- Rossi, Paolo, G. V. T. Swapna, Yuanpeng J. Huang, James M. Aramini, Clemens Anklin, Kenith Conover, Keith Hamilton, et al. 2010. « A microscale protein NMR sample screening pipeline ». *Journal of Biomolecular Nmr* 46 (1): 11-22. <https://doi.org/10.1007/s10858-009-9386-z>.
- Rupaimoole, Rajesha, et Frank J. Slack. 2017. « MicroRNA Therapeutics: Towards a New Era for the Management of Cancer and Other Diseases ». *Nature Reviews Drug Discovery* 16 (3): 203-22. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>.
- Sahoo, Pabitra K., Seung Joon Lee, Poonam B. Jaiswal, Stefanie Alber, Amar N. Kar, Sharmina Miller-Randolph, Elizabeth E. Taylor, et al. 2018. « Axonal G3BP1 Stress Granule Protein Limits Axonal MRNA Translation and Nerve Regeneration ». *Nature Communications* 9 (1): 3358. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05647-x>.
- Schanda, Paul, et Bernhard Brutscher. 2005. « Very Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy for Real-Time Investigation of Dynamic Events in Proteins on the Time Scale of Seconds ». *Journal of the American Chemical Society* 127 (22): 8014-15. <https://doi.org/10.1021/ja051306e>.
- Scheiba, Rafael M., Alain Ibáñez de Opakua, Antonio Díaz-Quintana, Isabel Cruz-Gallardo, Luis A. Martínez-Cruz, María L. Martínez-Chantar, Francisco J. Blanco, et Irene Díaz-Moreno. 2014a. « The C-Terminal RNA Binding Motif of HuR Is a Multi-Functional Domain Leading to HuR Oligomerization and Binding to U-Rich RNA Targets ». *RNA Biology* 11 (10): 1250-61. <https://doi.org/10.1080/15476286.2014.996069>.
- Schindelin, H, W Jiang, M Inouye, et U Heinemann. 1994. « Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of Escherichia coli. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (11): 5119-23.

- Sheflin, Lowell G., Ai-Ping Zou, et Stephen W. Spaulding. 2004. « Androgens Regulate the Binding of Endogenous HuR to the AU-Rich 3'UTRs of HIF-1 $\alpha$  and EGF mRNA ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322 (2): 644-51. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.173>.
- Sicard, Flavie, Marion Gayral, Hubert Lulka, Louis Buscail, et Pierre Cordelier. 2013. « Targeting MiR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (5): 986-94. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.35>.
- Singh, Mahavir, Charles P. Choi, et Juli Feigon. 2013. « xRRM ». *RNA Biology* 10 (3): 353-59. <https://doi.org/10.4161/rna.23608>.
- Singh, Sanjay K., Mohamedi N. Kagalwala, Jan Parker-Thornburg, Henry Adams, et Sadhan Majumder. 2008. « REST Maintains Self-Renewal and Pluripotency of Embryonic Stem Cells ». *Nature* 453 (7192): 223-27. <https://doi.org/10.1038/nature06863>.
- Siomi, H., M. J. Matunis, W. M. Michael, et G. Dreyfuss. 1993. « The Pre-mRNA Binding K Protein Contains a Novel Evolutionarily Conserved Motif ». *Nucleic Acids Research* 21 (5): 1193-98. <https://doi.org/10.1093/nar/21.5.1193>.
- Slabáková, Eva, Zoran Culig, Ján Remšík, et Karel Souček. 2017. « Alternative Mechanisms of MiR-34a Regulation in Cancer ». *Cell Death & Disease* 8 (10): e3100-e3100. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.495>.
- Sossin, Wayne S., et Luc DesGroseillers. 2006. « Intracellular Trafficking of RNA in Neurons ». *Traffic* 7 (12): 1581-89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00500.x>.
- Srikantan, Subramanya, et Myriam Gorospe. 2012. « HuR function in disease ». *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 17 (janvier): 189-205.
- Srivastava, Vijay Kumar, et Rupali Yadav. 2019. « Chapter 9 - Isothermal titration calorimetry ». In *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*, édité par Gauri Misra, 125-37. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816548-5.00009-5>.
- Stefl, Richard, Lenka Skrisovska, et Frédéric H.-T. Allain. 2005. « RNA sequence- and shape-dependent recognition by proteins in the ribonucleoprotein particle ». *EMBO Reports* 6 (1): 33-38. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400325>.
- Sträßer, Katja, et Ed Hurt. 2000. « Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export ». *The EMBO Journal* 19 (3): 410-20. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.3.410>.
- Suk, Terry R., et Maxime W. C. Rousseaux. 2020. « The role of TDP-43 mislocalization in amyotrophic lateral sclerosis ». *Molecular Neurodegeneration* 15 (1): 45. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00397-1>.
- Svoronos, Alexander A., Donald M. Engelman, et Frank J. Slack. 2016. « OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer ». *Cancer Research* 76 (13): 3666-70. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>.
- The UniProt Consortium. 2023. « UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023 ». *Nucleic Acids Research* 51 (D1): D523-31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>.
- Thorland, Erik C., Shannon L. Myers, Bobbie S. Gostout, et David I. Smith. 2003. « Common Fragile Sites Are Preferential Targets for HPV16 Integrations in Cervical Tumors ». *Oncogene* 22 (8): 1225-37. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206170>.
- Thum, Thomas, Carina Gross, Jan Fiedler, Thomas Fischer, Stephan Kissler, Markus Bussen, Paolo Galuppo, et al. 2008. « MicroRNA-21 Contributes to Myocardial Disease by Stimulating MAP Kinase Signalling in Fibroblasts ». *Nature* 456 (7224): 980-84. <https://doi.org/10.1038/nature07511>.
- Tran, Hoanh, Fabienne Maurer, et Yoshikuni Nagamine. 2003. « Stabilization of Urokinase and Urokinase Receptor MRNAs by HuR Is Linked to Its Cytoplasmic Accumulation Induced by Activated Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2 ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (20): 7177-88. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.20.7177-7188.2003>.
- Treiber, Thomas, Nora Treiber, Uwe Plessmann, Simone Harlander, Julia-Lisa Daiß, Norbert Eichner, Gerhard Lehmann, Kevin Schall, Henning Urlaub, et Gunter Meister. 2017. « A Compendium of

- RNA-Binding Proteins that Regulate MicroRNA Biogenesis ». *Molecular Cell* 66 (2): 270-284.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.014>.
- Truesdell, S. S., R. D. Mortensen, M. Seo, J. C. Schroeder, J. H. Lee, O. LeTonqueze, et S. Vasudevan. 2012. « MicroRNA-Mediated mRNA Translation Activation in Quiescent Cells and Oocytes Involves Recruitment of a Nuclear MicroRNP ». *Scientific Reports* 2: 842. <https://doi.org/10.1038/srep00842>.
- Ule, Jernej, Giovanni Stefani, Aldo Mele, Matteo Ruggiu, Xuning Wang, Bahar Taneri, Terry Gaasterland, Benjamin J. Blencowe, et Robert B. Darnell. 2006. « An RNA Map Predicting Nova-Dependent Splicing Regulation ». *Nature* 444 (7119): 580-86. <https://doi.org/10.1038/nature05304>.
- Valverde, Roberto, Laura Edwards, et Lynne Regan. 2008. « Structure and Function of KH Domains ». *The FEBS Journal* 275 (11): 2712-26. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06411.x>.
- Varadi, Mihaly, Stephen Anyango, Mandar Deshpande, Sreenath Nair, Cindy Natassia, Galabina Yordanova, David Yuan, et al. 2022. « AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models ». *Nucleic Acids Research* 50 (D1): D439-44. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.
- Vasudevan, Shobha, et Joan A. Steitz. 2007. « AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2 ». *Cell* 128 (6): 1105-18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.038>.
- Vasudevan, Shobha, Yingchun Tong, et Joan A. Steitz. 2007. « Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can up-Regulate Translation ». *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858): 1931-34. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>.
- Venditti, Vincenzo, et Nicolas L. Fawzi. 2018. « Probing the Atomic Structure of Transient Protein Contacts by Paramagnetic Relaxation Enhancement Solution NMR ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1688: 243-55. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7386-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7386-6_12).
- Venter, J. Craig, Mark D. Adams, Eugene W. Myers, Peter W. Li, Richard J. Mural, Granger G. Sutton, Hamilton O. Smith, et al. 2001. « The Sequence of the Human Genome ». *Science* 291 (5507): 1304-51. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>.
- Vigouroux, Charlène, Jean-Matthieu Casse, Shyue-Fang Battaglia-Hsu, Lydia Brochin, Amandine Luc, Christophe Paris, Stéphanie Lacomme, Jean-Louis Gueant, Jean-Michel Vignaud, et Guillaume Gauchotte. 2015. « Methyl(R217)HuR and MCM6 Are Inversely Correlated and Are Prognostic Markers in Non Small Cell Lung Carcinoma ». *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 89 (2): 189-96. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.05.008>.
- Volinia, Stefano, George A. Calin, Chang-Gong Liu, Stefan Ambros, Amelia Cimmino, Fabio Petrocca, Rosa Visone, et al. 2006. « A MicroRNA Expression Signature of Human Solid Tumors Defines Cancer Gene Targets ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (7): 2257-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510565103>.
- Walz, Amy L., Ariadne Ooms, Samantha Gadd, Daniela S. Gerhard, Malcolm A. Smith, Jamie M. Guidry Auvil, Daoud Meerzaman, et al. 2015. « Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX Homeodomain Mutations in Favorable Histology Wilms Tumors ». *Cancer cell* 27 (2): 286-97. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.01.003>.
- Wang, Bo, Shu-hao Hsu, Xinmei Wang, Huban Kutay, Hemant Kumar Bid, Jianhua Yu, Ramesh Ganju, Samson Jacob, Mariia Yuneva, et Kalpana Ghoshal. 2014. « Reciprocal Regulation of miR-122 and c-Myc in Hepatocellular Cancer: Role of E2F1 and TFDP2 ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (2): 555-66. <https://doi.org/10.1002/hep.26712>.
- Wang, Eric T., Rickard Sandberg, Shujun Luo, Irina Khrebtkova, Lu Zhang, Christine Mayr, Stephen F. Kingsmore, Gary P. Schroth, et Christopher B. Burge. 2008. « Alternative Isoform Regulation in Human Tissue Transcriptomes ». *Nature* 456 (7221): 470-76. <https://doi.org/10.1038/nature07509>.
- Wang, Hong, Fuxing Zeng, Qiao Liu, Huihui Liu, Zexian Liu, Liwen Niu, Maikun Teng, et Xu Li. 2013. « The Structure of the ARE-Binding Domains of Hu Antigen R (HuR) Undergoes Conformational Changes during RNA Binding ». *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 69 (Pt 3): 373-80. <https://doi.org/10.1107/S0907444912047828>.

- Wang, Jing, Qi Liu, et Yu Shyr. 2015. « Dysregulated transcription across diverse cancer types reveals the importance of RNA-binding protein in carcinogenesis ». *BMC Genomics* 16 (7): S5. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S7-S5>.
- Wang, Jun, Yan Guo, Huili Chu, Yaping Guan, Jingwang Bi, et Baocheng Wang. 2013. « Multiple Functions of the RNA-Binding Protein HuR in Cancer Progression, Treatment Responses and Prognosis ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (5): 10015-41. <https://doi.org/10.3390/ijms140510015>.
- Wang, W., H. Furneaux, H. Cheng, M. C. Caldwell, D. Hutter, Y. Liu, N. Holbrook, et M. Gorospe. 2000. « HuR Regulates P21 mRNA Stabilization by UV Light ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (3): 760-69. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.3.760-769.2000>.
- Wang, Wengong, M. Craig Caldwell, Shankung Lin, Henry Furneaux, et Myriam Gorospe. 2000. « HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation ». *The EMBO Journal* 19 (10): 2340-50. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.10.2340>.
- Wang, Xianxi, et Yusen Liu. 2007. « Regulation of Innate Immune Response by MAP Kinase Phosphatase-1 ». *Cellular Signalling* 19 (7): 1372-82. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.03.013>.
- Wang, Zhao-Xia, Bin-Bin Lu, He Wang, Zhi-Xiang Cheng, et Yong-Mei Yin. 2011. « MicroRNA-21 Modulates Chemosensitivity of Breast Cancer Cells to Doxorubicin by Targeting PTEN ». *Archives of Medical Research* 42 (4): 281-90. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2011.06.008>.
- Waudby, Christopher A., Andres Ramos, Lisa D. Cabrita, et John Christodoulou. 2016. « Two-Dimensional NMR Lineshape Analysis ». *Scientific Reports* 6 (1): 24826. <https://doi.org/10.1038/srep24826>.
- Wightman, B., I. Ha, et G. Ruvkun. 1993. « Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene Lin-14 by Lin-4 Mediates Temporal Pattern Formation in *C. Elegans* ». *Cell* 75 (5): 855-62. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4).
- Wilbert, Melissa L., Stephanie C. Huelga, Katannya Kapeli, Thomas J. Stark, Tiffany Y. Liang, Stella X. Chen, Bernice Y. Yan, et al. 2012. « LIN28 binds messenger RNAs at GGAGA motifs and regulates splicing factor abundance ». *Molecular cell* 48 (2): 195-206. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.004>.
- Williamson, Mike P. 2013. « Using Chemical Shift Perturbation to Characterise Ligand Binding ». *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 73 (août): 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2013.02.001>.
- Wilson, Ross, et Jennifer A. Doudna. 2013. « Molecular mechanisms of RNA interference ». *Annual review of biophysics* 42: 217-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>.
- Witten, Joshua T., et Jernej Ule. 2011. « Understanding splicing regulation through RNA splicing maps ». *Trends in Genetics* 27 (3-2): 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.12.001>.
- Wu, G. J., C. S. Sinclair, J. Paape, J. N. Ingle, P. C. Roche, C. D. James, et F. J. Couch. 2000. « 17q23 Amplifications in Breast Cancer Involve the PAT1, RAD51C, PS6K, and SIGMA1B Genes ». *Cancer Research* 60 (19): 5371-75.
- Wu, Haoquan, Joel R. Neilson, Priti Kumar, Monika Manocha, Premlata Shankar, Phillip A. Sharp, et N. Manjunath. 2007. « MiRNA Profiling of Naïve, Effector and Memory CD8 T Cells ». *PLoS One* 2 (10): e1020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001020>.
- Wu, Mingxia, Christy W. S. Tong, Wei Yan, Kenneth K. W. To, et William C. S. Cho. 2019. « The RNA Binding Protein HuR: A Promising Drug Target for Anticancer Therapy ». *Current Cancer Drug Targets* 19 (5): 382-99. <https://doi.org/10.2174/1568009618666181031145953>.
- Wu, S., S. Huang, J. Ding, Y. Zhao, L. Liang, T. Liu, R. Zhan, et X. He. 2010. « Multiple MicroRNAs Modulate P21/Cip1/Waf1 Expression by Directly Targeting Its 3' Untranslated Region ». *Oncogene* 29 (15): 2302-8. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.34>.
- Wu, Xiaoqing, Gulhumay Gardashova, Lan Lan, Shuang Han, Cuncong Zhong, Rebecca T. Marquez, Lanjing Wei, et al. 2020. « Targeting the Interaction between RNA-Binding Protein HuR and FOXQ1 Suppresses Breast Cancer Invasion and Metastasis ». *Communications Biology* 3 (1): 193. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0933-1>.
- Wu, Xiaoqing, et Liang Xu. 2022. « The RNA-Binding Protein HuR in Human Cancer: A Friend or Foe? » *Advanced Drug Delivery Reviews* 184 (mai): 114179. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114179>.

- Xu, Fang, Xiaotian Zhang, Yutao Lei, Xinwen Liu, Zhenyun Liu, Tanjun Tong, et Wengong Wang. 2010. « Loss of Repression of HuR Translation by MiR-16 May Be Responsible for the Elevation of HuR in Human Breast Carcinoma ». *Journal of Cellular Biochemistry* 111 (3): 727-34. <https://doi.org/10.1002/jcb.22762>.
- Xu, Nianhua, Chyi-Ying A. Chen, et Ann-Bin Shyu. 2001. « Versatile Role for hnRNP D Isoforms in the Differential Regulation of Cytoplasmic mRNA Turnover ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (20): 6960-71. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.20.6960-6971.2001>.
- Yang, Chuanbin, Shaofei Huang, Xuanbin Wang, et Yong Gu. 2015. « Emerging Roles of CCCH-Type Zinc Finger Proteins in Destabilizing mRNA Encoding Inflammatory Factors and Regulating Immune Responses ». *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 25 (1): 77-89. <https://doi.org/10.1615/critrevukaryotgeneexpr.2015013022>.
- Yang, Chunbo, Magdalini Eleftheriadou, Sophia Kelaini, Thomas Morrison, Marta Vilà González, Rachel Caines, Nicola Edwards, et al. 2020. « Targeting QKI-7 in Vivo Restores Endothelial Cell Function in Diabetes ». *Nature Communications* 11 (1): 3812. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17468-y>.
- Yang, Y., H. Meng, Q. Peng, X. Yang, R. Gan, L. Zhao, Z. Chen, J. Lu, et Q. H. Meng. 2015. « Downregulation of MicroRNA-21 Expression Restrains Non-Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation and Migration through Upregulation of Programmed Cell Death 4 ». *Cancer Gene Therapy* 22 (1): 23-29. <https://doi.org/10.1038/cgt.2014.66>.
- Yi, Jie, Na Chang, Xinwen Liu, Gaier Guo, Lixiang Xue, Tanjun Tong, Myriam Gorospe, et Wengong Wang. 2010. « Reduced nuclear export of HuR mRNA by HuR is linked to the loss of HuR in replicative senescence ». *Nucleic Acids Research* 38 (5): 1547-58. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1114>.
- Yi, Rui, Yi Qin, Ian G. Macara, et Bryan R. Cullen. 2003. « Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs ». *Genes & Development* 17 (24): 3011-16. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>.
- Yoon, Je-Hyun, Kotb Abdelmohsen, Subramanya Srikantan, Rong Guo, Xiaoling Yang, Jennifer L. Martindale, et Myriam Gorospe. 2014. « Tyrosine Phosphorylation of HuR by JAK3 Triggers Dissociation and Degradation of HuR Target MRNAs ». *Nucleic Acids Research* 42 (2): 1196-1208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt903>.
- Young, Lisa E., Ashleigh E. Moore, Lena Sokol, Nicole Meisner-Kober, et Dan A. Dixon. 2012. « The mRNA Stability Factor HuR Inhibits MicroRNA-16 Targeting of Cyclooxygenase-2 ». *Molecular Cancer Research* 10 (1): 167-80. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0337>.
- Yu, Junying, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, et al. 2007. « Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells ». *Science* 318 (5858): 1917-20. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>.
- Zealy, Richard W., Samuel P. Wrenn, Sylvia Davila, Kyung-Won Min, et Je-Hyun Yoon. 2017. « MicroRNA-Binding Proteins: Specificity and Function ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 8 (5): e1414. <https://doi.org/10.1002/wrna.1414>.
- Zhang, Wen Cai, Nicholas Skiados, Fareesa Aftab, Cerena Moreno, Luis Silva, Paul Joshua Anthony Corbilla, John M. Asara, Aaron N. Hata, et Frank J. Slack. 2022. « MicroRNA-21 Guide and Passenger Strand Regulation of Adenylosuccinate Lyase-Mediated Purine Metabolism Promotes Transition to an EGFR-TKI-Tolerant Persister State ». *Cancer Gene Therapy* 29 (12): 1878-94. <https://doi.org/10.1038/s41417-022-00504-y>.
- Zhang, Yiwei, Zhiyuan Wei, Hui Dong, Jian Zhou, Jizhao Yuan, Bing Ni, Yuzhang Wu, Chao Han, et Yi Tian. 2023. « Regulation of mRNA stability by RBPs and noncoding RNAs contributing to the pathogenicity of Th17 cells ». *RNA Biology* 18 (5): 647-56. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1862567>.
- Zhao, Qiuyan, Sumin Chen, Zhonglin Zhu, Lanting Yu, Yingchun Ren, Mingjie Jiang, Junyong Weng, et Baiwen Li. 2018. « MiR-21 Promotes EGF-Induced Pancreatic Cancer Cell Proliferation by Targeting Spry2 ». *Cell Death & Disease* 9 (12): 1157. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1182-9>.

- Zhou, Xianyong, Shao Wang, Miaomiao Zheng, Aarti Kuver, Xiaoyang Wan, Kezhi Dai, et Xi Li. 2019. « Phosphorylation of ELAVL1 (Ser219/Ser316) Mediated by PKC Is Required for Erythropoiesis ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1866 (2): 214-24. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.021>.
- Zhou, Xin, Xiaping Wang, Zebo Huang, Jian Wang, Wei Zhu, Yongqian Shu, et Ping Liu. 2014. « Prognostic Value of miR-21 in Various Cancers: An Updating Meta-Analysis ». *PLoS ONE* 9 (7): e102413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102413>.
- Zhu, Shuomin, Min-Liang Si, Hailong Wu, et Yin-Yuan Mo. 2007. « MicroRNA-21 Targets the Tumor Suppressor Gene Tropomyosin 1 (TPM1) ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (19): 14328-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611393200>.
- Zong, Feng-Yang, Xing Fu, Wen-Juan Wei, Ya-Ge Luo, Monika Heiner, Li-Juan Cao, Zhaoyuan Fang, et al. 2014. « The RNA-Binding Protein QKI Suppresses Cancer-Associated Aberrant Splicing ». *PLoS Genetics* 10 (4): e1004289. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004289>.