

Étude de la fonction du facteur de transcription FOXM1 dans la dégradation des ARN messagers : La fonction de FOXM1 dans la dégradation des ARNm estelle liée à ses fonctions transcriptionnelles ?

Auteur : Gaspart, Arthur

Promoteur(s) : Dequiedt, Franck

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2019-2020

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/9865>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Université de Liège – Faculté des Sciences – Département des Sciences de la vie

Étude de la fonction du facteur de transcription FOXM1 dans la dégradation des ARN messagers : La fonction de FOXM1 dans la dégradation des ARNm est- elle liée à ses fonctions transcriptionnelles ?

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du grade de Master en Biochimie
et Biologie Moléculaire et Cellulaire à finalité approfondie

GIGA – Molecular Biology and Diseases

Laboratoire d'Expression des Gènes et Cancer

Promoteur

Professeur Franck DEQUIEDT

Superviseur

Emeline MARIABELLE

Arthur Gaspart, Master 2 BBMC

Année académique 2019-2020

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon promoteur, le Prof. Franck Dequiedt de m'avoir permis de réaliser mon mémoire au sein de son laboratoire ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordé et sa sympathie. Je le remercie également pour sa réactivité pour adapter ce mémoire par rapport à la situation que nous vivons au cours de cette année 2020.

Ensuite, je voudrais également remercier chaleureusement mon encadrante Emeline Mariavelle pour m'avoir encadré tout au long de ce mémoire et sans qui rien n'aurait été possible. Je la remercie pour sa patience, ses bons conseils, ses réponses à mes questions et surtout pour le temps qu'elle a consacré au bon déroulement et à la relecture de ce mémoire et ce, malgré les circonstances exceptionnelles dont le virus SARS-CoV-2 est à l'origine.

Je remercie également l'entièreté du laboratoire d'Expression des Gènes et Cancer pour leur disponibilité ainsi que pour leur accueil, leur bonne humeur et l'ambiance qui règnent, tout en remerciant les membres du laboratoire de Virologie et Immunologie ainsi que celui d'Immunométabolisme et Nutrition, qui contribuent également à cette ambiance chaleureuse.

Enfin, je tenais également à remercier énormément ma famille pour leur présence et leur soutien sans faille depuis le début de mes études, et plus spécialement lors de ce mémoire. J'aimerais aussi adresser un grand remerciement à tous mes amis pour avoir été présents, avec une mention spéciale pour mon colocataire et meilleur ami Florian Rousselle, pour Arnaud Dossogne ainsi que pour les membres du groupe « Survivors² » qui se reconnaîtront.

Résumé

Le contrôle de l'expression des gènes est essentiel à tous les organismes vivants et regroupe un ensemble de processus biochimiques hautement régulés permettant de s'assurer de l'expression correcte des différents gènes. Cette régulation et les différents mécanismes mis en jeu se présentent sous la forme d'un réseau complexe d'interactions, où les différentes machineries sont interconnectées entre elles. Ainsi, les facteurs de transcription, généralement associés à la transcription des gènes et donc à la production d'ARN messagers au sein des cellules, ont récemment montré de nouveaux rôles au niveau de processus post-transcriptionnels. En effet, au sein du laboratoire de *Gene Expression & Cancer*, il a été mis en évidence que le facteur de transcription ERG intervient dans la régulation post-transcriptionnelle en participant à la régulation de la stabilité des ARNm. Ce facteur de transcription, recruté sur les ARNm par la protéine de liaison à l'ARN RBPMS, peut déclencher leur dégradation en recrutant le complexe de déadénylation CCR4-NOT. Dès lors, l'hypothèse que d'autres facteurs de transcription soient impliqués dans ce processus a été émise. Le projet de thèse dans lequel ce mémoire s'implante est dans la continuité de ce travail sur le facteur de transcription ERG. Au sein du laboratoire, des résultats préliminaires suggèrent que FOXM1, un facteur de transcription impliqué dans de nombreux cancers chez l'Homme, intervient dans la régulation de la stabilité des ARNm. Au vu du rôle de celui-ci dans la transcription des gènes et dans la dégradation des ARNm, une question a émergé : « La fonction de FOXM1 dans la dégradation des ARNm est-elle liée à ses fonctions transcriptionnelles ? ».

L'objectif principal de ce mémoire est de discuter cette question. Cette discussion s'est basée sur des données préalablement collectées ainsi que sur la proposition d'expériences à réaliser afin de tenter d'apporter une réponse à cette question. L'analyse des données collectées préalablement lors d'un ChIP-Seq, réalisé par une autre équipe, et d'un RNA-Seq, a montré qu'environ 10 % des 466 gènes considérés comme cibles de FOXM1 dans la dégradation des ARNm sont également considérés comme des cibles transcriptionnelles de FOXM1, ce qui suggère une indépendance du rôle de FOXM1 dans le processus de dégradation des ARNm par rapport à son rôle dans la transcription des gènes. Cependant, cette première conclusion se doit d'être confirmée par la réalisation d'autres expériences mettant en jeu un mutant de FOXM1c au niveau de son domaine de liaison à l'ADN et qui est incapable de lier l'ADN. Pour ce faire, la séquence encodant ce triple mutant a été clonée au sein des plasmides pdest1899 et pN-MS2-CP. De plus, ces expériences (*MS2-tethering degradation assay*, *oligo(dT) pulldown* et co-immunoprécipitation avec la protéine de liaison à l'ARN STAU1) permettront de déterminer si le recrutement de ce triple mutant sur l'ARNm dépend ou non de sa liaison au préalable de FOXM1 sur l'ADN. Ainsi, si le rôle de FOXM1 dans la dégradation des ARNm ne requiert pas son rôle dans la transcription ainsi que sa liaison préalable à l'ADN, on s'orienterait vers un modèle où ces deux fonctions de FOXM1 sont indépendantes l'une de l'autre.

Table des matières

Liste des abréviations.....	i
I. Introduction.....	1
I.1 Contexte général.....	1
I.2 Contrôle de l'expression des gènes chez les eucaryotes.....	1
I.3 La dégradation des ARN messagers.....	6
I.3.1 La stabilité des ARNm.....	7
I.3.2 Les mécanismes de dégradation des ARNm.....	8
I.3.2.1 Voies dépendantes de la déadénylation.....	8
I.3.2.2 Voies indépendantes de la déadénylation.....	10
I.3.2.3 Mécanismes de contrôle qualité des ARNm.....	11
I.3.2.4 Staufen-mediated mRNA decay (SMD).....	12
I.4 Les rôles post-transcriptionnels des facteurs de transcription : la dégradation des ARNm. 13	13
I.5 Les Forkhead box Proteins.....	14
I.6 Le facteur de transcription FOXM1.....	14
I.6.1 Rôles de FOXM1 et cancer.....	16
I.6.2 Cibles de FOXM1.....	17
I.6.3 Régulation de FOXM1.....	18
I.6.3.1 FOXM1 et le cycle cellulaire.....	18
I.7 Contexte du travail et objectifs.....	21
II. Matériels & Méthodes.....	22
II.1 Matériel cellulaire et milieu de culture.....	22
II.2 Plasmides.....	22
II.3 Clonage.....	23
II.3.1 Clonage Gateway.....	23
II.3.2 Clonage en pN-MS2-CP.....	25
II.3.3 Transformation bactérienne.....	27
II.3.4 Stock de glycérol.....	27
II.3.5 Extraction de plasmides.....	28
II.3.6 Vérification de la construction.....	29
II.4 Culture cellulaire.....	30
II.5 Transfection au phosphate calcique.....	30

II.6 Co-immunoprécipitation.....	31
II.7 Western Blot.....	32
II.8 RNA-Seq et CHIP-Seq.....	33
II.9 Bioinformatique.....	34
III. Résultats & Discussion.....	35
III.1 FOXM1 dans la dégradation des ARNm.....	35
III.2 CHIP-Seq et RNA-Seq.....	36
III.3 FOXM1c DBD MT : Clonage et expériences.....	38
III.3.1 Clonage Gateway.....	39
III.3.2 Co-immunoprécipitation.....	40
III.3.3 Clonage en pN-MS2-CP.....	41
III.3.4 Perspectives d'expériences.....	42
III.4 Discussion de la question : Conclusion.....	45
III.5 Proposition d'un modèle.....	46
III.6 Perspectives.....	47
IV. Bibliographie.....	I
V. Annexes.....	XI

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARE	AU-rich element
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	Albumine de sérum bovin
CCR4-NOT	complexe de déadénylation CCR4-NOT
cm	centimètre
cm ²	centimètre carré
CMV	Cytomégalovirus
co-IP	co-immunoprécipitation
CTD	C-terminal domain
CyclinX-CDK γ	Complexe Cyclin X CDK γ
DBD	DNA-binding domain
DCP1/2	mRNA-decapping protein 1/2
DCPS	decapping scavenger (enzyme)
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
EJC	Exon junction complex
FKH	domaine Forkhead box
FOX	protéine Forkhead Box
FOXM1 WT	Forme sauvage de FOXM1c (non mutée)
FOXM1 Δ DBD	FOXM1c dépourvu de son DBD
FOXM1c DBD MT	Mutant de FOXM1c au niveau de son DBD
GC	glucocorticoïde
GMD	GR-mediated mRNA decay
GR	récepteur des glucocorticoïde
h	heure
HBS	HEPES Buffer Saline
HEK293	Human embryonic kidney 293 cells
HRP	Horseradish Peroxidase - Peroxydase de raifort
IP	Immunoprécipitation
IPLS	ImmunoPrecipitation Low Salt

IPMS	ImmunoPrecipitation Medium Salt
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
kV	kilovolt
LB	Lysogeny broth
Lsm1-7	Sm-like protein 1-7
mA	milliampère
miRNA	microARN
mL	millilitres
mm	millimètre
mRNP	complexe ribonucléoprotéique messenger
MS2-CP	MS2 coat protein
NF	nuclease-free
ng	nanogramme
NGD	no-go decay
NGS	Next Generation Sequencing
NMD	Nonsense-mediated decay
NRD	N-terminal domain
NSD	non-stop decay
PAN2-PAN3	complexe de déadénylation PAN (polyA-nuclease)
PABP	poly-adenylated binding protein
PAP	polyA polymerase
PARN	polyA specific ribonuclease
pb	paire de bases nucléotidiques
P-bodies	Processing bodies
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentiel hydrogène
poly-A	polyadénylé
pré-ARNm	Acide ribonucléique pré-messager
PTC	premature termination codon
PTM	modification post-traductionnelle
RBP	RNA-binding protein – Protéine de liaison à l'ARN
RF	Rnase free

R-Luc-0MS2	ARNm de la Renilla luciferase avec 0 sites de liaisons de la protéine MS2-CP
R-Luc-8MS2	ARNm de la Renilla luciferase avec 8 sites de liaisons de la protéine MS2-CP
rpm	rotation par minute
RB	protéine du rétinoblastome
RT	room temperature – température ambiante
s	seconde
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SMD	Staufen-mediated mRNA decay
SMG1	Serine/threonine-protein kinase SMG1
STAU1/2	double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1/2
TAD	domaine de transactivation
TBS-T	Tris-Buffered Saline – Tween
TREX	Transcription Export Complex
TSS	Transcription Starting Site
TTS	Transcription Termination Site
UPF1-2	Regulator of nonsense transcripts1-2
UTR	Untranslated region
V	volt
v/v	rapport en volume par volume
w/v	rapport en poids par volume
WT	wild type (= forme sauvage, non mutée)
XRN1/2	5' → 3' exoribonuclease 1/2
µg	microgramme
µL	microlitres
µM	micromolaire
µm	micromètre
°C	degré Celsius

I. Introduction

I. Introduction

I.1 Contexte général

Le contrôle de l'expression des gènes est essentiel à tous les organismes vivants. Cela regroupe un ensemble de processus biochimiques hautement régulés intervenant à divers niveaux au sein de la cellule, permettant de contrôler le niveau de production d'ARN ou de protéines spécifiques et s'assurant ainsi de l'expression correcte de chaque gène. Le modèle actuellement accepté s'oriente plutôt vers une expression des gènes et sa régulation se présentant sous la forme d'un réseau complexe d'interactions, où les différentes machineries qui rentrent en jeu sont interconnectées entre elles (Maniatis & Reed, 2002). Les facteurs de transcription sont des molécules indispensables dans la régulation de l'expression génique. En effet, ils régulent la transcription des gènes et donc la production des ARNm correspondants au sein de la cellule (dans le cadre de gènes encodant des protéines). Récemment, diverses équipes de recherche ont montré que ces facteurs de transcription possèdent d'autres rôles dans le contrôle de l'expression des gènes, au niveau de processus post-transcriptionnels, comme par exemple l'épissage des pré-ARNm (Rambout *et al.*, 2018) ou la dégradation des ARNm (Cho *et al.*, 2015; Moon *et al.*, 2018; Rambout *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016). Au sein du laboratoire de *Gene Expression & Cancer* dont les recherches se portent sur les mécanismes moléculaires de la régulation de l'expression des gènes dans les cellules de mammifères, l'équipe du Professeur Franck Dequiedt étudie les fonctions de ces facteurs de transcriptions dans les processus post-transcriptionnels incluant l'épissage, la stabilité ou encore la traduction des ARNm. Le laboratoire s'intéresse à ces fonctions dans d'importants contextes développementaux mais également dans des contextes pathologiques comme le cancer. C'est dans ce cadre-là que s'inscrit ce mémoire : il s'imbrique dans le travail concernant l'étude de la fonction du facteur de transcription FOXM1 dans la dégradation des ARN messagers.

I.2 Contrôle de l'expression des gènes chez les eucaryotes

Un gène est une séquence d'ADN définissant la séquence d'un produit indépendant qui est soit polypeptidique soit ribonucléique. En d'autres termes, un gène contient l'information héréditaire permettant la synthèse d'un ARN (exemples : les ARN ribosomiques, les ARN de transfert, etc) ou d'un ARNm lui-même utilisé pour la synthèse d'une protéine jouant un rôle dans le fonctionnement de la cellule, de l'organisme. Ces gènes sont caractérisés par leur séquence en bases azotées mais aussi par leur position au niveau des chromosomes. En effet, chaque gène d'un organisme est localisé au niveau d'une position sur les chromosomes qui lui est spécifique, appelée locus chromosomique. L'expression de ces gènes est un

processus essentiel à la vie cellulaire car elle permet la production de protéines et d'ARN indispensables pour le fonctionnement de la cellule. Elle regroupe un ensemble de processus biochimiques permettant d'utiliser l'information stockée au niveau des gènes en vue de produire ces molécules. Sa régulation est nécessaire pour que ce processus d'expression génique soit contrôlé, qualitativement et quantitativement, afin d'éviter tout dérèglement pouvant entraîner de lourdes conséquences et/ou mener à diverses pathologies. Bien que les cellules d'un organisme pluricellulaire disposent du même génome, l'expression des gènes varie en fonction du type cellulaire et des stimuli qu'elles reçoivent. Ceci est à la base de l'identité tissulaire des cellules, où celles-ci sont dites différenciées. La régulation de cette expression va également permettre d'adapter le niveau d'expression des produits de ces gènes au sein des cellules, en l'augmentant ou en le diminuant, en fonction des conditions dans lesquelles elles se trouvent, ou en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouvent les cellules. Cependant, certains gènes ne sont pas ou peu régulés car leur expression fournit des produits qui sont nécessaires au maintien des fonctions cellulaires de base et utilisés de manière constante au sein des cellules. Ces gènes, qui sont exprimés de façon constitutive dans toutes les cellules, sont appelés *housekeeping genes* ou *constitutive genes* (Rubie *et al.*, 2005).

Dans le cadre de ce mémoire, nous allons nous concentrer sur l'expression des gènes encodant des protéines chez les eucaryotes. Les différentes étapes de l'expression des gènes et leur régulation ont d'abord donné naissance à un modèle séquentiel, où celles-ci sont indépendantes les unes des autres et se succèdent dans le temps (Figure 1.1). Cependant, ce modèle n'est plus accepté de nos jours mais reste néanmoins utile pour expliquer les différentes étapes. Le modèle qui prévaut actuellement s'oriente plutôt vers une expression des gènes et son contrôle qui se présentent sous la forme d'un réseau complexe d'interactions, où les différentes machineries qui rentrent en jeu sont interconnectées entre elles (Figure 1.2) (Maniatis & Reed, 2002). L'expression des gènes codant des protéines chez les eucaryotes est donc un processus complexe composé de différentes étapes qui ont lieu dans deux compartiments cellulaires différents : le noyau et le cytoplasme. Tout d'abord, au sein du noyau, la transcription des gènes va aboutir à la formation d'un ARN pré-messager (pré-ARNm), c'est-à-dire un ARN messager immature. La seconde étape consiste en la maturation de ce pré-ARNm en un ARNm mature : cette étape comprend l'épissage, c'est-à-dire l'élimination des introns et la conservation des exons (contenant les portions codantes ainsi que les régions 5' UTR et 3' UTR), l'ajout d'une coiffe et d'une queue poly-adenylée. L'ARNm mature peut dès lors être exporté via les pores nucléaires, du noyau vers le cytoplasme où il pourra être traduit en protéine par les ribosomes. L'ARNm pourra finalement être dégradé par les machineries de dégradation (Figure 1.1).

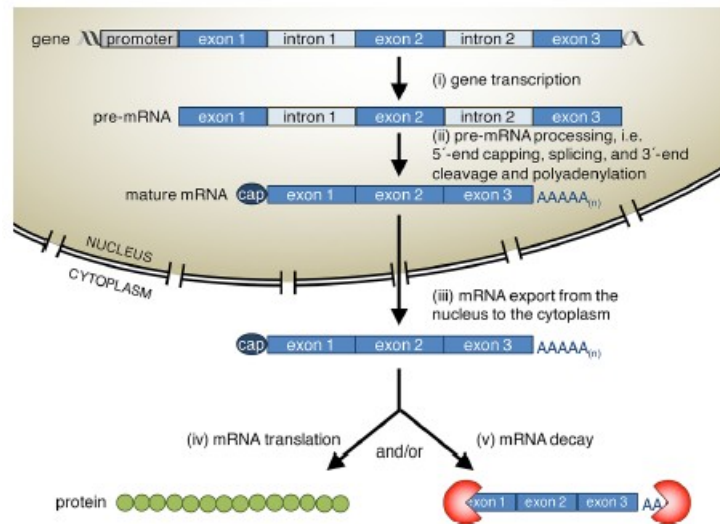


Figure 1.1. Étapes de l'expression des gènes codant pour des protéines chez les eucaryotes (Rambout *et al.*, 2018a)

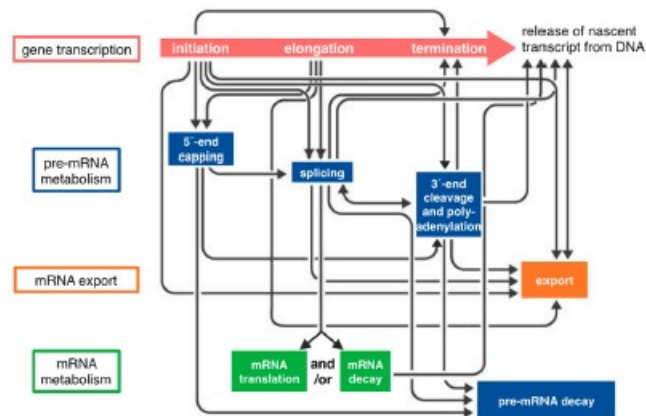


Figure 1.2. Couplage des machineries intervenant au niveau de l'expression des gènes codant les protéines chez les eucaryotes. Exemple de la manière dont les machineries d'expression (encadrés colorés) sont connectés physiquement et/ou fonctionnellement (flèches) (Rambout *et al.*, 2018a). Les étapes principales de l'expression des gènes sont encadrés et sur la gauche.

On considère qu'il y a 6 niveaux où la cellule peut intervenir pour modifier le niveau d'une protéine chez les eucaryotes :

1. l'accessibilité de l'ADN
2. la régulation de la transcription
3. les processus de maturation du transcrit
4. l'export du transcrit vers le cytoplasme
5. la traduction et dégradation des protéines
6. la dégradation des transcrits

Pour pouvoir transcrire un fragment d'ADN en ARN, il faut pouvoir y avoir accès. En effet, il faut que la machinerie de transcription ait accès aux séquences à transcrire et aux séquences régulatrices pour pouvoir s'y lier et initier la transcription. Chez les eucaryotes, l'ADN est organisé sous forme de chromatine, une structure non homogène qui se présente sous deux formes : l'hétérochromatine et l'euchromatine. Cette dernière possède une structure décondensée, permettant ainsi l'expression des gènes qui s'y trouvent. Afin de moduler le niveau d'expression d'un gène, la cellule peut donc contrôler la structure de la chromatine de la région d'ADN contenant celui-ci et ainsi contrôler son accessibilité (Németh & Längst, 2004). Les modifications des histones, comme l'acétylation ou la méthylation, peuvent jouer sur la structure de la chromatine et son degré de compaction au niveau d'une région proche du promoteur d'un gène, ce qui a pour effet de moduler l'expression de ce gène (Karlič *et al.*, 2010). Ces modifications constituent le code des histones et sont réalisées par diverses enzymes qui peuvent être recrutées au niveau de l'ADN et des promoteurs, notamment via les facteurs de transcription, entraînant ainsi la (dé)condensation de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes (Berger, 2002). Des méthylations de l'ADN peuvent également intervenir dans l'expression des gènes en influençant le degré de compaction de la chromatine. Elles interviennent au niveau des dinucléotides CpG, où la cytosine est méthylée. Au sein de cellules non-embryonnaire, environ 80 % de ces sites CpG sont méthylés. Cependant, au niveau de certaines régions dont la concentration de ce dinucléotide bien plus importante, ces sites CpG ne sont généralement pas méthylés. Ces régions, appelées îlots CpG, sont associés, pour la plupart, avec des gènes et interviennent dans la régulation de l'expression génique. En effet, en étant méthylé, ces îlots CpG peuvent inhiber la transcription en interagissant avec des répresseurs qui peuvent interagir à leur tour avec des enzymes modifiant les histones, entraînant la compaction de la chromatine (Jaenisch & Bird, 2003).

La transcription est le processus biochimiques durant lequel une molécule d'ARN est synthétisée à partir d'une séquence d'ADN utilisée comme modèle. Cette synthèse est réalisée par des enzymes, nommées ARN polymérase. Chez les eucaryotes, la majeure partie du génome, incluant tous les gènes codants des protéines, est transcrite par l'ARN polymérase II (Eick & Geyer, 2013). Elle permet la formation d'ARN pré-messenger, qui après différentes étapes de maturation, sera exporté vers le cytoplasme et traduit en protéine. La transcription se déroule en trois grandes étapes successives : l'initiation, l'élongation et la

terminaison. L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II nécessite la liaison de l'ARN polymérase et de facteurs basaux de transcription (Plaschka *et al.*, 2016) au niveau de la région promotrice cœur qui constitue le minimum requis pour l'assemblage du complexe d'initiation. La polymérase sera phosphorylée au niveau de son domaine CTD pour enclencher l'initiation de la transcription (Eick & Geyer, 2013). D'autres facteurs de transcription spécifiques peuvent intervenir au niveau de la transcription mais ne font pas partie de cette machinerie basale de la transcription. Ils sont capables de reconnaître une région d'ADN spécifique au niveau du promoteur d'un gène et d'engager des interactions avec la machinerie basale de transcription, ce qui a pour effet de favoriser ou réduire les événements d'initiation de la transcription selon qu'ils soient activateurs ou répresseurs. Pour ce faire, ces facteurs de transcription comportent au minimum ces deux domaines fonctionnels : un domaine de liaison spécifique à l'ADN et un domaine activateur/répresseur. D'autres facteurs de transcription peuvent reconnaître des séquences appelées *enhancer* ou *silencer*. Ces séquences ne sont pas indispensables à la transcription mais peuvent avoir un effet positif (*enhancer*) ou négatif (*silencer*). Les facteurs de transcription qui s'y lient peuvent interagir avec la machinerie basale de la transcription ou alors provoquer un changement local de la structure chromatinienne. Ces séquences sont spécifiques d'un gène malgré le fait qu'elles peuvent se trouver loin de celui-ci. Après l'initiation, il faut libérer la région promotrice afin de permettre l'étape d'élongation de se dérouler. L'ARN polymérase sera phosphorylée une nouvelle fois au niveau de son domaine CTD, ce qui l'active et enclenche l'étape d'élongation (Eick & Geyer, 2013). La terminaison de la transcription par l'ARN polymérase II, quant à elle, reste encore floue. Un premier modèle propose que le signal de polyadénylation, une fois transcrit, pourrait engendrer un changement conformationnel au niveau de la polymérase elle-même ou un échange de ses facteurs associés, favorisant la terminaison de la transcription (Eaton & West, 2018). Un second modèle propose quant à lui qu'au moment de la transcription du signal de polyadénylation, un clivage endonucléolytique au niveau de l'ARN est réalisé. Ce signal de polyadénylation est défini par des éléments de séquence en cis (*U-rich region*, *AAUAAA hexamer* en aval du site de clivage et *G/U-rich region* en amont de ce site de clivage)(Davis & Shi, 2014; Tian & Graber, 2012). L'extrémité 3'OH générée est utilisée pour la synthèse de la queue poly-A par la PAP (poly-A polymerase)(Davis & Shi, 2014). L'extrémité 5' générée, quant à elle, serait alors reconnue par une 5'-3' exonucléase, XRN2, qui rognerait cette extrémité 5'. Elle rattraperait l'ARN polymérase II, la déstabiliserait et engendrerait sa dissociation (Eaton & West, 2018; West *et al.*, 2004).

L'ARN pré-messager formé au cours de la transcription va pouvoir subir une série de modifications, appelées modifications post-transcriptionnelles, bien que certaines puissent se produire de façon co-transcriptionnelle. Elles constituent le processus de maturation du transcrit. Elle se déroule en trois étapes,

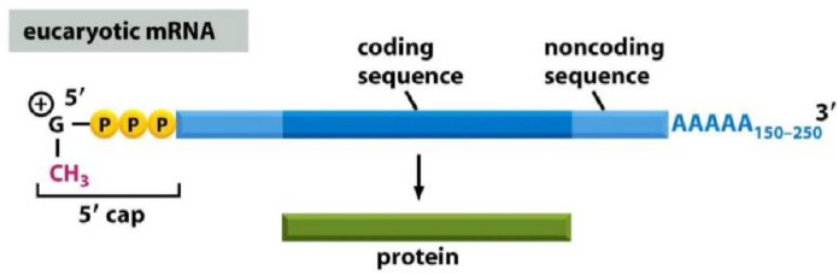


Figure 1.3. Structure de l'ARNm mature. L'ARNm mature est coiffé au niveau de son extrémité 5' et polyadénylé à son extrémité 3'. Il possède une phase codante, qui sera traduite en protéine, entourée des régions non traduites 5' UTR et 3'UTR (Prof. Franck Dequiedt, 2017).

simultanément à la synthèse du pré-ARNm par l'ARN polymérase II (Bentley, 2014). Tout d'abord, une coiffe protectrice N7-méthylguanosine est ajoutée à l'extrémité 5' du transcrit simultanément à la transcription lorsque celui-ci atteint une taille d'environ 20 à 30 nucléotides (Moteki & Price, 2002; Shatkin & Manley, 2000). Cette modification consiste en l'ajout d'une guanine au niveau de l'extrémité 5', par la guanylyltransférase, qui sera ensuite méthylée par la guanine-N7 méthyltransférase. Ensuite, le transcrit va subir une étape d'épissage qui consiste à éliminer les introns et rabouter les exons entre eux en vue de l'obtention d'un message continu. Cette étape est réalisée par un complexe, le spliceosome, qui reconnaît les introns présents sur l'ARN pré-messager en cours de synthèse et permet leur excision selon la règle GU-AG (la majorité des introns commencent par GU et finissent par AG) (Herzel *et al.*, 2017). Un épissage alternatif du pré-ARNm peut avoir lieu, permettant ainsi la production de différents ARNm, et donc la production de protéines différentes à partir du même gène. Par conséquent, l'épissage alternatif participe donc à la régulation de l'expression des gènes. Enfin, une queue poly-adenylée est ajoutée à l'extrémité 3' de l'ARN en formation. Cette queue poly-A est recouverte par des PABP (*poly-adenylated binding protein*), ce qui permet sa stabilisation (Matthias *et al.*, 1994).

L'ARNm mature est donc coiffé en 5' et poly-adenylé en 3'. Il possède une phase codante qui sera traduite en une séquence d'acide aminé lors de la traduction et des régions non codantes en amont et en aval de cette région codante, respectivement la région 5'UTR et 3'UTR (Figure 1.3). Il est associé avec de nombreuses protéines, formant un complexe ribonucléoprotéique, le mRNP. Ce dernier est exporté du noyau vers le cytoplasme via les pores nucléaires. Cette étape de maturation est nécessaire pour que les dernières étapes de l'expression des gènes aient lieu, en intervenant notamment au niveau de :

- l'export du transcrit vers le cytoplasme :

D'une manière dépendante de l'épissage, des complexes protéiques EJC (*exon junction complex*) sont recrutés sur l'ARN plus précisément au niveau de sites sans séquences spécifiques, situés entre 20 et 24 nucléotides en amont des jonctions exon-exon. Ces EJC peuvent recruter des facteurs d'export faisant partie du complexe TREX (*Transcription Export complex*) qui vont permettre la translocation du mRNP à travers le pore nucléaire (Boehm & Gehring, 2016). Ce lien avec l'épissage de l'ARNm permettrait de cibler co-transcriptionnellement les facteurs d'export au niveau des exons (Reed, 2003). Le recrutement du complexe pourrait se faire également de manière indépendante de l'épissage pour les ARN sans introns. En effet, la coiffe a montré un rôle dans l'export de l'ARNm mature en permettant le recrutement de ces facteurs d'export au niveau de l'ARNm (Nojima *et al.*, 2007).

- la stabilité du transcrit (voir point I.3.1)

- la traduction du transcrit en protéines :

La traduction est le processus permettant la synthèse de protéines à partir du message génétique de l'ARNm. Cette synthèse est réalisée par les ribosomes, où les différents acteurs moléculaires qui rentrent en jeu se retrouvent et engagent des interactions, et se déroule en 3 étapes successives : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Les protéines qui sont mal repliées, dénaturées ou vieillissantes sont dégradées à l'aide d'un complexe protéique, le protéasome (Peters, 1994). Les protéines à dégrader sont marquées par polyubiquitination via des complexes spécifiques et sont alors reconnues par le protéasome. Les événements d'initiation de la traduction seraient favorisés par la conformation circulaire (voir point I.3.1, Figure 1.4) que les ARNm adoptent, notamment en augmentant la capacité des facteurs d'initiation de la traduction à initier ce processus. De plus, la petite sous-unité ribosomique aurait plus d'affinité pour cette forme circulaire et l'activité des autres facteurs d'initiation de la traduction serait stimulée (Wells *et al.*, 1998). Cette circularisation pourrait être un mécanisme favorisant la reconnaissance des ARNm intacts et correctement maturés par la machinerie de traduction et donc de restreindre les événements de traduction à ceux-ci. Elle permettrait aussi de faciliter le recyclage des ribosomes et des facteurs impliqués dans ce processus de traduction (Costello *et al.*, 2015; Wells *et al.*, 1998).

I.3 La dégradation des ARN messagers

L'abondance de chaque ARNm au sein d'une cellule est la résultante de la vitesse avec laquelle ils sont produits et la vitesse avec laquelle ils sont dégradés (Balagopal *et al.*, 2012). Ce niveau d'ARNm est généralement en corrélation avec un niveau de protéines produites. Ainsi, le niveau de protéines généré à partir d'un ARNm dépend non seulement du rythme auquel se déroule la traduction et la dégradation de celles-ci mais également de la vitesse à laquelle se déroule la transcription et la dégradation des ARNm (Schoenberg & Maquat, 2012). En effet, il a été montré que la variation du niveau de protéines est expliquée à environ 40 % par les changements du niveau de l'ARNm (Schwanhüusser *et al.*, 2011). Bien qu'ayant une contribution majoritaire, le changement de la vitesse de la transcription n'explique pas à lui seul la variation du taux d'ARNm : la dégradation de l'ARNm va également participer à la modulation de la quantité d'ARNm afin de contrôler le niveau d'expression des gènes (Schwanhüusser *et al.*, 2011). Cependant, ce processus de dégradation de l'ARNm n'en reste pas moins important que la transcription dans la régulation de l'expression des gènes. Par exemple, au sein des lymphocytes T, en réponse à un stimulus externe, il a pu être déterminé qu'environ 50 % des gènes montrent des changements au niveau de l'abondance de leurs ARNm sans montrer de variation au niveau de la vitesse de leur transcription. Cela montre que la régulation de la stabilité des ARNm peut contribuer significativement aux changements observés dans l'expression des gènes, à la suite de stimuli externes (Cheadle *et al.*, 2005).

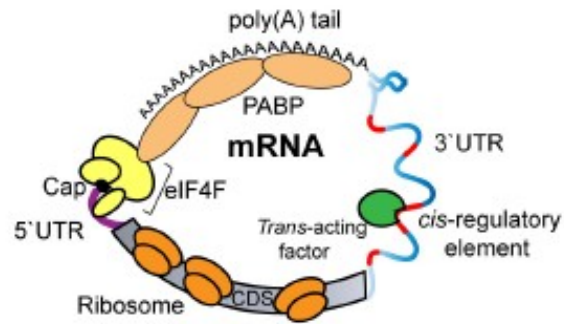


Figure 1.4. Circularisation de l'ARNm via l'interaction de la coiffe avec la queue poly-adénylée par l'intermédiaire des facteurs d'initiation de la traduction et des protéines PABP. Des éléments de régulation en cis sont retrouvés majoritairement au niveau de la région 3' non codante (3' UTR) et être reconnus par des facteurs trans, pouvant notamment influencer la stabilité du transcrit (Mayya & Duchaine, 2019).

La dégradation des ARNm est donc une étape essentielle intervenant dans le contrôle de l'expression génique en participant à la modulation du niveau de transcrite au sein des cellules. Elle fait intervenir différents mécanismes classés en deux catégories (Schoenberg & Maquat, 2012) :

- Des mécanismes qui influencent le temps de demi-vie de l'ARNm dans le but de changer l'abondance de la protéine fonctionnelle correspondante ;
- Des mécanismes de contrôle de la qualité de l'ARNm qui va permettre l'élimination des ARNm qui posent problème et/ou qui sont susceptibles de produire des protéines aberrantes voire toxiques.

Ces divers mécanismes font intervenir 5 activités enzymatiques différentes : décoiffage, activité 5'-3' exonucléasique, activité 3'-5' exonucléasique, déadénylation (activité 3'-5' exonucléasique concentrée sur la queue poly-adénylée) et activité endonucléasique. La combinaison de ces diverses activités contribue aux différents mécanismes de dégradation (Schoenberg & Maquat, 2012).

1.3.1 La stabilité des ARNm

Au niveau de l'ARNm, on retrouve divers éléments qui peuvent influencer sa stabilité, et donc, par extension, sa dégradation.

Tout d'abord, les structures ajoutées aux extrémités des ARNm lors de leur maturation, à savoir la coiffe N7-méthylguanosine en 5' et la queue poly-adénylée en 3', assurent la stabilité des ceux-ci au sein du cytoplasme. Effectivement, la coiffe permet de protéger l'extrémité 5' des exoribonucléases (Furuichi *et al.*, 1977) tandis que la queue poly-A est stabilisée via son interaction avec les PABP et qui, ensemble, assurent la protection de l'extrémité 3' des attaques par les exoribonucléases (Bernstein & Ross, 1989). De plus, ces deux structures interagissent ensemble par l'intermédiaire du complexe d'initiation de la traduction eIF4F, interagissant avec les PABP. Cela permet à l'ARNm d'adopter une conformation circulaire, ce qui accroît sa stabilité (Figure 1.4) (Costello *et al.*, 2015; Wells *et al.*, 1998). Par conséquent, si la dégradation n'implique pas d'événement endonucléolytique, la déstabilisation d'au moins une des deux structures est nécessaire pour initier la dégradation des ARNm (Garneau *et al.*, 2007). Ensuite, en amont de la queue poly-adénylée, on retrouve une région 3' non traduite (3' UTR) qui intervient dans de nombreux mécanismes régulateurs, influençant notamment la stabilité du transcrite. En effet, cette région contient des éléments de régulation en cis qui peuvent être reconnus par des facteurs trans (Figure 1.4) (Mayya & Duchaine, 2019). Cela provoque, par conséquent, un changement de la composition du mRNP, ce qui, dans le cadre de la stabilité du transcrite, peut inhiber ou faciliter sa dégradation (Garneau *et al.*, 2007). D'une part, les miRNA, de petits ARN non codants, peuvent réguler l'expression des gènes en s'appariant au niveau de cette région 3' UTR des transcrits. Ils inhibent alors la traduction des ARNm sur lesquels ils se lient mais interviennent également au niveau de la régulation de la stabilité de ces transcrits, notamment en recrutant la machinerie

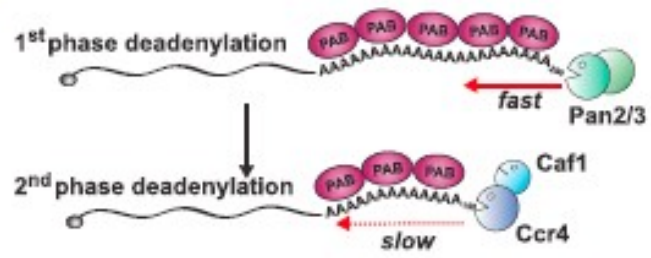


Figure 1.5. Déadénylation biphasique. Elle commence par l'action du complexe PAN2-PAN3 suivi par l'action du complexe CCR4-NOT, représenté par ses deux sous-unités déadénylases (Bresson & Tollervey, 2018).

de dégradation (voie de dégradation *miRNA-mediated mRNA decay*) (Fabian *et al.*, 2010; Garneau *et al.*, 2007). D'autre part, des *RNA-binding proteins* (RBP) peuvent reconnaître des séquences au niveau de l'ARNm et impacter la stabilité du transcrit, en recrutant notamment la machinerie de dégradation. Par exemple, les séquences ARE (*AU-rich elements*) sont des séquences bien connues, composées de 50 à 150 nucléotides, riches en adénine et uracile et situées dans la région 3' UTR de nombreux transcrits (Barreau *et al.*, 2005; Chen & Shyu, 1995). Des RBP peuvent reconnaître ces séquences, s'y lier et promouvoir, dans la majorité des cas, la dégradation des ARNm en interagissant directement ou indirectement avec les machinerie de dégradation (J. R. Anderson *et al.*, 2006; Barreau *et al.*, 2005; Barrett *et al.*, 2012; Garneau *et al.*, 2007).

1.3.2 Les mécanismes de dégradation des ARNm

1.3.2.1 Voies dépendantes de la déadénylation

La majorité des ARNm sont dégradés via un mécanisme initié par la déadénylation, consistant en un raccourcissement de la queue poly-A. Ce processus se déroule en 2 phases successives, distinguables via la vitesse à laquelle l'ARNm est déadénylé et faisant intervenir deux complexes protéiques différents (Figure 1.5) (Wahle & Winkler, 2013; Yamashita *et al.*, 2005).

Dans un premier temps, le complexe PAN2-PAN3 initie la déadénylation jusqu'à ce que la queue poly-A ait atteint une taille d'environ 110 nucléotides pour ensuite laisser place au complexe CCR4-NOT pour la seconde phase (Yamashita *et al.*, 2005). Le premier complexe est composé des deux sous-unités PAN2 et PAN3. Ce complexe présente une activité de déadénylation grâce à la sous-unité PAN2 disposant d'une activité 3' - 5' exonucléasique (Wahle & Winkler, 2013). Le complexe CCR4-NOT, quant à lui, est un complexe protéique conservé chez tous les eucaryotes, de la levure jusqu'à l'homme. Il s'agit d'un important régulateur de l'expression des gènes en contribuant à la régulation des diverses étapes, de la production de l'ARNm jusqu'à sa dégradation dans le cytoplasme (Collart, 2016). Il intervient dans le processus de dégradation de l'ARNm via l'action de ses deux sous-unités déadénylases : Ccr4p et Caf1p chez la levure (Wahle & Winkler, 2013). Chez les mammifères, il y a deux paralogues pour chacune de ces deux sous-unités déadénylases, respectivement CNOT6/CNOT6L et CNOT7/CNOT8, ce qui permet la présence de plusieurs versions de ce complexe au sein des cellules (Miller *et al.*, 2012). Ces deux complexes de déadénylation, PAN2-PAN3 et CCR4-NOT, sont considérés comme les complexes majeurs de déadénylation impliqués dans le turnover des ARNm chez les eucaryotes mais il en existe d'autres, comme le complexe PARN (*poly(A)-specific ribonuclease*) dont l'activité dépend notamment de la présence de la coiffe (M. Gao *et al.*, 2000; Virtanen *et al.*, 2013) et que l'on peut retrouver chez beaucoup d'eucaryotes supérieurs comme les mammifères (Garneau *et al.*, 2007).

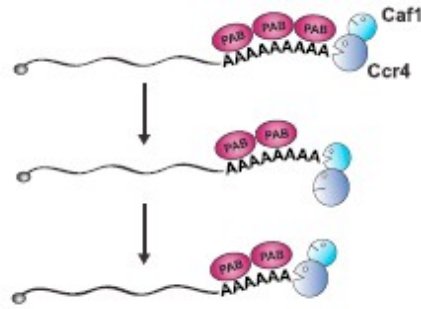


Figure 1.6. Cycle de déadénylation par le complexe CCR4-NOT. L'activité de ce complexe est due à l'activité successive de ses deux sous-unités déadénylases CCR4 et CAF1 (Bresson & Tollervey, 2018)

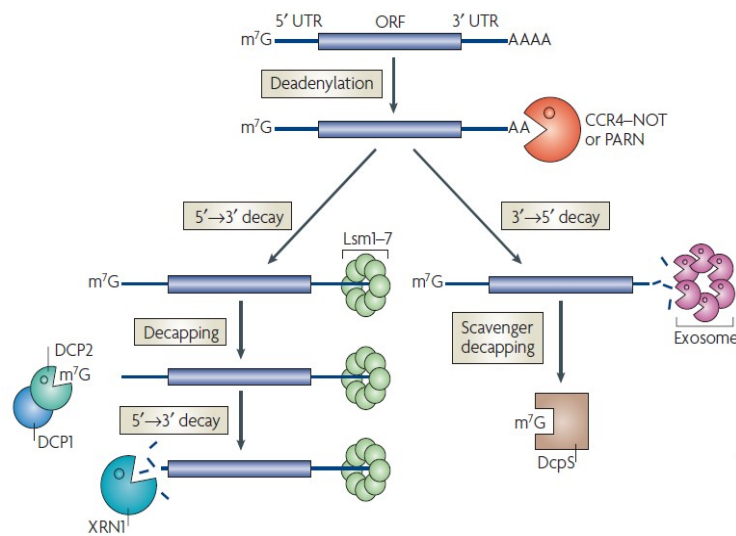


Figure 1.7. La plupart des ARNm sont dégradés par la voie dépendante de la déadénylation (montrée par les complexes CCR4/NOT et PARN). Deux mécanismes de dégradation peuvent alors rentrer en jeu : la voie de dégradation 5'-3' et la voie de dégradation 3'-5'. Dans la première, la déadénylation est suivie par le décoiffage de l'ARNm réalisé par le complexe DCP1/DCP2 pendant que l'extrémité 3' est associée avec le complexe Lsm1-7. L'ARNm peut alors être dégradé par l'enzyme 5'-3' exoribonucléase XRN1. Dans la seconde voie, la déadénylation mène à une dégradation dans le sens 3'-5' par l'exosome. La coiffe restante peut alors être hydrolysée par l'enzyme DCPS (Garneau *et al.*, 2007)

Les PABP (Pab1 chez la levure et PABPC1 chez l'Homme) interviennent dans la régulation de ce processus de déadénylation (Bresson & Tollervey, 2018; Yamashita *et al.*, 2005). Dans un premier modèle, la présence en nombre de PABP au niveau de la queue poly-A stimule l'activité catalytique de la sous-unité PAN2 du complexe PAN2-PAN3. Le complexe CCR4-NOT est inhibé par ces PABP et rentre en jeu lorsque la taille de la queue poly-A, et donc le nombre de PABP, a diminué (Yamashita *et al.*, 2005). Dans un modèle plus actuel, les deux déadénylases du complexe CCR4-NOT se comportent différemment par rapport aux PABP et fonctionnent de manière concertée sous la forme d'un cycle (Figure 1.6) (Bresson & Tollervey, 2018). En effet, la sous-unité CCR4 (Ccr4p chez la levure et CNOT6/CNOT6L chez l'homme) est activée par les PABP et dégrade les séquences poly-adenylées protégées par celles-ci tandis que CAF1 (Caf1p chez la levure et CNOT7/CNOT8 chez l'homme) est inhibée par l'interaction avec celles-ci et dégrade les segments poly-A nu (Yi *et al.*, 2018). Ainsi, le cycle de déadénylation par le complexe CCR4-NOT se déroule comme suit : lors de son interaction avec les PABP, CCR4 est activée et dégrade la queue poly-A. Cette dégradation retire un site de liaison des PABP, permettant ainsi la libération d'une molécule de PABP. La déadénylase CAF1 n'est alors plus inhibée et peut dégrader la queue poly-A jusqu'à ce qu'elle soit de nouveau inhibée par une nouvelle molécule de PABP et que CCR4 reprenne le relai (Figure 1.6) (Bresson & Tollervey, 2018; Lim *et al.*, 2018).

La plupart des ARNm sont dégradés une fois que leur queue poly-A atteint une longueur inférieure à 25 nucléotides (Eisen *et al.*, 2020). Il ne subsiste donc que très peu d'adénine, et donc très peu de PABP, ce qui déstabilise la conformation circulaire de l'ARNm et, par conséquent, déstabilise celui-ci.

À ce niveau, deux voies de dégradation sont possibles : la voie de dégradation 5' → 3' et la voie de dégradation 3' → 5' (Figure 1.7) (Balagopal *et al.*, 2012; Garneau *et al.*, 2007). La voie de dégradation 5' → 3' est initié par le décoiffage de l'ARNm, réalisé par le complexe de décoiffage DCP1-DCP2 (Garneau *et al.*, 2007; She *et al.*, 2004). L'activité catalytique de ce complexe est due à la sous-unité DCP2 et est inhibée par la présence de PABP (Z. Wang *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2005). Certains facteurs interviennent également pour un décoiffage efficace par ce complexe (Garneau *et al.*, 2007; Mugridge *et al.*, 2018) comme par exemple le complexe heptamérique LSM1-7 qui s'associe à l'extrémité 3' des ARNm déadénylés et favorise le décoiffage par le complexe DCP1-DCP2 (Tharun & Parker, 2001). Une fois la coiffe retirée, l'extrémité 5' et le nucléoside mono-phosphate qui s'y trouve sont sensibles à l'action de la 5'-3' exoribonucléase XRN1 (Mugridge *et al.*, 2018). La voie de dégradation 3' → 5', quant à elle, met en jeu un complexe protéique, l'exosome, comprenant notamment des protéines possédant une activité 3'-5' exonucléasique (Anderson & Parker, 1998; Houseley *et al.*, 2006). La coiffe restante à l'extrémité 5' sera métabolisée par l'enzyme de décoiffage DCPS (Z. Wang *et al.*, 2001).

Au sein du cytoplasme, on retrouve des structures appelées Processing Bodies ou P-bodies. Ces structures

dynamiques sont formées par l'agrégation d'ARN messagers réprimés traductionnellement et contiennent différents facteurs impliqués dans la dégradation de l'ARNm (Lee & Vasudevan, 2013; Luo *et al.*, 2018; Teixeira & Parker, 2007). Effectivement, les complexes de déadénylation PAN2-PAN3 et CCR4-NOT (Collart, 2016) ainsi que les différents facteurs intervenant dans la voie de dégradation 5' → 3' (Mugridge *et al.*, 2018), comme le complexe de décoiffage DCP1-DCP2 (Sheth & Parker, 2003) ou l'exonucléase XRN1, y sont notamment détectés (Garneau *et al.*, 2007; Lee & Vasudevan, 2013). Cela suggère un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle. Cependant, la fonction exacte de ces P-bodies reste un sujet controversé. En effet, ils pourraient être impliqués dans le turnover des ARNm et/ou intervenir dans la répression de la traduction des transcrits qui s'y trouvent (Luo *et al.*, 2018; Mugridge *et al.*, 2018). D'un côté, il pourrait s'agir de lieux de dégradation des ARNm ou de lieux de stockage des ARNm à dégrader ainsi que des enzymes impliqués dans la dégradation de ces transcrits (Garneau *et al.*, 2007). D'autre part, ils permettraient la séquestration des transcrits afin d'éviter leur traduction vu qu'ils ne contiennent généralement ni les protéines ribosomiques ni les facteurs d'initiation nécessaires à la traduction (Garneau *et al.*, 2007; Lee & Vasudevan, 2013).

Il a également été montré que ces structures peuvent relâcher des ARNm déadénylés pour qu'ils soient re-adénylés et de nouveau traduits (Bregues *et al.*, 2005). La déadénylation serait donc un phénomène réversible ; les transcrits présentant un signal adéquat peuvent être re-adénylés et retourner vers la traduction (Garneau *et al.*, 2007). En considérant toutes ces données, cette structure semble jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes à travers le contrôle de la traduction et/ou de la dégradation des ARNm (Lee & Vasudevan, 2013).

1.3.2.2 Voies indépendantes de la déadénylation

La machinerie de décoiffage, à savoir le complexe DCP1-DCP2, peut être recrutée indépendamment de la déadénylation via certains facteurs recrutés au niveau de la région 3' UTR de l'ARNm. Ce dernier sera alors dégradé par la 5' → 3' exoribonucléases XRN1 (Garneau *et al.*, 2007). Dans certains cas, une endoribonucléase peut également être recrutée au niveau de l'ARNm et cliver ce dernier, produisant ainsi deux fragments ayant chacun une extrémité non protégée. Ces fragments peuvent alors être dégradés par XRN1 et l'exosome. Cette voie de dégradation est appelée *endonuclease-mediated mRNA decay* (Garneau *et al.*, 2007; Schoenberg & Maquat, 2012).

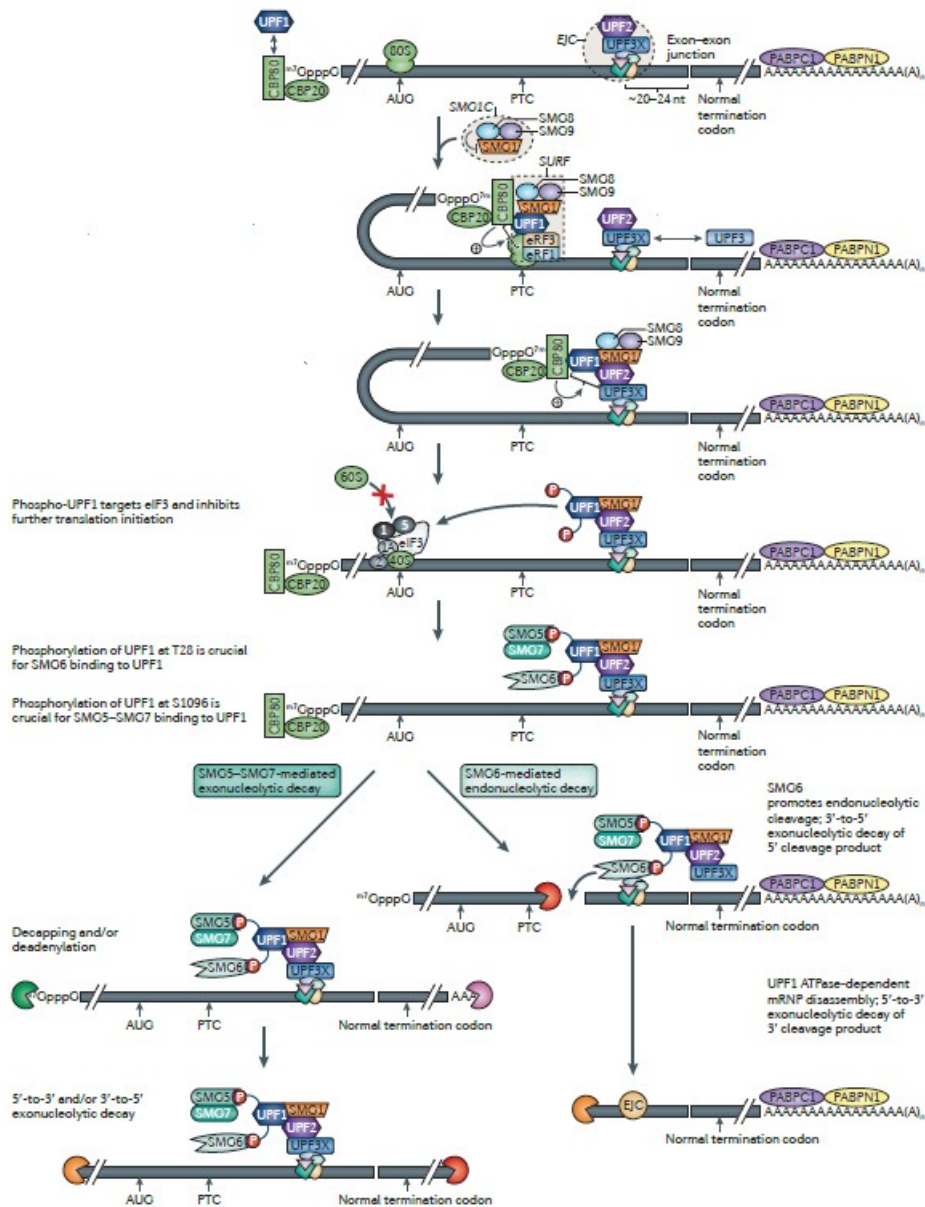


Figure 1.8. Nonsense-mediated decay (Schoenberg & Maquat, 2012). Le ribosome reste bloqué au niveau du PTC et le complexe SURF peut se former. Ce complexe SURF peut alors interagir avec un EJC via l'interaction de UPF1 et UPF2 ce qui a pour effet d'activer UPF1, amène à sa phosphorylation par SMG1 et permet la dissociation de eRF1 et eRF3. UPF1 phosphorylé peut inhiber les événements d'initiation de la traduction et peut interagir avec SMG6 et SMG5-7, ce qui amène à la dégradation de l'ARNm, respectivement en initiant le décoiffage et/ou la déadénylation et par clivage endonucléolytique.

1.3.2.3 Mécanismes de contrôle qualité des ARNm

Chaque étape de la production d'ARNm est un risque supplémentaire d'insérer des erreurs. La cellule a donc mis en place une série de mécanismes de surveillance permettant la détection des ARNm problématiques en vue de les éliminer, ce qui protège la cellule de la production de protéines aberrantes voire toxiques. Au sein du cytoplasme, trois mécanismes dépendants de la traduction permettent la détection et l'élimination des ARNm aberrants (Garneau *et al.*, 2007; Schoenberg & Maquat, 2012). Ces trois mécanismes sont : le *Nonsense-mediated decay* (NMD), le *No-go decay* (NGD) et le *Non-stop decay* (NSD).

Le *Nonsense-mediated decay* est le mécanisme de contrôle qualité permettant l'élimination rapide d'ARNm nouvellement synthétisés dont la traduction se termine prématurément, via la présence d'un PTC (*premature termination codon*) (Garneau *et al.*, 2007; Huang & Wilkinson, 2012; Schoenberg & Maquat, 2012). Dans cette voie, lorsque la terminaison se déroule au niveau d'un PTC et que ce dernier se trouve à plus de 50-55 nucléotides en amont d'une EJC, celui-ci est marqué par la formation du complexe SURF, comprenant la protéine UPF1 et la kinase SMG1 et les facteurs de libération du peptide eRF1 et eRF3, au niveau du ribosome en phase de terminaison (Karamyshev & Karamysheva, 2018; Schoenberg & Maquat, 2012). Ces EJC sont déplacées, en temps normal, par le ribosome mais en présence d'un PTC, elles sont toujours présentes en aval de celui (Garneau *et al.*, 2007). Ce complexe SURF peut alors lier l'EJC par l'intermédiaire de l'interaction de UPF1 avec UPF2, un membre de l'EJC. Cette association entre ce complexe SURF et la EJC est nécessaire pour l'activation de UPF1 via sa phosphorylation par SMG1 (Kashima *et al.*, 2006) au niveau des résidus T28 et S1096, et il y a dissociation des facteurs de libération du peptide eRF1 et eRF3 (Garneau *et al.*, 2007; Kim & Maquat, 2019; Schoenberg & Maquat, 2012). Ces deux phosphorylations sont essentielles pour, respectivement, la liaison de la protéine SMG6 et du complexe SMG5-7, et pour l'inhibition des événements d'initiation de la traduction (Schoenberg & Maquat, 2012). La protéine SMG6 procède à un clivage endonucléolytique ayant lieu entre le PTC et l'EJC et mène à une dégradation par les voies de dégradation 5' → 3' et 3' → 5' tandis que le complexe SMG5-7 mène à une dégradation par ces mêmes voies de dégradation en initiant le décoiffage et/ou la déadénylation (Figure 1.8) (Karamyshev & Karamysheva, 2018; Schoenberg & Maquat, 2012).

Le *No-go decay* est le mécanisme de contrôle qualité détectant les ribosomes bloqués au niveau des ARNm, au niveau de structures secondaires par exemple (Garneau *et al.*, 2007). Le complexe protéique Dom34:Hbs1 reconnaît ces ribosomes bloqués en se liant au niveau de leur site A vide, amenant à la libération du peptide en cours d'élongation ou du peptidyl-tRNA (Doma & Parker, 2006; Harigaya & Parker, 2010). Cela a pour effet de provoquer le clivage endonucléolytique du transcrit et la dissociation des sous-unités du ribosome bloqué (Harigaya & Parker, 2010; Tsuboi *et al.*, 2012). Cela génère ainsi deux fragments

ayant chacun une extrémité non protégée, exposée au machinerie de dégradation 5' → 3' et 3' → 5' exonucléolytique (Garneau *et al.*, 2007) (Figure 1.9).

Le *Non-stop decay* est le mécanisme de contrôle qualité ciblant les ARNm dont le codon STOP n'est pas présent dans le bon cadre de lecture voire manquant. La traduction continue alors jusqu'à l'extrémité 3', le long de la queue poly-A et le ribosome s'y retrouve bloqué. Ce ribosome est reconnu par la protéine Ski7 chez la levure et le complexe Dom34:Hbs1 chez les mammifères, ce qui va libérer celui-ci et recruter l'exosome ainsi que le complexe Ski associé (Garneau *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2013; Shoemaker & Green, 2012). Ces derniers vont permettre la déadénylation et la dégradation dans le sens 3' → 5' de l'ARNm. En absence de Ski7, la voie de dégradation 5' → 3' rentre en jeu. En effet, le ribosome déplace les PABP en traduisant la queue poly-A, ce qui perturbe la conformation circulaire de l'ARNm et favorise le décoiffage. L'enzyme XRN1 peut alors dégrader l'ARNm à partir de l'extrémité 5' (Garneau *et al.*, 2007) (Figure 1.9).

1.3.2.4 Staufen-mediated mRNA decay (SMD)

La protéine UPF1 est un facteur clé du processus NMD décrit précédemment. Cependant, d'autres voies de dégradation dépendent de la présence de cette protéine. C'est le cas de la voie *Staufen-mediated mRNA decay* (SMD) (Kim & Maquat, 2019). Cette voie de dégradation des ARNm implique des protéines de liaison à l'ARN double brin, les protéines Staufen (STAU). Chez les mammifères, on distingue les deux paralogues STAU1 et STAU2. Ces protéines sont impliqués dans le transport et dans la localisation des ARNm, notamment au niveau des neurones (Kiebler *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2001) et des ovocytes (Kim & Maquat, 2019). De plus, ces RBP STAU1 et STAU2, sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères (Park & Maquat, 2013), reconnaissent un site ARN double brin spécifique, le *STAU1-binding site*, se trouvant au niveau de la région 3'UTR de certains ARNm et peuvent induire leur dégradation par la voie SMD, dépendante de la traduction et de la présence de UPF1 (Y. K. Kim *et al.*, 2005; E. Park *et al.*, 2013). Ce dimère lié à son site de liaison va pouvoir recruter UPF1 présent en amont sur l'ARNm, au niveau d'un ribosome en phase de terminaison, comme le ferait la EJC dans la voie NMD (Kim & Maquat, 2019). Il a été montré que la protéine UPF2, membre des EJC, intervient également dans ce processus SMD. UPF2 jouerait le rôle d'adaptateur entre la protéine STAU1 et UPF1 et stimulerait l'activité de UPF1 (Gowravaram *et al.*, 2019). Les deux voies, SMD et NMD, amènent à la phosphorylation de UPF1 et le reste du mécanisme est commun aux deux voies (Schoenberg & Maquat, 2012).

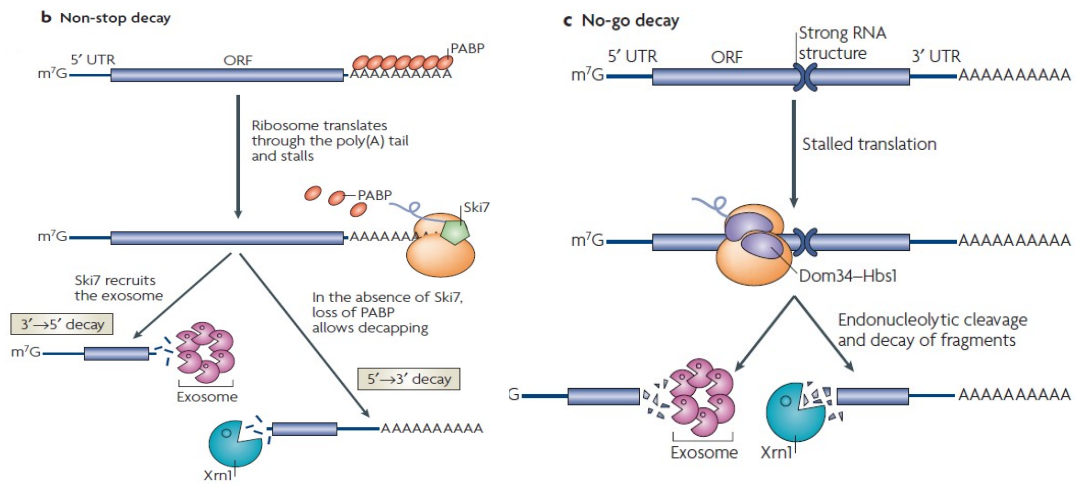


Figure 1.9. (Garneau *et al.*, 2007). Figure 9b. *Non-stop decay* chez la levure : Le ribosome continue de traduire l'ARNm le long de la queue poly-A en absence de codon STOP, ce qui déplace les PABP, et se retrouve bloquer au niveau de l'extrémité 3'. Chez la levure, Ski7 se lie alors au niveau du site A vide du ribosome, favorise sa libération et recrute l'exosome qui dégrade alors la queue poly-A et l'ARNm. En absence de Ski7, le déplacement des PABP favorise le décoiffage et la 5'-3' exonucléase XRN1 rentre en jeu. Figure 9c. *No-go decay* : Les protéines Dom34 et Hbs1 vont reconnaître les ribosomes bloqués sur le transcrit et initier le clivage endonucléolytique ainsi que la dissociation du ribosome bloqué. Cela génère 2 fragments qui vont pouvoir être dégradé par l'exosome et par XRN1.

I.4 Les rôles post-transcriptionnels des facteurs de transcription : la dégradation des ARNm

Comme énoncé précédemment, l'expression des gènes et son contrôle se présente sous la forme d'un réseau complexe d'interactions où les différentes machineries sont interconnectées entre elles, physiquement et/ou fonctionnellement (Maniatis & Reed, 2002). Récemment, certaines découvertes ont montrés que les facteurs de transcription seraient également impliqués dans des mécanismes post-transcriptionnels, comme par exemple dans la régulation de l'épissage du pré-ARNm (Rambout *et al.*, 2018b), en plus de leur fonction au niveau de la transcription des gènes. Ainsi, via des études indépendantes, il a été démontré que certains facteurs de transcription pouvaient intervenir dans le processus de dégradation des ARNm se déroulant au sein du cytoplasme (Cho *et al.*, 2015; Moon *et al.*, 2018; Rambout *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016). Tout d'abord, lors d'une étude réalisée par (Cho *et al.*, 2015), le récepteur des glucocorticoïdes (GR), un récepteur nucléaire connu jusque là pour son rôle dans la transcription, a montré une implication dans la régulation de la dégradation des transcrits. Il est impliqué dans une voie de dégradation, prénommée *GR-mediated mRNA decay* (GMD) (Cho *et al.*, 2015). En effet, celui-ci peut s'associer à l'ARNm de manière indépendante à la présence de glucocorticoïde (GC) et permet de déclencher, en présence de son ligand, sa dégradation en recrutant UPF1, un effecteur de la voie NMD, ou d'autres protéines impliquées dans la dégradation des ARNm tel que DCP1A ou l'endoribonucléase HRSP12 (Cho *et al.*, 2015; O. H. Park *et al.*, 2016). Ensuite, au sein du laboratoire de *Gene Expression & Cancer* du Professeur Franck Dequiedt, le travail de Xavier Rambout a montré que le facteur de transcription ERG module l'expression des gènes en affectant la stabilité de certains transcrits. En effet, il régule la dégradation d'ARNm de certains gènes, dont les produits interviennent au niveau de la signalisation AURORA ; cette dégradation est nécessaire pour la poursuite du cycle cellulaire. Pour ce faire, ce facteur de transcription est recruté au niveau de ses ARNm cibles via l'interaction de sa région C-terminale avec la protéine RBPMS et promeut la dégradation de ces transcrits en recrutant le complexe CCR4-NOT, avec lequel il interagit au niveau de la sous-unité CNOT2 (Rambout *et al.*, 2016). De plus, le facteur de transcription EBF1, jouant un rôle prépondérant dans la différenciation des lymphocytes B, intervient dans la régulation de la dégradation des ARNm en plus de son rôle dans la transcription. Il interagit avec la sous-unité CNOT3 du complexe CCR4-NOT et permet ainsi le recrutement au niveau de ses gènes cibles. Ce recrutement gène-spécifique de CCR4-NOT par EBF1 suggère une régulation diversifiée de ses gènes cibles au niveau de la transcription et de la stabilité des ARNm (Yang *et al.*, 2016). Par après, le facteur de transcription KLF4 participe à la régulation de la dégradation des ARNm impliqués dans la neurogenèse au sein des cellules NPCs (*neural progenitor cells*). Effectivement, celui-ci interagit avec STAU1 et permet son

recrutement au niveau de la région 3'UTR de ces ARNm. Cela a pour effet d'augmenter la dégradation de ces transcrits par la voie *Stau1-mediated decay* (SMD) et d'inhiber le processus de neurogenèse (Moon *et al.*, 2018). Enfin, les facteurs de transcription SMAD2/3 interviennent dans la régulation de l'épitranscriptome en recrutant un complexe de méthylation de l'ARN sur des transcrits cibles (Bertero *et al.*, 2018).

De ces études indépendantes émerge l'idée que les facteurs de transcription sont capables d'intervenir dans la régulation de la stabilité d'un ARNm en plus de leur rôle dans la transcription en interagissant, par exemple, avec une machinerie de dégradation ou de méthylation des ARNm.

1.5 Les Forkhead box Proteins

Les protéines *Forkhead box* (FOX) sont des facteurs de transcription encodés par une ancienne famille de gènes contenant plus de 40 membres dans le génome des mammifères (Hannenhalli & Kaestner, 2009). Le génome humain en compte 50 classés en 19 sous-familles (Figure 1.10), qui sont identifiées par les lettres de l'alphabet (FoxA jusque FoxS), en se basant sur la similarité de leur domaine de liaison à l'ADN (Jackson *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017). Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN, appelé « *Forkhead domain* » (domaine FKH), formant un motif en « hélice ailée » (*winged helix domain*) (Jackson *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2018). Ce domaine d'environ 100 acides aminés est très bien conservé chez les différents membres de cette famille et est composé de 3 hélice α , 3 brins β et 2 boucles (« *wing* » regions) (Jackson *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018). Ces facteurs de transcription encodés par les gènes *FOX* jouent un rôle dans divers processus développementaux, dans la différenciation, la migration et l'invasion cellulaire ou encore dans le contrôle du cycle cellulaire (prolifération) mais certains membres sont également dérégulés dans certaines pathologies tel que les cancers (Benayoun *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 2010; Lehmann *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2018).

1.6 Le facteur de transcription FOXM1

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous concentrerons sur le facteur de transcription FOXM1. Il s'agit du seul représentant actuellement connu de la sous-famille FOXM (Figure 1.10) (Wang *et al.*, 2018).

La protéine FOXM1 possède 3 domaines fonctionnels distincts : un domaine N-terminal répresseur (NRD), un domaine de liaison à l'ADN conservé de type FKH (DBD) et un domaine C-terminal de transactivation (TAD) (Liao *et al.*, 2018; Littler *et al.*, 2010). Son domaine de liaison à l'ADN adopte la structure décrite pour les membres de la famille FOX (domaine FKH), comprenant 3 hélices α et 3 brins β dans la topologie $\alpha\beta\alpha\beta\beta$, ainsi que deux boucles (« *wings* »), la première se situant entre les deux derniers brins β tandis que l'autre correspond aux résidus immédiatement en aval de ce troisième brin β (Figure 1.11) (Littler *et al.*, 2010).

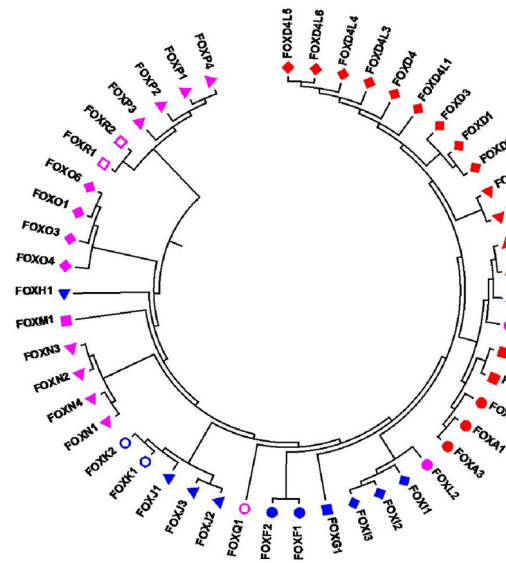


Figure 1.10. Analyse phylogénétique de la famille FOX chez l'Homme (Wang *et al.*, 2018)

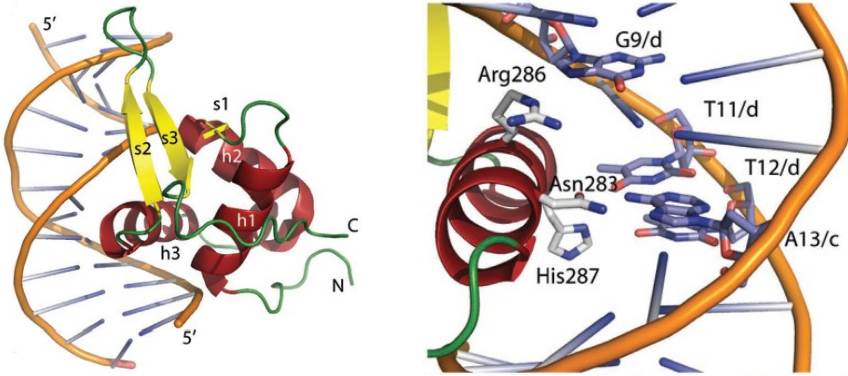


Figure 1.11. Gauche : Représentation du domaine de liaison à l'ADN de FOXM1 (Littler *et al.*, 2010). Il est formé de 3 hélices α et 3 brins β dans la topologie $\alpha\beta\alpha\beta\beta$ (hélice α : h1, h2 et h3 ; brin β : s1, s2 et s3). Les « wings » correspondent à la boucle entre s2 et s3 et aux résidus directement en aval de la région de s3. Droite : Résidus et bases impliqués dans l'interaction séquence spécifique de FOXM1 avec l'ADN (Littler *et al.*, 2010)

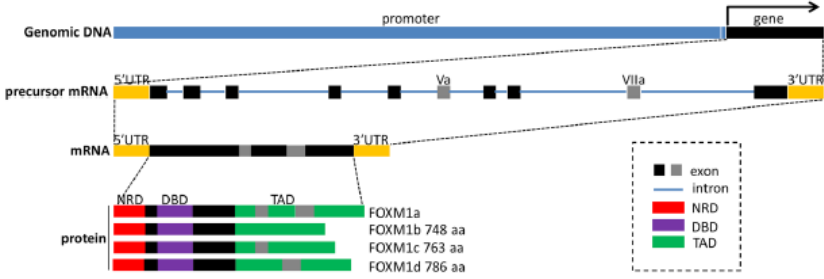


Figure 1.12. Structure génomique, épissage alternatif et les 4 isoformes de FOXM1 (Liao *et al.*, 2018)

Ce DBD permet à FOXM1 de se lier à des séquences situées au niveau du promoteur de ces gènes cibles, dont le consensus est le suivant : 5' - TAAACA – 3' (Korver *et al.*, 1997; Littler *et al.*, 2010). Pour se lier à l'ADN, la protéine FOXM1 réalise divers contacts avec l'ADN (Littler *et al.*, 2010) :

- Des contacts indépendants de la séquence : ces contacts se font entre l'ADN et trois régions du domaine de liaison à l'ADN de FOXM1 que sont la partie N-terminale de la première hélice α , certains résidus du deuxième et troisième brins β et la partie N-terminale de la troisième hélice α .
- Des contacts spécifiques de la séquence : ces contacts se font entre la séquence consensus décrite précédemment et certains résidus appartenant à la troisième hélice α du domaine FKH. Parmi ces résidus, il y a les résidus Asn-283, Arg-286 et His-287 qui sont strictement conservés chez les membres de la famille FOX et qui contribuent majoritairement à la spécificité de l'interaction entre l'ADN et FOXM1 (Figure 1.11). De plus, le résidu Ser-290 intervient également au niveau de l'interaction avec l'ADN au niveau de la séquence consensus.

Le gène *FOXM1* est présent sur le chromosome 12, et plus précisément au niveau de la bande 12p13-3, en position télomérique (Jackson *et al.*, 2010; Laoukili *et al.*, 2007). Ce gène s'étend sur 25 kb et comporte 10 exons dont deux sont sujet à un épissage alternatif, les exons Va et VIIa, ce qui conduit à la production de 4 isoformes : FOXM1a, FOXM1b, FOXM1c et FOXM1d (Figure 1.12) (J Laoukili *et al.*, 2011; Jamila Laoukili *et al.*, 2007; X. Zhang *et al.*, 2017).

L'isoforme FOXM1a possède ces deux exons ce qui amène à la perte de l'activité de transactivation rendant ainsi la protéine transcriptionnellement inactive (Jamila Laoukili *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2018). Elle pourrait alors agir comme une forme dominante négative, car son activité de liaison à l'ADN est conservée malgré la disruption de son domaine TAD. Ce variant naturel pourrait ainsi être produit afin de moduler l'activité de FOXM1 sous certaines conditions, en rentrant en compétition avec les autres isoformes (Jamila Laoukili *et al.*, 2007). Les trois autres isoformes sont transcriptionnellement actives. Le variant FOXM1b ne comporte aucun des deux exons. Il est principalement retrouvé au sein des testicules, mettant en évidence un épissage alternatif tissu-spécifique de FOXM1 (Jamila Laoukili *et al.*, 2007). L'isoforme FOXM1c, quant à elle, possède l'exon Va tandis que FOXM1d, découvert récemment, dispose de l'exon VIIa (Jamila Laoukili *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2018; X. Zhang *et al.*, 2017).

Il a été montré que les cellules cancéreuses peuvent utiliser ce mécanisme d'épissage alternatif afin de produire un/des isoforme(s) permettant le développement du cancer (J. Zhang & Manley, 2013). C'est par exemple le cas dans les cellules cancéreuses colorectales où l'isoforme majoritaire est FOXM1d. Ces cellules produisent, par épissage alternatif, ce variant FOXM1d afin de contribuer aux transitions épithélium-mésenchyme et à la production de métastase (X. Zhang *et al.*, 2017).

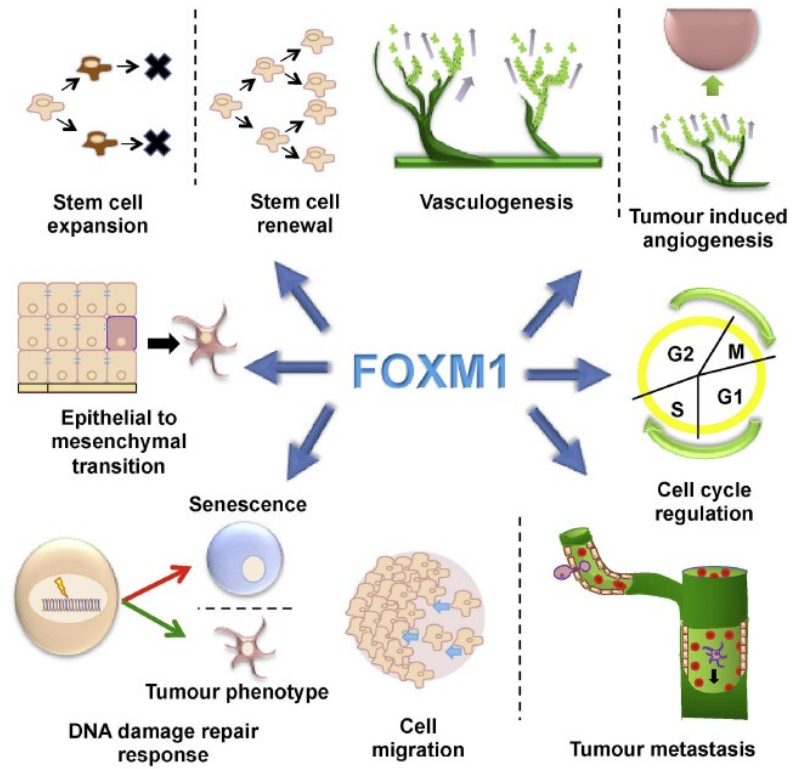


Figure 1.13. FOXM1 régule des processus cruciaux dans le développement embryonnaire et dans la progression des tumeurs (Bella *et al.*, 2014).

I.6.1 Rôles de FOXM1 et cancer

Le facteur de transcription FOXM1 joue un rôle important dans le développement embryonnaire (Bella *et al.*, 2014). En effet, il est exprimé dans tous les tissus embryonnaires et particulièrement dans les cellules prolifératives des tissus épithéliaux et mésenchymateux (Bella *et al.*, 2014; Jamila Laoukili *et al.*, 2007). Chez l'adulte, FOXM1 n'est généralement pas exprimé au niveau des cellules quiescentes et différenciées mais est exprimée au niveau des cellules/tissus ayant une haute capacité proliférative ou sous certaines conditions. Par exemple, son expression peut être réactivée lors de dommages au niveau de certains organes comme les poumons ou le foie, en vue de fournir aux cellules la capacité de prolifération nécessaire à la réparation des tissus (Bella *et al.*, 2014). FOXM1 est donc une protéine impliquée dans l'activation de la prolifération cellulaire (Jamila Laoukili *et al.*, 2007) et est détectée dans les tissus progéniteurs et en régénération mais également au sein des cellules tumorales, hautement prolifératives (Liao *et al.*, 2018). De manière plus précise, FOXM1 est impliqué dans une série de processus biologiques importants intervenant dans le développement embryonnaire et dans la prolifération cellulaire :

- Il intervient dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et dans le processus de prolifération cellulaire (W. Zhang *et al.*, 2017; Zona *et al.*, 2014). Il régule l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et contrôle ainsi le bon déroulement de ce dernier (il contrôle la transition G1/S, la transition G2/M et la progression de la phase M) (W. Zhang *et al.*, 2017) ;
- Il est impliqué dans la régulation de l'angiogenèse et de la vasculogenèse durant le développement embryonnaire et fœtal (Bella *et al.*, 2014) ;
- Il joue également un rôle au niveau de la migration cellulaire, de l'invasion cellulaire ou encore dans la transition épithélium-mésenchyme de certaines cellules impliquées dans de nombreux processus embryonnaires (Bella *et al.*, 2014) ;
- Il intervient aussi au niveau du renouvellement des cellules, notamment des cellules souches, et dans le processus de différenciation cellulaire (Bella *et al.*, 2014; Zona *et al.*, 2014).

Il participe également au maintien de la stabilité génomique via l'expression de gènes permettant la ségrégation correcte des chromosomes (Jamila Laoukili *et al.*, 2005, 2007) ainsi qu'au maintien de l'intégrité du génome en modulant l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN (Zona *et al.*, 2014) (Figure 1.13).

FOXM1 est considéré comme un proto-oncogène (W. Zhang *et al.*, 2017). Sa surexpression est observée au niveau de nombreux cancers chez l'Homme, comme le cancer du sein, des poumons, du foie, etc (Liao *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; W. Zhang *et al.*, 2017). Dans divers types de cancers, cette expression accrue peut être expliquée par l'amplification de la bande 12p13, comprenant le gène *FOXM1*, le transformant ainsi en

oncogène (Benayoun *et al.*, 2011). La surexpression de FOXM1 va affecter les différents processus biologiques dans lesquels il intervient ce qui impacte la formation et la progression des tumeurs, la production de métastases, l'angiogenèse tumorale et la résistance aux agents génotoxiques (Bella *et al.*, 2014). Une diminution de l'expression de FOXM1 au sein de cellules cancéreuses amène à une diminution de la prolifération et des autres processus biologiques dans lequel il est impliqué, ce qui montre le rôle important de FOXM1 dans le développement de cancers (Jiang *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2018).

En régulant l'expression de certains gènes au sein des cellules cancéreuses, FOXM1 va être impliqué dans (Figure 1.13) :

- la prolifération des cellules cancéreuses (Bella *et al.*, 2014; Halasi & Gartel, 2013) ;
- l'angiogenèse tumorale (Bella *et al.*, 2014; Halasi & Gartel, 2013) ;
- l'invasion tumorale, la production de métastases et leur migration via son rôle dans la migration et l'invasion cellulaire (Bella *et al.*, 2014; Halasi & Gartel, 2013) ;
- l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses et leur maintien (Bella *et al.*, 2014) ;
- la transition épithélium-mésenchyme de certaines cellules permettant la formation de métastases dans certains types de cancer (Bella *et al.*, 2014) ;
- la résistance aux agents génotoxiques et à la sénescence cellulaire des cellules cancéreuses, ce qui conduirait à une capacité de réplication infinie. En effet, FOXM1 régule la transcription de gènes de réponse aux dommages à l'ADN, permettant la réparation de l'ADN suite à l'action de ces agents génotoxiques (Bella *et al.*, 2014; Zona *et al.*, 2014). L'activation de la réponse aux dommages à l'ADN permet également le développement de cancers (Bella *et al.*, 2014) ;
- la résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis de l'apoptose (Halasi & Gartel, 2013). Par exemple, en contrôlant les stress oxydatifs au sein des cellules de carcinome épidermoïde, il permet aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose (Smirnov *et al.*, 2016) ;

De plus, FOXM1 échappe à l'action des suppresseurs de tumeurs permettant ainsi de maintenir une prolifération cellulaire constante (Halasi & Gartel, 2013). Tous ces éléments suggèrent que FOXM1 représente une cible majeure dans le combat contre le cancer. Il active des gènes cibles qui sont impliqués dans les différentes phases de développement d'un cancer et contribue donc aux différentes caractéristiques de celui-ci (Halasi & Gartel, 2013).

1.6.2 Cibles de FOXM1

Le facteur de transcription FOXM1 régule l'expression d'une série de gènes cibles impliqués dans divers processus biologiques intervenant dans le développement embryonnaire mais aussi dans le développement de cancers et leur progression (Tableau 1.1).

Tableau 1.1. Liste de gènes cibles de FOXM1 impliqués dans la formation de cancers, leur progression et leur résistance aux traitements, et leur régulation au sein des cancers (Lam *et al.*, 2013)

Processus biologiques	Gènes cibles	Régulation
Angiogenèse	<i>VEGFA</i>	Upregulation
Cycle cellulaire et prolifération	<i>AURKB, BIRC5, CCNB1, CDC25B, SKP2, PLK1, BUB1B, CENPA, KIF20A, NEK2, CENPF, CEP55, MYC</i> et <i>TOP2A</i>	Upregulation
Migration et invasion cellulaire	<i>LOX1, LOXL2, MMP2</i> et <i>MMP9</i>	Upregulation
Sénescence cellulaire	<i>BMI1</i>	Upregulation
Réponse aux dommages à l'ADN	<i>BRCA2, XRCC1, BRIP1, CHEK1, EXO1, PLK4, POLE2, RFC4</i> et <i>RAD51</i>	Upregulation
Résistance aux médicaments/traitements	<i>STMN1</i>	Upregulation
Transition épithélium-mésenchyme	<i>CAV1</i>	Upregulation
Stress oxydatif	<i>CAT</i> et <i>SOD2</i>	Upregulation
Signalisation	<i>AXIN2</i> <i>JNK1</i>	Upregulation
Renouvellement et différenciation des cellules souches	<i>K15</i> et <i>POU5F1 (OCT4)</i>	Upregulation
Suppresseur de tumeurs	<i>CDH1</i>	Upregulation
	<i>GATA3</i>	Downregulation
Ubiquitination	<i>NEDD4</i>	Upregulation
Réparation vasculaire	<i>CTNNB1</i>	Upregulation

I.6.3 Régulation de FOXM1

L'expression de FOXM1 peut être régulée au niveau transcriptionnel par la présence d'activateurs ou de répresseurs de la transcription reconnaissant sa région promotrice (Liao *et al.*, 2018). Certaines études ont pu montrer que l'expression de FOXM1 pouvait être induite par des oncoprotéines ou réprimée par des suppresseurs de tumeurs (Lam *et al.*, 2013), comme les protéines RB, p53 ou encore p19^{ARF} (Halasi & Gartel, 2013). Par exemple, l'oncoprotéine c-Myc peut se lier directement sur le promoteur de FOXM1 et activer son expression, ce qui contribue notamment au développement du cancer de la prostate (Pan *et al.*, 2018). Une étude a permis de montrer que l'inhibition de FOXM1, qui est donc incapable de jouer son rôle d'activateur transcriptionnel, conduit à l'inhibition de la production d'ARNm de FOXM1 et donc, à l'inhibition de son expression (Gartel, 2015). Ceci a mis en évidence le fait que FOXM1 pourrait réguler sa propre expression, via la présence d'une boucle d'autorégulation positive (Gartel, 2015; Halasi & Gartel, 2009). En effet, FOXM1 serait capable de lier son propre promoteur et d'induire sa propre expression (Gartel, 2015; Liao *et al.*, 2018). Cette auto-régulation de FOXM1 pourrait être impliquée dans le développement de certains cancers, et pourrait donc être ciblée afin d'inhiber leur croissance (Gartel, 2015), comme il a été montré au sein du modèle murin TRAMP pour le cancer de la prostate (Cheng *et al.*, 2014). Ensuite, la régulation de l'expression de FOXM1 se fait également à un niveau post-transcriptionnel. Comme mentionné précédemment, le pré-ARNm de FOXM1 subit un épissage alternatif, aboutissant à la formation de 4 isoformes différentes. Ainsi, pour moduler son activité, l'isoforme inactif FOXM1a pourrait être produit et peut alors rentrer en compétition avec les autres isoformes actives présentes au sein de la cellule (Jamila Laoukili *et al.*, 2007). L'épissage alternatif peut se faire d'une manière tissu-spécifique comme le montre la production de l'isoforme FOXM1b essentiellement au niveau des testicules (Jamila Laoukili *et al.*, 2007). De plus, certains ARNs non-codants peuvent réguler post-transcriptionnellement FOXM1 (Liao *et al.*, 2018), comme les micro-ARNs pouvant agir comme suppresseurs de tumeurs (Wang *et al.*, 2018). Enfin, FOXM1 est également régulé de façon post-traductionnelle, abordée au point I.6.3.1.

I.6.3.1 FOXM1 et le cycle cellulaire

La protéine FOXM1 est un régulateur transcriptionnel associé à la prolifération cellulaire via son implication dans la progression du cycle cellulaire en régulant notamment les transitions G1/S et G2/M ainsi que la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse (progression de la phase M) (Song *et al.*, 2017). La progression du cycle cellulaire est largement contrôlée par des réseaux complexes de modifications post-traductionnelles (PTMs) réversibles de certaines protéines, dont FOXM1, ce qui va permettre de moduler son activité transcriptionnelle, sa localisation cellulaire ainsi que sa stabilité tout au long du cycle cellulaire.

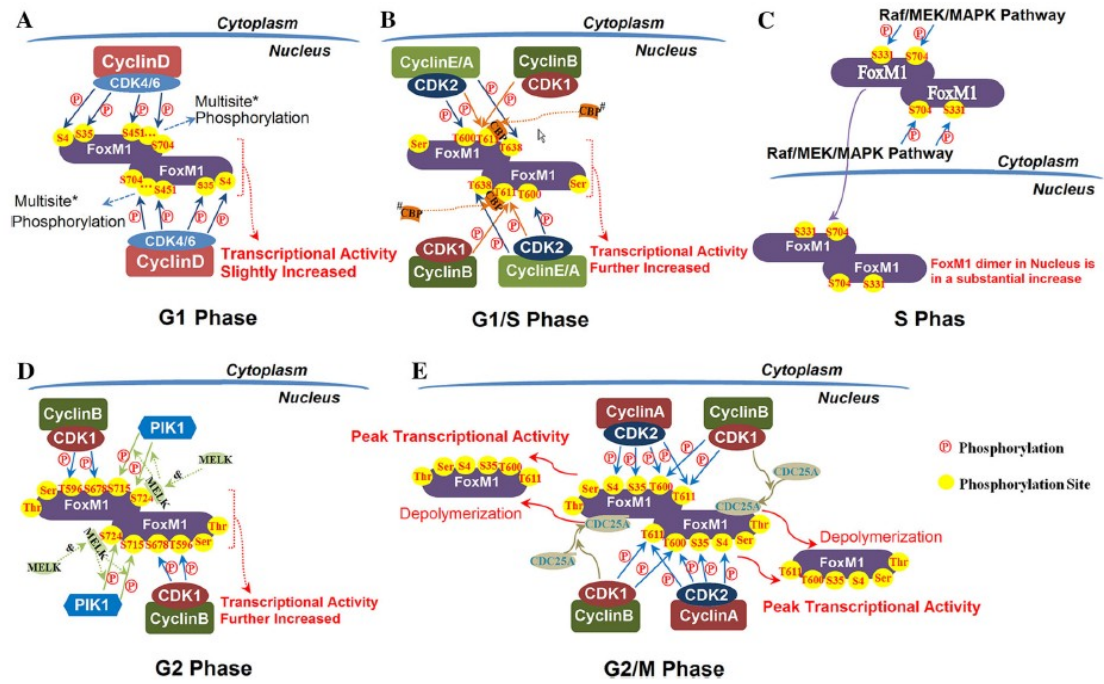


Figure 1.14. L'activité transcriptionnelle de FOXM1 est régulée par l'action de différentes kinases durant les différentes phases du cycle cellulaire (Song *et al.*, 2017). L'état de phosphorylation de FOXM1 va déterminer son niveau d'activité transcriptionnelle. Celle-ci atteint son pic au niveau de la phase G2/M où FOXM1 se retrouve hyperphosphorylé.

Parmi ces PTMs, on distingue notamment la phosphorylation, la SUMOylation (*Small ubiquitin-like modification*), l'ubiquitination, l'acétylation ou encore la méthylation (Liao *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017). La phosphorylation de FOXM1, sous le contrôle de nombreuses kinases, joue un rôle prépondérant dans le contrôle de l'activation transcriptionnelle de FOXM1. En effet, son activité transcriptionnelle évolue en corrélation avec son état de phosphorylation, qui change constamment au cours du cycle cellulaire (Liao *et al.*, 2018). Lors de la phase G1/S, FOXM1 possède une faible activité transcriptionnelle : la protéine est hypophosphorylée, se retrouve majoritairement localisée au sein du cytoplasme sous la forme de dimère et son domaine TAD est inhibé par son domaine N-terminal répresseur (NRD). Au cours du cycle cellulaire, son état de phosphorylation va augmenter pour se retrouver hyperphosphorylé et donc pleinement actif transcriptionnellement en G2/M, constituant son pic d'activité (Liao *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017).

En fin de phase G1, la phosphorylation de FOXM1 serait initiée par le complexe CyclinD-CDK4/6 (Figure 1.14). Ce dernier phosphorylerait FOXM1 à de multiples sites, ce qui va mener à sa stabilisation, son accumulation au sein de la cellule ainsi qu'à l'augmentation de son activité transcriptionnelle. Cela va également favoriser la transition G1/S (Tableau 1.2) (Anders *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2018). Cependant, d'autres études suggèrent que l'activation transcriptionnelle de FOXM1 au cours de la phase G1 n'impliquerait pas sa phosphorylation mais celle de la protéine du rétinoblastome (RB), liant de manière directe FOXM1, par le complexe CyclinD1-CDK4. Cela conduirait à l'interruption de son interaction avec FOXM1 et donc, à la levée de la répression du TAD par la protéine RB (Wierstra, 2013; Wierstra & Alves, 2006). En fin de phase S, l'activation de la voie Raf/MEK/MAPK induit la phosphorylation de FOXM1 au niveau des sites ERK1/2 stimulant ainsi sa translocation vers le noyau et son activité de transactivation (Tableau 1.2, Figure 1.14) (Ma *et al.*, 2005).

FOXM1 dispose de deux sites de liaisons de cyclines qui vont pouvoir être utilisés lors du cycle cellulaire par les complexes CyclinE/A-CDK2 et CyclinB1-CDK1 (Genin *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2017). En présence de complexes Cyclin-CDK2 (CyclinE/A-CDK2), FOXM1 est phosphorylé au niveau de sites CDK1/2 en C-terminal de la protéine, les résidus T600, T611 et S638 (Tableau 1.2) (Liao *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2005).

Ces phosphorylations vont mener à l'activation transcriptionnelle de FOXM1 en levant la répression de son domaine TAD exercée par le NRD et donc, via la restauration de l'activité du TAD (Liao *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017). Cela a pour effet également de conduire à la dissociation des dimères de FOXM1 (Song *et al.*, 2017). L'activation de FOXM1 amène à l'activation de l'expression de gènes, comme la *CyclinB1*, *CDC25B*, etc. Cela a pour effet d'augmenter le nombre de complexe CyclinB1-CDK1. Ces complexes sont activés par la *CDC25B*, via la déphosphorylation de la CDK1.

Tableau 1.2. Modifications post-traductionnelles : phosphorylation de FOXM1 (Liao *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017)

Enzyme	Résidus	Effet	Cycle cellulaire	Isoforme de FOXM1
Complexe CyclinD-CDK4/6	S4, S35, S451, S489, S508, T510, S552, T600, T611, T620, T627, S638, S672 et S704	Favorise l'activité transcriptionnelle, stabilisation et accumulation	G1/S	FOXM1c
Voie Raf/MEK/MAPK	S331	Translocation vers le noyau	Fin de phase S	FOXM1c
	S704	Favorise l'activité transcriptionnelle		
Complexe CyclinE/A-CDK2	T600, T611 et S638	Favorise l'activité transcriptionnelle	G1/S (Cycline E) (Jamila Laoukili <i>et al.</i> , 2008) G2 (Cycline A)	FOXM1c
Complexe CyclinB1-CDK1	T596, S678, S507, S657 et T585	Favorise l'activité transcriptionnelle	G2/M	FOXM1b
	T600, T611	Favorise l'activité transcriptionnelle	G2/M	FOXM1c
PLK1	S715 et S724	Favorise l'activité transcriptionnelle	G2 → G2/M	FOXM1b
<i>Not clear</i>	S251	Favorise l'activité de phosphorylation des CDK1 sur FOXM1	G2/M	FOXM1b
CHK2	S361	Stabilisation de FOXM1	Réponse aux dommages à l'ADN	FOXM1b
GSK3	S474	Dégradation de FOXM1		FOXM1b

Ce complexe, pleinement actif en G2/M et dont l'activité sur FOXM1 nécessite la phosphorylation de ce dernier au niveau du résidu S251, peut également phosphoryler les résidus T600 et T611, amenant à l'activation de FOXM1 (Tableau 1.2) (Liao *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017). La phosphorylation de ces résidus T600/T611 favorise l'interaction entre FOXM1 et la phosphatase CDC25A. Cela va amener à l'augmentation de l'activité des CDK1, et par extension, à l'augmentation de l'activité de FOXM1 (Liao *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017). Ce complexe CyclinB1-CDK1 intervient également dans la phosphorylation de l'isoforme FOXM1b, au niveau notamment des résidus T596 (correspondant au résidu T611 de l'isoforme FOXM1c) et S678 (Tableau 1.2) ce qui induit la formation de sites de liaison pour la PLK1 (*Polo-Like kinase 1*) (Fu *et al.*, 2008). Cette dernière peut s'y lier et phosphoryler les sites S715 et S724, ce qui augmente l'activité transcriptionnelle de FOXM1 (Tableau 1.2 ; Figure 1.14) (Fu *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017). L'activation de FOXM1 promeut la transcription de gènes comme la *CyclinB1*, *CDC25A*, *CDC25B* ou encore *PLK1* dont les produits interviennent au niveau de sa régulation. Ce mode de régulation peut générer une boucle de rétroaction positive, ce qui conduit à une augmentation des niveaux de ces protéines et de l'activité de FOXM1 (Song *et al.*, 2017).

La phosphorylation au niveau des sites cibles des CDK1/2, notamment le résidu T596 (FOXM1b) et T611 (FOXM1c) permettent le recrutement d'un co-activateur transcriptionnel, l'*histone deacetylase p300/CREB-binding protein* (la p300/CBP) (Liao *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2005; Major *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2017). Ce co-activateur va permettre l'acétylation de FOXM1 au niveau de résidus lysines (K63, K422, K440, K603 et K614 de l'isoforme FOXM1b (Lv *et al.*, 2016)) favorisant l'affinité pour l'ADN, la stabilité de la protéine et sa sensibilité à la phosphorylation ce qui augmente encore son activité transcriptionnelle (Liao *et al.*, 2018).

Certaines protéines peuvent au cours du cycle cellulaire rentrer en interaction avec FOXM1. Ainsi, la protéine B55 α , une sous-unité régulatrice de la phosphatase PP2A, établit des contacts avec FOXM1 et empêche l'activation prématurée de FOXM1, en contrant l'action des complexes CyclinA-CDK. Elle viendrait s'assurer que la pleine action de FOXM1 se limite à la phase G2/M, en déphosphorylant le résidu T611 (Liao *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017). D'autres kinases peuvent également intervenir dans la régulation de FOXM1 au cours du cycle cellulaire. Par exemple, en réponse aux dommages à l'ADN, la kinase CHK2 phosphoryle FOXM1 au niveau de la S361, permettant sa stabilisation ce qui aura comme impact l'augmentation de l'expression des gènes XRCC1 et BRCA2 nécessaires pour la réparation des dommages à l'ADN (Tableau 1.2) (Tan *et al.*, 2007). La phosphorylation de FOXM1 se retrouve également liée à son ubiquitination ou à sa SUMOylation. En effet, la kinase GSK3 par exemple, phosphoryle FOXM1 au niveau du résidu S474, ce qui promeut sa dégradation médiée par l'ubiquitine (Tableau 1.2) (Liao *et al.*, 2018).

À la fin de la mitose, FOXM1 est déphosphorylée et peut alors être polyubiquitinée par le complexe APC/C-

Cdh1 au début de la phase G1 du cycle suivant. FOXM1 polyubiquitinée pourra alors être dégradée par le protéasome, ce qui inhibe la progression du cycle cellulaire suivant (Halasi & Gartel, 2013; Liao *et al.*, 2018; Raychaudhuri & Park, 2011). Le cycle cellulaire pourra alors recommencer sous l'effet de facteurs de croissance, induisant la synthèse de FOXM1 durant la phase G1 (ou lors de la transition G0/G1) (Raychaudhuri & Park, 2011).

I.7 Contexte du travail et objectifs

La thèse de doctorat dans laquelle s'inscrit ce mémoire est dans la continuité du travail effectué par le Dr. Xavier Rambout. En effet, il a démontré le rôle du facteur de transcription ERG dans la régulation de la stabilité de l'ARNm, jusque-là insoupçonné. Ce facteur de transcription, recruté sur les ARN messagers par RBPMS, peut déclencher leur dégradation en recrutant le complexe de déadénylation CCR4-NOT (Rambout *et al.*, 2016). Des études indépendantes ont montré l'implication d'autres facteurs de transcription, comme EBF1, KLF4 ou encore le récepteur des glucocorticoïdes, dans la régulation de la stabilité des ARNm (Cho *et al.*, 2015; Moon *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2016). Dès lors, l'hypothèse que d'autres facteurs de transcription puissent être impliqués dans la dégradation des ARNm au sein du cytoplasme a été émise. Une expérience préliminaire a montré que le recrutement de FOXM1 sur la région 3'UTR d'un ARNm rapporteur déstabilisait cet ARNm. En mettant en relation différents résultats de diverses expériences, FOXM1 semble jouer un rôle dans la régulation de la dégradation des ARN messagers (Mariavelle, 2017, 2019). En effet, il en découle que FOXM1 a un impact sur la stabilité d'un ARNm rapporteur lorsqu'il est recruté au niveau de sa région 3'UTR, est présent au niveau des complexes ribonucléoprotéiques messagers, interagit avec la protéine de liaison à l'ARN STAU1. Étant donné que FOXM1 est un facteur de transcription et qu'il jouerait un rôle dans la régulation de la dégradation des ARNm, il est logique de se poser la question suivante : « La fonction de FOXM1 dans la dégradation de l'ARNm est-elle liée à ses fonctions transcriptionnelles ? ». La discussion de cette question constitue l'objectif de ce mémoire. Elle va se baser sur l'analyse de données déjà collectées au préalable d'expérience de RNA-Seq et de CHIP-Seq ainsi que sur la réalisation/proposition d'expériences qui nous aideraient dans celle-ci. Ainsi, cette analyse et la discussion d'expérience (*MS2-tethering degradation assay, oligo(dT) pulldown* et co-immunoprécipitation avec STAU1) à réaliser avec un triple mutant de FOXM1 dans son domaine DBD incapable de lier l'ADN, et leurs potentiels résultats permettra de tenter de fournir une première réponse à cette question. Le but final serait de proposer un/des modèle(s) qui colle(nt) aux données et de proposer des expériences à réaliser qui permettront de l'/les affiner.

Au vu des circonstances exceptionnelles dans lesquelles se sont déroulées ce mémoire, les expériences citées ci-dessus n'ont pas pu être réalisées ou menées à bien dans le temps imparti. Les expériences qui n'auront pas été réalisées seront abordées d'un point de vue plus « théorique » au niveau de la discussion. Les données de RNA-Seq et de CHIP-Seq n'ont pas été générées au cours de ce mémoire mais ont quand même été analysées, durant le confinement, dans le cadre de celui-ci.

II. Matériels & Méthodes

II. Matériels & Méthodes

II.1 Matériel cellulaire et milieu de culture

Matériel cellulaire :

- Bactéries *Escherichia coli* DH5 α électro-compétentes et chimio-compétente pour la transformation.
- Cellules HEK293 (*Human embryonic kidney 293*) : ce sont des cellules embryonnaires humaines de rein connues pour leur capacité de croissance et la facilité de leur transfection.

Milieu de culture :

- Milieu de croissance DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biowest*) pour les cellules eucaryotes : il est enrichi en vitamines, en acides aminés et en glucose, et est complété avec 10 % de FBS (*Fetal Bovine Serum*) caractérisé par la présence notamment de facteurs de croissance.
- Milieu de culture LB (*Lysogeny broth*) pour les bactéries, supplémenté d'antibiotique si nécessaire. Ce milieu de culture peut être soit un milieu LB liquide (LB 25g/L) soit un milieu LB-agar (LB 25g/L, agar 15g/L). Les bactéries en culture sont incubées à 37°C, et sous agitation à 220 rpm lorsqu'il s'agit d'une culture liquide.

II.2 Plasmides

Les plasmides décrits dans cette rubrique contiennent une origine de réplication bactérienne permettant son amplification au sein de bactéries, un gène de résistance à un antibiotique permettant la sélection des bactéries ayant incorporés le plasmide et, dans le cas de vecteur d'expression, un promoteur qui permet l'expression de la séquence insérée dans l'hôte « final ».

pDONR223 : Ce plasmide est utilisé dans le clonage Gateway comme vecteur d'entrée (Annexe 1, Figure I). Il contient un gène de résistance à la spectinomycine permettant la sélection des transformants ainsi que des sites attP1 et attP2 servant à incorporer, par recombinaison, la séquence d'ADN désirée flanquée de site attB. Il contient également le gène toxique ccdB ainsi qu'un gène de résistance au chloramphénicol entre les sites attP qui seront remplacés par la séquence d'intérêts après recombinaison.

pdest1899 : Ce vecteur est utilisé dans le clonage Gateway comme vecteur de destination (Annexe 1, Figure II). Il possède les sites attR1 et attR2 permettant l'insertion de la séquence d'intérêt à partir du pDONR223 par recombinaison. Entre ces deux sites, se trouve le gène toxique ccdB ainsi qu'un gène de résistance au chloramphénicol, qui seront remplacés par la séquence désirée. Ce plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des transformants ainsi qu'un promoteur du cytomégalo virus (CMV) compatible avec les cellules eucaryotes pour induire l'expression de la séquence insérée. On retrouve

également un tag FLAG placé en 5' de la séquence d'intérêt qui se trouvera ainsi du côté N-terminal de la protéine encodée, ce qui permettra de vérifier l'expression de nos protéines d'intérêt par western blot à l'aide d'anticorps anti-FLAG.

pN-MS2-CP : Ce plasmide est utilisé pour le clonage du triple mutant de FOXM1c (point II.4.2) en vue de la réalisation de l'expérience de *MS2-tethering degradation assay* (Annexe 1, Figure III) . Il possède un gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des bactéries transformées. Il contient également un gène de résistance à la néomycine, kanamycine et G418 (Geneticin®). Ce plasmide contient également la séquence codante pour la protéine MS2 *coat protein* (MS2-CP) sous le contrôle du promoteur du CMV, permettant son expression dans les cellules humaines. Une séquence peut être clonée en aval de la séquence codante du MS2, ce qui va permettre l'expression d'une protéine de fusion dans les cellules. Un tag FLAG est également présent afin de détecter, en western blotting, la protéine MS2-CP seule ou en fusion avec la protéine d'intérêt, à l'aide d'anticorps anti-FLAG.

II.3 Clonage

Le clonage est une technique de biologie moléculaire dont le principe est d'isoler un fragment d'ADN et de l'insérer dans un vecteur afin de l'amplifier, à l'identique. Le vecteur est choisi en fonction de la taille de la séquence d'intérêts mais aussi de manière à rendre cette séquence utilisable par l'hôte, où le vecteur sera finalement introduit. Dans le cadre de ce mémoire, seuls des vecteurs de types plasmidiques ont été utilisés. Ceux-ci peuvent être insérer et amplifier au sein de bactéries d'où ils peuvent ensuite être extraits.

II.3.1 Clonage Gateway

Le clonage Gateway est une méthode de clonage par recombinaison. Elle utilise le système de recombinaison site-spécifique du phage lambda, qui est très bien caractérisé, pour permettre l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur et le transfert de celui-ci entre différents vecteurs (Katzen, 2007; Liang *et al.*, 2013).

Cette méthode possède plusieurs avantages par rapport au clonage « classique » : elle nécessite peu de préparations et peu de réactifs, elle permet également un gain de temps, elle a une efficacité accrue et elle maintient l'orientation et le cadre de lecture des fragments à cloner (Katzen, 2007). Cependant, cette technique est plus chère et il faut disposer de la séquence d'intérêt flanquée des séquences attB aux deux extrémités, nécessaires pour la recombinaison. Cette méthode se divise en deux réactions distinctes : la réaction BP et la réaction LR (Figure 2.1).

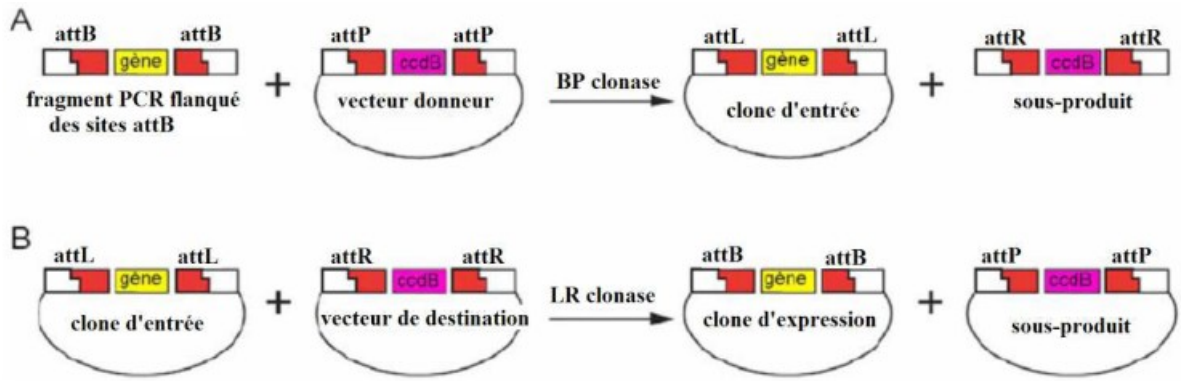


Figure 2.1. Principe du clonage Gateway (A) Réaction BP (B) Réaction LR (El Mekdad, 2014)

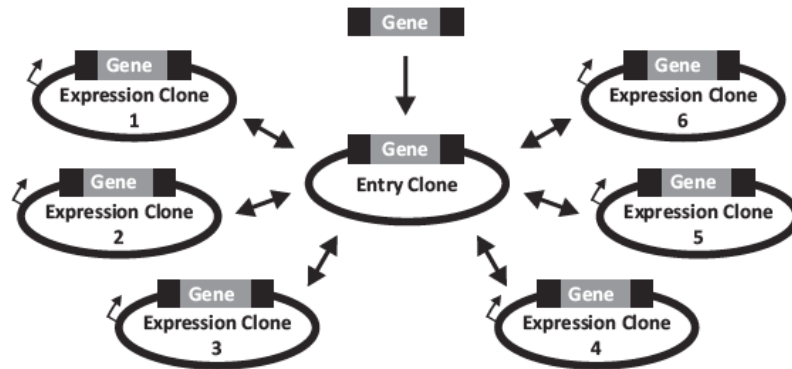


Figure 2.2. Un fragment d'ADN flanqué des sites attB peut être inséré dans un vecteur d'entrée via la réaction BP. Le clone d'entrée ainsi formé peut alors être utilisé dans la réaction LR pour transférer ce fragment au sein d'une multitude de vecteur de destination, générant des clones d'expression. À partir de ces derniers, il est possible de réintégrer le fragment au sein d'un vecteur d'entrée par une réaction BP (Liang *et al.*, 2013).

La réaction BP permet l'intégration du fragment d'ADN au sein d'un vecteur d'entrée, le pDONR223 dans notre cas, par recombinaison homologue entre les sites attB flanquant le fragment et les sites attP du vecteur d'entrée. Le fragment d'intérêt va alors remplacer le gène toxique ccdB et le gène de résistance au chloramphénicol et la recombinaison aboutit à la formation de site attL, nécessaires pour la réaction LR. Ce plasmide pDONR223 contenant la séquence d'intérêt (= le clone d'entrée) peut alors être utilisé pour la transformation de bactéries. Les transformants sont sélectionnés par résistance à la spectinomycine. Le plasmide pourra alors être extrait à partir de cultures bactériennes liquides et être utilisé pour la réaction LR permettant l'incorporation de ce fragment d'ADN dans une multitude de vecteurs de destination différents par recombinaison homologue entre les sites attL du clone d'entrée et les sites attR de ce vecteur de destination (Figure 2.2), remplaçant le gène toxique ccdB et le gène de résistance au chloramphénicol par la séquence désirée. Ce vecteur de destination contenant le gène désiré (= le clone d'expression) peut alors servir à transformer des bactéries. Les transformants seront sélectionnés sur un milieu contenant de l'ampicilline et le plasmide pourra être extrait pour sa future utilisation. En pratique, les réactions BP/LR se font dans un volume de 5 µL contenant les éléments repris dans le tableau 2.1. Les deux réactions sont incubées 16h à température ambiante et sont arrêtées le lendemain par l'ajout de 1 µL de protéinase K suivi d'une incubation de 15 minutes à 37°C.

Tableau 2.1. Mélanges réactionnels pour les réactions BP et LR

Réaction BP	Réaction LR
<ul style="list-style-type: none">• 75-100 ng du fragments d'ADN d'intérêt• 75-100 ng du vecteur d'entrée (pDONR223)• 1 µL Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix• Ajout d'H₂O pour atteindre 5 µL	<ul style="list-style-type: none">• 75-100 ng du pDONR223 contenant l'insert• 75-100 ng du vecteur de destination• 1 µL Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix• Ajout d'H₂O pour atteindre 5 µL

Le fragment d'intérêt pourra également être transféré de nouveau dans le vecteur d'entrée à partir du vecteur de destination, par une réaction BP car il sera flanqué de sites attB dans le vecteur de destination (Figure 2.2).

Au cours de ce mémoire, la séquence encodant le triple mutant de FOXM1c au niveau de son domaine de liaison à l'ADN (FOXM1c DBD MT), fournie dans le plasmide pCMV6 (Barger *et al.*, 2019), a été clonée au sein du plasmide pdest1899 par cette méthode. Cette séquence a été flanquée des sites attB par la réalisation d'une PCR avec l'ADN polymérase Phusion (Phusion® HF DNA polymerase, New England BioLabs) avec les amorces DF2829 et DF2836 (Tableau 2.2). Les séquences soulignées représentent la partie de l'amorce qui s'apparie à la séquence encodant le triple mutant FOXM1c DBD MT dans le but de l'amplifier. La partie non soulignée de ces séquences va quant à elle permettre l'ajout des sites attB aux extrémités du produit de PCR. L'ADN polymérase Phusion présente une haute fidélité de réplication et une activité

correctrice (3' → 5' exonucléase), ce qui permet de minimiser au maximum les mutations dans le produit de PCR. La composition du mix de PCR et les étapes du thermocycleur sont repris dans les tableaux 2.3 et 2.4.

Tableau 2.2 Séquence des amorces DF2829 et DF2836

Amorces	Sens	Séquence
DF2829	Forward	5' – GGGGACAACCTTTGTACAAAAAGTTGGCATGAAAAGCTAGCCCCGTCG – 3'
DF2836	Reverse	5' – GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGACTGTAGCTCAGGAATAAACTGGGAC – 3'

Tableau 2.3. Composition du mix PCR Phusion en vue du clonage Gateway

Réactifs	Volume
Tampon Phusion HF 5x	10 µL
Mix dNTPs 10 mM	1 µL
Amorce Forward DF2829 10µM	2.5 µL
Amorce Reverse DF2836 10µM	2.5 µL
ADN polymérase Phusion	0.5 µL
Plasmide pCMV6 – FOXM1c DBD MT	1 pg – 10 ng
H ₂ O RF	jusqu'à 50 µL

Tableau 2.4. Étapes du thermocycleur pour la PCR Phusion

Étapes	Dénaturation initiale		Cycle de polymérisation (30 cycles)			Élongation finale		Stockage	
	Température	Temps	Étape	Température	Temps	Température	Temps	Température	Temps
	98°C	30s	Dénaturation	98°C	10s	72°C	5 min	4°C	∞
			Hybridation	57°C	30s				
			Élongation	72°C	1min30s				

II.3.2 Clonage en pN-MS2-CP

- Préparation du pN-MS2-CP linéarisé et déphosphorylé :

5 µg de pN-MS2-CP sont mis en présence de 10 µL de 10X FastDigest buffer, de 5 µL de FastDigest XhoI (5'-C/TCGAG-3'), de 5 µL de FastAP (AP = *Alkaline Phosphatase*). Le mélange réactionnel est complété avec l'ajout d'eau NF (*nuclease-free*) jusqu'à atteindre un volume de 100 µL. Le tout est alors incubé à 37°C durant 4h et la réaction est finalement stoppée en chauffant à 80°C durant 30 minutes.

- Préparation de l'insert FOXM1c DBD MT :

En vue de ce clonage, la séquence codante de ce triple mutant est une nouvelle fois amplifiée par PCR avec la polymérase Phusion à partir du pdest1899-FLAG-FOXM1c DBD MT, avec les amorces DF1382 et DF1383 (Tableau 2.5), dans le but de lui flanquer des sites de restrictions XhoI et permettre son insertion au sein du vecteur pN-MS2-CP préalablement linéarisé et déphosphorylé. La partie soulignée dans la séquence de ces

amorces reprises au niveau du tableau 2.5 représente le site de restriction de XhoI. La composition du mix de PCR et les étapes du thermocycleur sont repris dans les tableaux 2.4 et 2.6.

DF1382	Forward	5' - GCCCTCGAGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAA – 3'
DF1383	Reverse	5' - GCGCTCGAGCGCTCTAGATCACACCACTTTGTACAAGAAAG – 3'

Tableau 2.6. Composition du mix PCR Phusion en vue du clonage en pN-MS2

Réactifs	Volume
Tampon Phusion HF 5x	10 µL
Mix dNTPs 10 mM	1 µL
Amorce Forward DF2829 10µM	0.4 µL
Amorce Reverse DF2836 10µM	0.4 µL
ADN polymérase Phusion	0.5 µL
Plasmide pdest1899 – FOXM1c DBD MT	100 ng
H ₂ O RF	jusqu'à 50 µL

Le produit de PCR ainsi obtenu est mis en présence de 6 µL de 10x Tango buffer, de 2 µL d'H₂O NF et 2 µL de l'enzyme DpnI (Annexe 4, Tableau III). Le tout est incubé 1h à 37°C. L'enzyme DpnI reconnaît et clive le site de reconnaissance GA/TC lorsque celui-ci est méthylé au niveau de l'adénine (Gm6A/TC). Ensuite, 2 µL de l'enzyme de restriction FastDigest XhoI est ajouté. Le mélange réactionnel est alors incubé 10 à 15 minutes à 37°C. Le tout est alors mis sur gel d'agarose 1 %. La bande correspondante à l'insert est purifiée à l'aide du kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up », conformément au manuel d'utilisation. Il a donc fallu couper le gel afin de récupérer la bande désirée. Ce morceau de gel contenant la bande sera ensuite dissous dans du tampon NTI (200 µL/100 mg de gel). La solution qui en résulte est alors placée sur une colonne fournie avec le kit sur laquelle l'ADN va se lier. La colonne est alors centrifugée 30s à 11000g. Par après, la colonne est lavée avec 700 µL de tampon NT3. Elle est centrifugée 30s à 11000g et est séchée par centrifugation (1 minute à 11000g). Par après, 30 µL de tampon NE sont ajoutés et colonne est incubée 5 minutes à 70°C. Enfin, elle est éluée par centrifugation, permettant de récupérer le fragment d'ADN.

- Ligation

Enfin, la ligation de ce fragment au sein du pN-MS2-CP peut avoir lieu. Ainsi, 8 µL de l'insert est ajouté à 5 µL d'H₂O NF, 2 µL du plasmide pN-MS2-CP linéarisé avec XhoI et déphosphorylé, 4 µL de T4 buffer 5X et 1 µL de T4 ligase. Le tout est incubé *overnight* à RT. Le lendemain, le produit de ligation peut être utilisé pour la transformation bactérienne en vue de son amplification (si la transformation se réalise par électroporation,

une dialyse de 30-60 minutes est nécessaire afin d'éliminer les sels provenant des différents tampons utilisés et se trouvant dans le produit de ligation).

II.3.3 Transformation bactérienne

Une fois que la séquence désirée est insérée au sein du plasmide, des bactéries sont transformées dans le but d'amplifier celui-ci. Deux méthodes sont utilisées pour la transformation bactérienne : la transformation par choc thermique et l'électroporation. Dans la première, les bactéries *Escherichia coli DH5α* chimio-compétentes (40 µL) sont mises en présence du vecteur plasmidique (1 à 2 µL) dans des conditions stériles. Le tout est mis sur glace durant 15 minutes. Un choc thermique de 20s à 42°C est alors réalisé et les bactéries sont incubées sur glace pendant 1 minute et 30s. Ensuite, dans un environnement stérile, 1 mL de LB sans antibiotique est ajouté avant incubation des échantillons à 37°C sous agitation à 220 rpm durant 1h. Les bactéries *Escherichia coli DH5α* électro-compétentes (40 µL), quant à elles, sont mises en présence de 1 à 2 µL de vecteur plasmidique au sein de cupules d'électroporation dans des conditions stériles. Ces dernières permettent de soumettre les bactéries au champ électrique généré par l'électroporateur (voltage : 2 kV). Les bactéries sont ensuite récupérées dans un environnement stérile avec 1 mL de LB liquide. Celles-ci sont alors mises en culture à 37°C sous agitation à 220 rpm pendant 1h.

Cette phase d'incubation d'1h présente dans les deux méthodes permet une multiplication des bactéries qui sont, ensuite, centrifugées 5 minutes à 3500g. Elles sont alors resuspendues dans 50 à 100 µL de LB et étalées sur des boîtes de Pétri LB-agar supplémenté de 50 µg/mL de spectinomycine ou de 100 µg/mL d'ampicilline (en fonction du plasmide) permettant la sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide. Elles sont incubées 16h à 37°C.

II.3.4 Stock de glycérol

Avant l'extraction des plasmides, un stock de glycérol est réalisée. Le but de cette manœuvre est de pouvoir remettre les bactéries en culture rapidement lorsque le stock de plasmide est épuisé. En pratique, dans des conditions stérile, un échantillon est prélevé hors de la culture bactérienne liquide et est mélangé à du glycérol 100 %, jouant le rôle de cryoprotectant, en proportion 1:1. Le tube est alors inversé 2-3 fois afin d'homogénéiser le tout et est ensuite laissé sur glace en attendant de le placer le plus rapidement possible à -80°C.

II.3.5 Extraction de plasmides

L'extraction de plasmide, c'est-à-dire la purification de l'ADN plasmidique, a été réalisée à l'aide du kit « NucleoSpin® Plasmid EasyPure » ou du kit « NucleoBond® Xtra Midi » de Macherey-Nagel, choisi en fonction du volume de la culture bactérienne (2 mL de culture bactérienne pour le premier kit et jusqu'à

200 mL pour le second) et conformément aux instructions fournies par le fabricant. Le but de ces kits est de récupérer l'ADN plasmidique à partir des cultures bactériennes afin de pouvoir l'utiliser dans diverses expériences.

Dans le premier kit, les cellules bactériennes sont culottées par centrifugation (5 minutes à 8000g à température ambiante) et sont resuspendues dans 150 µL de tampon A1 contenant notamment de la RNase A. Ensuite, 250 µL de tampon A2 SDS/alcalin sont ajoutés. Les tubes sont alors inversés 5 fois et incubés 2 minutes à température ambiante. Cette étape permet la lyse des cellules bactériennes. Les protéines et l'ADN (chromosomique et plasmidique) sont dénaturés dans ces conditions. Un troisième tampon, le tampon de neutralisation A3, est ajouté (350 µL) et va permettre de précipiter l'ADN chromosomique, les protéines ainsi qu'une grande partie des débris cellulaires et fournir, après une centrifugation de 5 minutes à vitesse maximale, un surnageant translucide contenant l'ADN plasmidique. Ce surnageant est prélevé et placé sur la colonne « NucleoSpin® Plasmid EasyPure Column », une résine de silice échangeuse d'anions. Ce tampon crée également les conditions nécessaires pour l'adhérence de cet ADN plasmidique à celle-ci. La colonne est alors centrifugée 30s à 2000g. Elle est ensuite lavée avec 450 µL de tampon AQ permettant d'éliminer les contaminants comme les sels ou les métabolites, séchée par centrifugation 1 minute à vitesse maximale et éluée avec 50 µL d'eau NF ou de tampon AE.

Le deuxième kit, quant à lui, a été utilisé pour une culture bactérienne de 100 mL. Dans un premier temps, les cellules bactériennes sont culottées par centrifugation (15 minutes à 6000g à 4°C) et sont resuspendues dans 8 mL de tampon de resuspension RES contenant notamment de la RNase A. Ensuite, 8 mL du tampon de lyse SDS/alcalin LYS sont ajoutés. Les tubes sont inversés 5 fois et incubés 5 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, la colonne « NucleoBond® Xtra Column » ainsi que le filtre sont équilibrés avec 12 mL de tampon EQU. Une fois les 5 minutes d'incubation passées, 8 mL de tampon de neutralisation NEU est ajouté au lysat et permet la précipitation de l'ADN chromosomique, des protéines ainsi qu'une grande partie des débris cellulaires. En s'assurant que la suspension du précipité est homogène, la suspension est chargée sur le filtre équilibré. Le lysat est à la fois nettoyé par le filtre qui retient le précipité et chargé sur la colonne de silice. Ce tampon NEU crée également les conditions nécessaires pour l'adhérence de l'ADN plasmidique à la colonne. Un lavage de cette dernière et du filtre est alors réalisé avec 5 mL de tampon EQU. Le filtre peut dès lors être retiré et un deuxième lavage de la colonne est effectuée avec 8 mL de tampon WASH. Ensuite, le plasmide est élué avec 5 mL de tampon d'éluion ELU. Le plasmide est ensuite concentré de la manière suivante : 3.5 mL d'isopropanol sont ajoutés au 5 mL de plasmide élué dans le but de le précipiter. Le mélange est vortexé, centrifugé 30 minutes à 15000g à 4°C. Le surnageant peut être jeté tandis que 2 mL d'éthanol 70 % sont ajoutés à ce précipité. Une centrifugation de 5 minutes à

15000g à température ambiante est ensuite réalisée. L'éthanol est alors retiré et le précipité d'ADN plasmidique est séché à température ambiante durant 10-15 minutes. Ce dernier est resuspendu dans un volume approprié d'eau stérile ou de tampon TE.

La quantité d'ADN plasmidique ainsi récoltée lors de l'utilisation de ces deux kits peut être dosée à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific).

II.3.6 Vérification de la construction

Les bactéries ayant été sélectionnées sur milieu LB supplémenté d'un antibiotique peuvent contenir un plasmide possédant la séquence d'intérêt dans une mauvaise orientation ou possédant un insert avec des mutations non désirées incorporées lors de la PCR.

Il est donc nécessaire de s'assurer que la construction soit correcte avant toute utilisation du plasmide lors d'expériences. Pour ce faire, différentes méthodes ont été utilisées :

- La digestion du plasmide par des enzymes de restriction.

Cette méthode sert à vérifier la construction plasmidique contenant l'insert, et plus précisément à vérifier l'orientation de cet insert. Elle consiste en la digestion des plasmides extraits par des enzymes de restriction, des endonucléases séquences spécifiques, coupant le plasmide au niveau de sites précis. Pour ce faire, le plasmide, environ 500 ng, est mis en présence de 0.5 à 2 μ L de l'enzyme de restriction dans 2 μ L de tampon 10x concentré adéquat (Annexe 4, Tableau III). De l'eau NF est alors ajoutée jusqu'à atteindre 20 μ L de mélange réactionnel. Celui-ci est alors incubé au minimum 1h à 37°C. La taille des fragments générés pourra ensuite être observés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %.

- Le séquençage

Après la réalisation d'une PCR Phusion, une vérification de l'insert par séquençage est nécessaire afin de s'assurer que sa séquence ne contient pas de mutations incorporées par l'ADN polymérase lors de l'étape de PCR. Ainsi, les plasmides pDONR223 et pN-MS2-CP contenant la séquence encodant le triple mutant sont envoyés au séquençage afin de la valider. Les échantillons envoyés au séquençage sont composés de 10 μ L de plasmide contenant l'insert, à une concentration de 40 à 50 ng/ μ L, et de 10 μ L d'amorce 5 μ M (Tableau 2.7). Celui-ci est réalisé par la plateforme séquençage du GIGA.

Tableau 2.7. Séquences des différentes amorces utilisées pour le séquençage

Amorces	Sens	Séquence
DF1386	<i>Forward</i>	5' – CTAAAGTGGCAACCCAGACTGTTGG – 3'
DF1387	<i>Reverse</i>	5' – GGAGGGGCAAACAACAGATGGC – 3'
DF756	<i>Forward</i>	5' – TCCCAGTCACGACGTTGTAA – 3'
DF757	<i>Reverse</i>	5' – GTAATACGACTCACTATAGG – 3'
DF2636	<i>Forward</i>	5' – CTGCACTATCAACAATAGCC – 3'
DF2637	<i>Reverse</i>	5' – TCTTAAAAGGTCTCCCACT – 3'

II.4 Culture cellulaire

Les cellules HEK293 utilisées dans le cadre de ce mémoire sont cultivées à 37°C dans une atmosphère ayant une teneur de 5 % en CO₂ dans du milieu DMEM complété avec 10 % de FBS. Ces cellules sont « passées » deux fois par semaine afin de renouveler le milieu et de conserver la confluence désirée. Pour ce faire, le milieu de culture (± 20 mL) est retirée et les cellules sont lavées avec 10 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Cette solution est isotonique pour les cellules permettant de leur éviter un stress osmotique. Ensuite, 2 mL d'une solution de trypsine-EDTA (*Biowest*) sont ajoutés sur les cellules entraînant une perte d'adhésion des cellules entre elles et avec le support, ce qui permet de les détacher et de les isoler. La boîte contenant les cellules et cette solution de trypsine-EDTA est incubées 5 minutes à 37°C. Par après, 8 mL de milieu DMEM supplémenté de FBS est ajouté. La suspension de cellules de 10 mL est alors récupérée. Une partie est remise dans la boîte (1 mL lors d'un passage 1/10) et 20 mL de milieu de culture sont alors ajoutés. Les cellules sont alors replacées dans l'incubateur à 37°C avec une teneur en CO₂ de 5 %.

II.5 Transfection au phosphate calcique

Le principe de la transfection est d'introduire un ou plusieurs vecteurs d'expression génique dans des cellules eucaryotes ce qui permettra d'exprimer une protéine exogène ou de surexprimer une protéine d'intérêt.

Cette méthode de transfection au phosphate calcique se base sur la combinaison d'une solution de chlorure de calcium (CaCl₂) et d'une solution d'HBS 2x (HBS : *HEPES-buffered saline*) contenant des ions phosphates, permettant la formation de précipités de phosphate calcique. Ces derniers lient l'ADN et peuvent être incorporés dans la cellule eucaryote par endocytose. Cette méthode de transfection a été utilisée pour la transfection de cellules HEK293 (± 2x10⁶ cellules) en vue de la réalisation de co-immunoprécipitation (co-IP). En pratique, un total de 10 µg d'ADN plasmidique, à raison de 5 µg par type de plasmide, est dilué dans de l'eau stérile pour atteindre un volume de 200 µL (Tableau 2.8). Le mélange est vortexé puis centrifugé

brièvement afin de « concentrer » la solution au fond de l'éppendorf. Ensuite, un volume équivalent (200 µL) d'une solution de CaCl₂ 1M (Sigma) est ajouté goutte à goutte et le mélange obtenu est alors homogénéisé en vortexant 10s suivi d'une courte centrifugation. Par après, 400 µL de la solution de HBS 2x sont alors ajoutés goutte à goutte. Le tout est uniformisé en pipetant 5 fois et est incubé 20 minutes à température ambiante. Enfin, les 800 µL sont ajoutés goutte à goutte aux cellules à transfecter. Le milieu de culture est alors changé 16h à 24h après la transfection car la solution de transfection peut avoir des effets cytotoxiques.

Tableau 2.8. ADN transfectés pour les co-IP

Plasmide 1	Plasmide 2	Plasmide 3
5 µg pdest475-HA-STAU1	5 µg pdest1899-FLAG vide	
5 µg pdest475-HA-STAU1	5 µg pdest-1899-FLAG-FOXM1 WT	
5 µg pdest475-HA-STAU1	3.5 µg pdest1899-FLAG-FOXM1ΔDBD	1.5 µg pdest1899-FLAG vide
5 µg pdest475-HA-STAU1	5 µg pdest1899-FLAG-FOXM1c DBD MT	

II.6 Co-immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation est une méthode utilisée afin de déterminer si deux protéines interagissent ensemble de façon directe ou indirecte. Pour ce faire, environ 2x10⁶ cellules HEK293 ont été transfectées au phosphate calcique au sein de boîtes de culture de 10 cm de diamètre (surface : ± 55 cm²) avec 5 µg de chaque plasmide ou des quantités ajustées (Tableau 2.8). Deux jours plus tard, ces cellules sont lavées 3 fois au PBS froid et récupérées par centrifugation (5 minutes à 1000g et à 4°C). Les cellules sont alors resuspendues dans 800 µL de tampon de lyse IPLS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, d'EDTA 0.5 mM pH 8, de 0.5 % (v/v) du détergent NP-40, de 10 % (v/v) de glycérol, de NaCl 120 mM) supplémenté d'un inhibiteur de protéases (cOmplete Protease Inhibitor ; Roche[®]) et d'un inhibiteur de phosphatases (Halt Phosphatase Inhibitors ; Thermo Scientific), et sont lysées 30 minutes sur roue à 4°C. Une centrifugation à 10000g à 4°C pendant 10 minutes est ensuite réalisée afin d'éliminer les déchets cellulaires. Le surnageant est alors conservé et divisé en 2 : 50 µL pour les *input* pour le western blot et 700 µL pour la co-IP.

Pendant ce temps, les billes d'agarose couplée à un anticorps anti-FLAG (billes d'agarose M2 anti-FLAG ; *Sigma Aldrich*) à leur surface peuvent être préparées, à raison de 15 µL par boîte de culture de 10 cm. Celles-ci sont lavées 3 fois à l'IPLS afin d'éliminer le glycérol dans lequel elles étaient conservées. Entre chaque lavage, les billes sont récupérées par centrifugation (30s à 1500g à 4°C). Les billes sont alors resuspendues dans de l'IPLS et 30 µL de ce mix billes – tampon de lyse IPLS sont alors ajoutés dans chaque fraction prévue pour les co-IP. Le mélange est incubé 2h sur roue à 4°C. Une centrifugation de 30s à 4°C à 1500g est alors réalisée.

Le surnageant est éliminé et les co-IP subissent 4 lavages successifs : 1x avec 700 μ L d'IPLS, 1x avec 700 μ L d'IPLS avec une concentration en NaCl de 310 mM 2x avec 700 μ L d'IPLS. Une centrifugation de 30s à 1500 g à 4°C est effectuée après chaque lavage et le surnageant est éliminé. Les co-IP sont finalement resuspendues dans 30 μ L de bleu de chargement 2x (Tris-HCl 12.5 mM pH 6.8, SDS 4 % (w/v), glycérol 20 % (v/v), β -mercaptoéthanol 5 % et bleu de bromophénol 0,0003 % (w/v)) tandis que les *input* sont resuspendus dans du bleu de chargement de manière à ce qu'ils représentent 1 % de l'immunoprécipitation correspondante. Les *input* et les co-IP peuvent alors conservées à -20°C jusqu'au moment de la réalisation d'un western blot.

II.7 Western Blot

Le Western Blot est une technique de biologie moléculaire permettant de séparer les protéines selon leur taille via une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE), de les détecter et de les identifier, après transfert sur une membrane de nitrocellulose, à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre ces protéines ou contre un tag dont elles peuvent être munies. Dans un premier temps, un gel de polyacrylamide est préparé et est composé de deux parties : un gel de concentration 4 % et un gel de séparation dont le pourcentage va varier selon la taille des protéines à séparer (Annexe 6, Tableau V). Le gel doit polymériser environ 30 minutes et est alors placé dans la cuve de migration avec du tampon de migration 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8.8 ; glycine 200 mM; SDS 10 % (w/v)).

Avant de les charger sur gel, les échantillons placés dans du bleu de chargement 2x, sont soniqués 5 minutes à 4°C (30s-30s) afin d'éviter qu'ils soient trop visqueux, chauffés 5 minutes à 95°C afin de s'assurer que les protéines soient bien dénaturées et centrifugés (*short spin*). Ils sont alors chargés sur le gel, immergé dans le tampon de migration 1x, entre deux échelles de poids moléculaires *PageRuler Prestained Protein Ladder* de *Thermofisher*. La migration peut alors débuter, à 40 mA/gel durant 1h.

Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose 0.2 μ m (GE Healthcare). Pour ce faire, le gel et la membrane sont compressés dans une cassette avec des éponges et du papier absorbant qui est placée dans une cuve remplie de tampon de transfert (Tris 25 mM; Glycine 192 mM; méthanol 10 %). Ce transfert se déroule à 100 V durant 90 minutes.

La membrane de nitrocellulose est alors récupérée et placée dans environ 10 mL de tampon de saturation (TBS-T : Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 15 mM, Tween 0,1 % ; lait écrémé en poudre 5% (w/v)) pendant 1h sous agitation. Par après, la membrane est incubée sous agitation 16h à 4°C ou 1h à RT avec l'anticorps primaire (Annexe 2, Tableau I) dilué dans la solution de saturation (TBS-T – lait 5 % ou BSA 4%). Elle est ensuite lavée 3 fois 10 minutes sous agitation avec la solution de lavage TBS-T et peut alors être incubée pendant 1h à RT sous agitation, avec l'anticorps secondaire (Annexe 2, Tableau II) couplé à la peroxydase de

raifort (HRP = *Horseradish Peroxidase*), dilué dans une solution de TBS-T – lait 5 % ou BSA 4 %. La membrane est une nouvelle fois lavée 3 fois avec du TBS-T (10 minutes/lavage sous agitation) et les complexes antigène-anticorps qui s’y trouvent peuvent être révélés grâce au kit de révélation, composé de 3 solutions : 1 mL de solution A (200 mL Tris-HCl 0.1 M pH 8.6, 50 mg de Luminol), 100 µL de solution B (DMSO 10mL, 11 mg d’acide para-hydroxycoumarin) et 1 µL de solution C (H2O2 35 %). Cette révélation s’effectue par chimiluminescence produite lors de l’ajout du substrat de la HRP. Le signal lumineux est perçu à l’aide de l’*ImageQuant LAS 4000 Luminescent Image Analyser* (GE Healthcare).

Enfin, lorsque la révélation de la membrane nécessite d’être effectuée en deux temps, la membrane subit une étape de stripping après la première révélation. Celle-ci a pour but d’enlever les premiers anticorps et de pouvoir incuber celle-ci avec un nouvel anticorps primaire. Pour ce faire, la membrane est incubée 30 minutes à 55°C dans le tampon de stripping (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7, SDS 2%, β-mercaptoéthanol 0,007%). La membrane est ensuite lavée 4 à 5 fois 5-10 minutes et bloquée ensuite dans du TBS-T – lait 5 %. La membrane peut alors être incubée avec le deuxième anticorps primaire.

II.8 RNA-Seq et ChIP-Seq

Ces deux expériences n’ont pas été effectuées au cours de ce mémoire mais les données qui en découlent ont été utilisées dans la partie III. Résultats & Discussions. Elles sont donc brièvement abordées dans cette rubrique afin de mieux visualiser comment elles ont été réalisées.

Précédemment à ce mémoire, un RNA-sequencing a été réalisé en vue d’identifier les cibles de FOXM1 dans le processus de dégradation des ARNm. Il s’agit d’une technique utilisant le séquençage à haut débit (NGS : *Next Generation Sequencing*) en vue d’identifier et de quantifier l’ARN au sein d’un échantillon biologique à un moment donné, correspondant au transcriptome de la cellule/de la population de cellules à ce moment (Chu & Corey, 2012; Zhong Wang *et al.*, 2009). Cette technique permet également de visualiser l’évolution du transcriptome sous différentes conditions et/ou différents traitements, et donc, de mettre en avant une expression différentielle des gènes en fonction de ces différentes conditions et/ou de ces différents traitements (Zhong Wang *et al.*, 2009). Dans le cadre de l’étude du rôle du facteur de transcription FOXM1 dans la dégradation des ARNm, cette expérience a été réalisée, en triplicat, en vue de comparer le transcriptome de cellules HeLa transfectées avec un siCtrl (condition contrôle) ou un siFOXM1 (condition *FOXM1-depleted*) dans des conditions de blocage transcriptionnel par l’actinomycine D (5µM) durant 0, 1, 2 et 4h. Directement après ces traitements, les cellules sont collectées et les ARN sont extraits de celles-ci. L’efficacité de la déplétion engendrée par le siRNA a été vérifiée par SDS-PAGE et western blotting (Mariavelle, 2019) tandis que l’efficacité du traitement à l’actinomycine D est vérifiée par RT-qPCR en

utilisant des ARNm connu pour être stables et instables. La qualité de l'ARN a été évaluée par la plateforme « *Genomics* » du GIGA. Cette dernière a également confectionné des bibliothèques de cDNA à partir de ces ARN en vue de leur séquençage à haut-débit avec le séquenceur Illumina Nextseq500. Les *reads* générés lors de ce séquençage ont alors pu être alignés sur le génome humain de référence hg19. Cela a permis de déterminer l'expression différentielle des gènes entre les conditions contrôle et *FOXM1-depleted*.

Pour les analyses de la dégradation des ARNm, le niveau d'expression des transcrits est normalisé à chaque *time point* en utilisant la moyenne géométrique de trois transcrits stables (GAPDH, RPL32 et NDUFA12). Ces niveaux d'expression normalisés ont ensuite été ajustés à une décroissance exponentielle en utilisant la procédure d'ajustement des moindres carrés pour pouvoir calculer un temps de demi-vie pour chaque ARNm.

Le CHIP-Seq se base sur le séquençage par des méthodes de séquençage à haut débit (NGS) de fragments immunoprécipités de chromatine en vue d'obtenir leur séquence, dans le but d'établir le profil génomique des protéines liant l'ADN, des modifications épigénétiques et des nucléosomes (P. J. Park, 2009). Cette technique permet donc d'étudier les interactions ADN-protéines, ce qui est utile pour comprendre le réseau de régulation des gènes, notamment en identifiant les gènes cibles d'un facteur de transcription spécifique. Les données de CHIP-Seq utilisées dans le cadre de ce mémoire proviennent de l'équipe de (Grant *et al.*, 2013). Pour ce faire, des cellules HeLa sont fixées au formaldéhyde afin de fixer les liaisons ADN-protéine, avant d'être soniquées dans le but de produire des fragments d'ADN de 200 à 600 pb. Ceux-ci sont alors incubés avec des billes couplées à un anticorps anti-FOXM1 durant 18h à 4°C afin d'immunoprécipiter ces fragments d'ADN. L'ADN lié à ces billes est ensuite lavé et les complexes purifiés sont chauffés pour annuler la fixation par le formaldéhyde permettant de récupérer l'ADN sans les protéines. Ces fragments d'ADN ont alors pu être séquencés en utilisant un Illumina Genome Analyzer II (Grant *et al.*, 2013). Les données brutes des deux réplicats réalisés sont disponibles sur le site GEO au numéro d'accèsion GSE52098 (url : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE52098>). Les *reads* obtenus ont été alignés sur le même génome de référence hg19 que celui utilisé pour aligner les *reads* générés lors du RNA-sequencing.

II.9 Bioinformatique

Lors de l'analyse du RNA-Seq et du CHIP-seq, un diagramme de Venn a été confectionné grâce à l'outil bioinformatique « *Calculate and draw custom Venn diagrams* » disponible sur le site « *Bioinformatics & Evolutionary Genomics* » de l'université de Gand (url : <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

III. Résultats & Discussion

III. Résultats & Discussion

III.1 FOXM1 dans la dégradation des ARNm

Des études récentes ont montré que les facteurs de transcription présentent certains rôles au niveau de processus post-transcriptionnels, notamment dans la dégradation des ARNm (Cho *et al.*, 2015; Moon *et al.*, 2018; Rambout *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016).

Initialement, le but du projet dans lequel ce mémoire s'inscrit était de démontrer que le contrôle de la dégradation des ARNm est une nouvelle fonction jusque-là insoupçonnée partagée par les facteurs de transcription. Ainsi, 33 facteurs de transcription ont été testés afin d'examiner s'ils jouent potentiellement un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle d'une luciférase rapporteur lorsqu'ils sont recrutés sur la région 3'UTR de son ARNm. Pour ce faire, un test d'activité de la luciférase a été effectué et le recrutement du facteur de transcription FOXM1 sur la région 3'UTR de l'ARNm de la luciférase affecte le niveau d'activité mesuré (l'activité mesurée est plus faible par rapport à la condition contrôle). Ce test indique que FOXM1 intervient dans la régulation de l'activité de la luciférase quand il est recruté sur la région 3'UTR de son ARNm mais l'effet exact du recrutement de FOXM1 sur cet ARNm a du être investiguer. C'est pour cette raison que l'expérience de *MS2-tethering degradation assay* a été effectuée. Il s'agit d'une expérience de biologie moléculaire ayant pour but d'évaluer l'impact d'une protéine sur la stabilité d'un ARNm rapporteur lorsqu'elle est recrutée sur celui-ci (Rambout *et al.*, 2016). Elle utilise la protéine de capsid du bactériophage MS2 (MS2-CP) et sa capacité à se lier au niveau d'une séquence d'ARN spécifique. Ainsi, lorsqu'une protéine est fusionnée avec la protéine MS2-CP, elle peut être recrutée au niveau d'un ARNm rapporteur possédant ce site de liaison de la protéine MS2 (Barreau *et al.*, 2006). Via cette expérience, FOXM1 montre un impact sur la stabilité de l'ARNm de cette luciférase rapporteur lorsqu'il est recruté sur sa région 3' UTR (Figure 3.11) (Mariavelle, 2017, 2019).

Par ailleurs, des expériences *d'oligo(dT) pulldown* ont été réalisées. Il s'agit d'une technique de biologie moléculaire qui permet de détecter si une protéine interagit avec l'ARNm. Le principe est de fixer les interactions ARN-protéine soit les interactions ARN-protéine et protéine-protéine au niveau de cellules, de lyser ces cellules, de purifier les ARNm présent dans le lysat cellulaire à l'aide de billes magnétiques oligo(dT) et de détecter ou non la protéine par western blot afin de déterminer si elle interagit, directement ou indirectement, ou non avec l'ARNm (Rambout *et al.*, 2016). Cette expérience a permis de déterminer que FOXM1 s'associe indirectement avec l'ARNm au sein des complexes ribonucléoprotéiques messagers (Mariavelle, 2017, 2019).

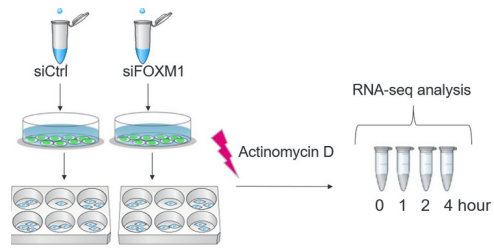


Figure 3.1. Schéma expérimental de l'expérience de *RNA-sequencing* (Mariavelle, 2019)

De plus, il a été mis en évidence par co-immunoprécipitation que FOXM1 interagit directement ou indirectement avec la protéine de liaison à l'ARN STAU1 (Mariavelle, données non publiées), intervenant dans la voie de dégradation SMD (*Staufen-mediated mRNA decay*).

Tous ces résultats suggèrent que FOXM1 pourrait également jouer un rôle dans la régulation de la dégradation des ARN messagers en plus de son rôle dans la transcription des gènes.

III.2 CHIP-Seq et RNA-Seq

Précédemment à ce mémoire, un *RNA-sequencing* a été réalisé en vue d'identifier les cibles de FOXM1 dans le processus de dégradation des ARNm. Pour rappel, le *RNA-sequencing* ou séquençage de l'ARN est une technique utilisant le séquençage à haut débit (NGS : *Next Generation Sequencing*) en vue d'identifier et de quantifier l'ARN, au sein d'un échantillon biologique à un moment donné, ce qui correspond au transcriptome de la cellule ou de la population de cellules à ce moment (Chu & Corey, 2012; Zhong Wang *et al.*, 2009). Cette technique permet également de visualiser l'évolution du transcriptome sous différentes conditions et/ou différents traitements, et donc, de détecter une expression différentielle des gènes en fonction de ces différentes conditions/traitements (Zhong Wang *et al.*, 2009). Cette fonctionnalité se trouve être intéressante dans le cadre de l'étude de l'impact d'un facteur de transcription sur la dégradation de l'ARNm au sein de la cellule, en permettant l'identification de ses ARNm cibles. Ainsi, dans le cadre de l'étude du rôle de FOXM1 dans la dégradation des ARNm, cette expérience de *RNA-sequencing* en vue de comparer le transcriptome de cellules HeLa transfectées avec un siCtrl (condition contrôle) ou un siFOXM1 (condition *FOXM1-depleted*) dans des conditions de blocage transcriptionnel par l'actinomycine D durant 0, 1, 2 et 4h (Figure 3.1). Le séquençage des ARNm extraits de ces cellules dans ces deux conditions et aux différents temps de traitement permet :

- d'observer un changement dans la quantité de certains ARNm entre la condition contrôle et la condition *FOXM1-depleted* au temps zéro ;
- d'évaluer la diminution de l'abondance des ARNm au cours du temps, lorsque la transcription est inhibée par le traitement à l'actinomycine D, permettant ainsi de détecter un changement au niveau de la stabilité de certains ARNm entre ces deux mêmes conditions. Ce changement de stabilité des ARNm est observable via le changement du temps de demi-vie de ces derniers entre la condition contrôle et la condition *FOXM1-depleted*.

Avec cette approche, les ARNm dont les temps de demi-vie ont été augmentés significativement en absence de FOXM1 (FoldChange > 1.5) sont considérés comme cibles de FOXM1 dans le processus de dégradation des ARNm.

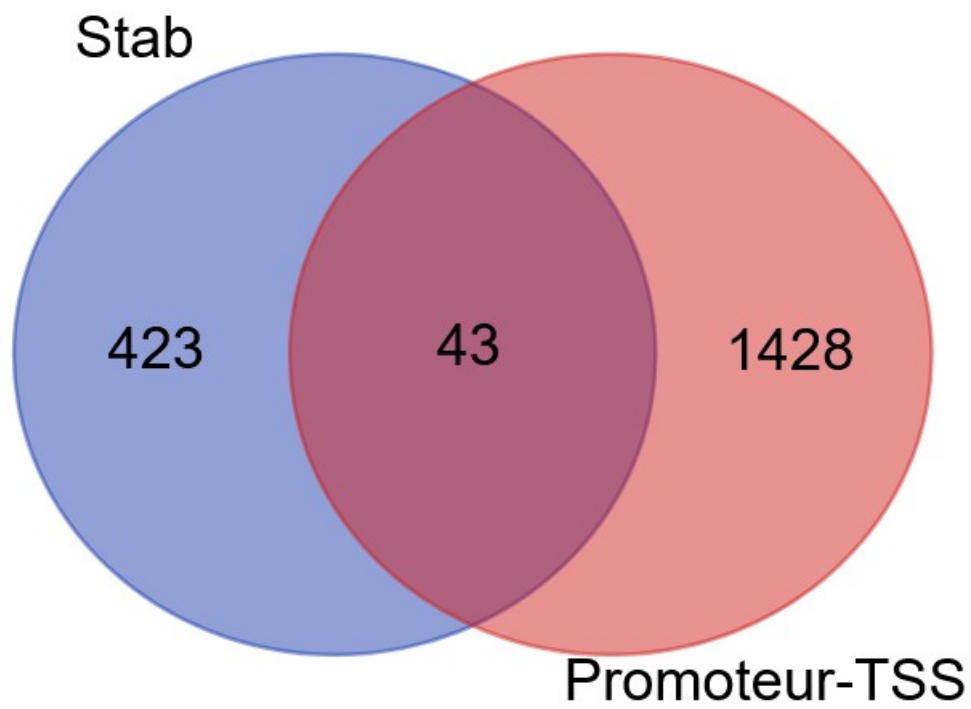


Figure 3.2. Diagramme de Venn représentant le chevauchement entre l'ensemble « Promoteur-TSS » correspondant aux cibles transcriptionnelles supposées de FOXM1 et l'ensemble « Stab » correspondant aux cibles de FOXM1 dans le processus de dégradation des ARNm.

Ainsi, 466 gènes ont montré une augmentation significative du temps de demi-vie de leur transcrit et donc une stabilisation de ceux-ci dans la condition *FOXM1-depleted* par rapport à la condition contrôle. Par conséquent, ils sont considérés comme cibles de FOXM1 dans le processus de dégradation des ARNm.

Afin de commencer à discuter la question « La fonction de FOXM1 dans la dégradation de l'ARNm est-elle liée à ses fonctions transcriptionnelles ? », ces données obtenues par *RNA-sequencing* ont été confrontées aux données de CHIP-Seq de FOXM1 provenant d'une étude réalisée par une autre équipe (Grant *et al.*, 2013).

Pour rappel, le CHIP-Seq utilise les méthodes de séquençage à haut débit (NGS) de fragments immunoprécipités de chromatine en vue d'obtenir leur séquence, dans le but d'établir le profil génomique des protéines liant l'ADN, des modifications épigénétiques et des nucléosomes (P. J. Park, 2009). Cette technique permet donc d'étudier les interactions ADN-protéines, ce qui est utile pour comprendre le réseau de régulation des gènes, notamment en identifiant les gènes cibles d'un facteur de transcription spécifique. Lors de l'étude effectuée par (Grant *et al.*, 2013), l'expérience de CHIP-Seq de FOXM1 a été réalisée en deux réplicats au sein de la même lignée cellulaire que celle utilisée pour le RNA-Seq, à savoir les cellules HeLa. Le premier a fourni 17.1 millions de *reads* tandis que 17 millions de *reads* résultent du second. Les données brutes ont ensuite été réanalysées dans le cadre de ce projet de thèse concernant FOXM1. Il résulte de ces deux réplicats respectivement 9145 et 3853 *peaks*, régions riches en *reads* alignés correspondant aux endroits où FOXM1 interagit avec l'ADN (= sites de liaisons de l'ADN). Ces *peaks* sont associés à respectivement 6814 et 3351 gènes différents et sont retrouvés au niveau des régions annotées promoteur-TSS (*Transcription Starting Site*) mais également au niveau des régions intergéniques, des introns, des exons et des régions TTS (*Transcription Termination Site*). Parmi ceux-ci, 2288 gènes sont communs aux deux réplicats (les gènes où FOXM1 se lie plusieurs fois, au niveau de régions différentes, ne sont comptés qu'une seule fois). En se concentrant sur les *peaks* au niveau des régions annotées promoteur-TSS, on restreint ces *peaks* à ceux se trouvant au niveau des régions promotrices et des sites de démarrage de la transcription et donc susceptible d'intervenir dans la transcription des gènes associés à ces *peaks*. Ainsi, avec cette « restriction », on peut dénombrer respectivement 5137 et 2438 *peaks* pour les deux réplicats, associés à respectivement 4545 et 2273 gènes différents. Les gènes communs entre les deux réplicats, au nombre de 1471, sont alors considérées comme les cibles transcriptionnelles de FOXM1.

Ces 1471 gènes communs sont dès lors confrontés aux 466 gènes dont l'ARNm est stabilisé au sein de cellules HeLa en absence de FOXM1. Un diagramme de Venn a été confectionné afin de visualiser le chevauchement de ces deux ensembles (Figure 3.2). Il résulte de cette analyse que 43 gènes sont à la fois des cibles transcriptionnelles de FOXM1 et des cibles de FOXM1 dans le processus de dégradation des

ARNm, ce qui représente environ 10 % des 466 gènes qui ont montrés une augmentation de stabilité en absence de FOXM1, tandis que les 423 autres ne semblent pas être sous le contrôle transcriptionnel de FOXM1. Cette analyse semble suggérer une indépendance du rôle de FOXM1 dans le processus de dégradation des ARNm par rapport à son rôle dans la transcription des gènes.

Cependant, il est possible de remarquer qu'une différence assez importante entre le nombre de peaks résultant des deux réplicats du CHIP-Seq (9145 *peaks* pour le premier réplicat contre 3853 pour le deuxième). Cette différence de nombre de *peaks* est également observable en les restreignant à ceux annotés « promoteur-TSS » : 5137 *peaks* pour le premier réplicat contre 2438 pour le second. Cela peut nous laisser penser que l'immunoprécipitation s'est moins bien déroulée dans le deuxième réplicat. Ainsi, vu que l'on ne considère que les éléments communs aux deux réplicats pour les confronter aux données du RNA-Seq, il se pourrait que l'on passe à côté de certains éléments où FOXM1 se lie (notamment au niveau des régions promoteur-TSS) et qui pourraient également être des cibles de FOXM1 dans le processus de dégradation des ARNm. Ce nombre d'éléments « manqués » pourrait être réduit via la réalisation de trois réplicats lors du CHIP-Seq et la considération d'éléments communs à au moins deux de ces trois réplicats.

Un nouveau CHIP-Seq a été réalisé, en triplicat, dans le cadre du projet de thèse concernant le rôle de FOXM1 dans la dégradation des ARNm et est toujours en cours d'analyse. Les données qui seront obtenues par celui-ci pourront être comparées aux données obtenues lors de la réanalyse du CHIP-Seq de (Grant *et al.*, 2013). Ces données nouvellement générées pourront également être confrontées à celles obtenues par RNA-Seq, de la même manière que décrite précédemment afin de voir si cela confirme, ou non, la première conclusion générée, à savoir l'indépendance du rôle de FOXM1 dans la dégradation des ARNm par rapport à son rôle de facteur de transcription.

III.3 FOXM1c DBD MT : Clonage et expériences

De l'analyse des données de CHIP-Seq et de RNA-Seq, il semble découler comme première conclusion que la fonction de FOXM1 dans la dégradation des ARNm ne semble pas être liée à sa fonction dans la transcription des gènes. Cette première conclusion se doit d'être confirmée par d'autres expériences qui vont mettre en jeu un mutant de FOXM1c au niveau de son DBD, où les résidus Arginine 286 (Arg-286), Histidine 287 (His-287) et Sérine 290 (Ser-290), essentiels pour la liaison de FOXM1 à l'ADN, sont remplacés par des résidus Alanine (Ala) (Barger *et al.*, 2019). Ce mutant se retrouve donc dans l'incapacité de lier l'ADN et, par conséquent, de jouer son rôle de facteur de transcription.

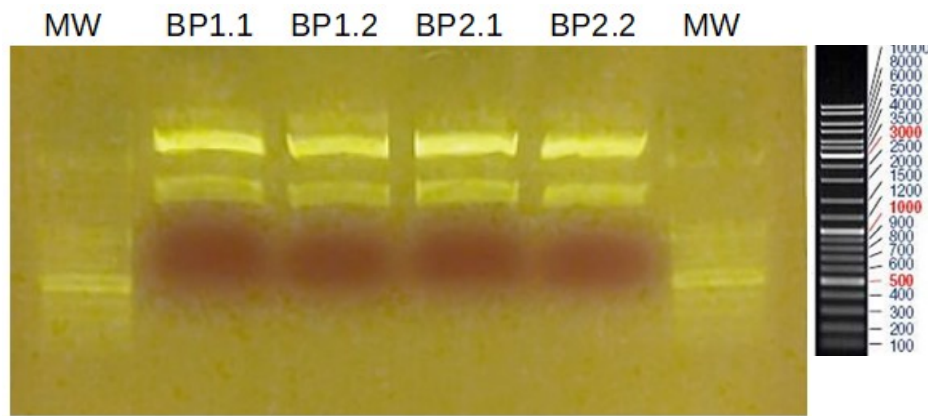


Figure 3.3. Gel d'agarose de la digestion par NheI (G/CTAGC) du pDONR223-FOXM1c DBD MT – Vérification de la construction (MW = Molecular Weight)

FOXM1c	MKTSPRRPLILKRRRLPLVQNAFSETSEEEPKRSPAQQESNQAEASKEVAESNSCKFPA	60
FOXM1c_DBD_MT	MKTSPRRPLILKRRRLPLVQNAFSETSEEEPKRSPAQQESNQAEASKEVAESNSCKFPA	60

FOXM1c	GIKIINHPTMPNTQVVAIPNNANIHSIITALTAKGKESGSSGPNKFILISCGGAPTQPPG	120
FOXM1c_DBD_MT	GIKIINHPTMPNTQVVAIPNNANIHSIITALTAKGKESGSSGPNKFILISCGGAPTQPPG	120

FOXM1c	LRPQTQTSYDAKRTEVILETLGPKPAARDVNLPRPPGALCEQKRETCADGEAAGCTINNS	180
FOXM1c_DBD_MT	LRPQTQTSYDAKRTEVILETLGPKPAARDVNLPRPPGALCEQKRETCADGEAAGCTINNS	180

FOXM1c	LSNIQWLRKMSDGLGSRSIKQEMEEKENCHLEQRQVKVEEPSRPSASWQNSVSERPPYS	240
FOXM1c_DBD_MT	LSNIQWLRKMSDGLGSRSIKQEMEEKENCHLEQRQVKVEEPSRPSASWQNSVSERPPYS	240

FOXM1c	YMAMIQFAINSTERKRM TLKDIYTWIEDHFPYFKHIAKPGWKNSIRHNLSLHDMFVRETS	300
FOXM1c_DBD_MT	YMAMIQFAINSTERKRM TLKDIYTWIEDHFPYFKHIAKPGWKNSIAANLALHDMFVRETS	300
	***** **.******	
FOXM1c	ANGKVSFWTIHPSANRYLTLDQVFKPLDPGSPQLPEHLESQQKRPNPELRRNMTIKTELP	360
FOXM1c_DBD_MT	ANGKVSFWTIHPSANRYLTLDQVFKPLDPGSPQLPEHLESQQKRPNPELRRNMTIKTELP	360

FOXM1c	LGARRKMKPLLRVSSYLVP IQFFVNQSLVLPQSVKVPPLAASLMSSELARHSKRVRIA	420
FOXM1c_DBD_MT	LGARRKMKPLLRVSSYLVP IQFFVNQSLVLPQSVKVPPLAASLMSSELARHSKRVRIA	420

FOXM1c	PKVLLAEEGIAPLSSAGPGKEEKLLFGEGFSPLLPVQTIKEEEIQPGEEMPHLARPIKVE	480
FOXM1c_DBD_MT	PKVLLAEEGIAPLSSAGPGKEEKLLFGEGFSPLLPVQTIKEEEIQPGEEMPHLARPIKVE	480

FOXM1c	SPPLEEWFPSPAPSFKEESSHSDSSQSPTPRPKKSYSGLRSPTRCVSEMLVIQHRERRE	540
FOXM1c_DBD_MT	SPPLEEWFPSPAPSFKEESSHSDSSQSPTPRPKKSYSGLRSPTRCVSEMLVIQHRERRE	540

FOXM1c	RSRSRRKQHL LPPCVDEPELLFSEGPSTRWAAELPFPADSSDPASQLSYSQEVGGPFKT	600
FOXM1c_DBD_MT	RSRSRRKQHL LPPCVDEPELLFSEGPSTRWAAELPFPADSSDPASQLSYSQEVGGPFKT	600

FOXM1c	PIKETLPISSTPSKSVLPRTPE SWRLTPPAKVGGLDFSPVQTSQGASDPLPDLGLMDLS	660
FOXM1c_DBD_MT	PIKETLPISSTPSKSVLPRTPE SWRLTPPAKVGGLDFSPVQTSQGASDPLPDLGLMDLS	660

FOXM1c	TTPLQSAPPLESPQRLLSSEPLDLISVFPFGNSSPSDIDVPKPGSPEPQVSGLAANRSLTE	720
FOXM1c_DBD_MT	TTPLQSAPPLESPQRLLSSEPLDLISVFPFGNSSPSDIDVPKPGSPEPQVSGLAANRSLTE	720

FOXM1c	GLVLDTMNDSLSKILLDISFPGLEDEPLGPDNINWSQFIPELQ*	763
FOXM1c_DBD_MT	GLVLDTMNDSLSKILLDISFPGLEDEPLGPDNINWSQFIPELQ-	763

Figure 3.4. Alignement des séquences en acides aminés de FOXM1c et du triple mutant FOXM1c DBD MT

Cependant, ce mutant n'assure pas une indépendance complète par rapport à la transcription pour les expériences réalisées avec celui-ci. Par exemple, FOXM1 peut être recruté par le complexe MuvB afin de promouvoir l'expression de gènes mitotiques et la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Sadasivam *et al.*, 2012).

L'utilisation de ce mutant dans une série d'expériences permettra, en comparant les données collectées avec les résultats obtenus avec la forme non mutée de FOXM1, de déterminer si les évidences du rôle de FOXM1 dans la dégradation des ARNm sont affectées ou non lorsque FOXM1 est incapable de se lier directement à l'ADN. Cela permettra donc de continuer à discuter la question « La fonction de FOXM1 dans la dégradation de l'ARNm est-elle liée à ses fonctions transcriptionnelles ? ». Afin de pouvoir réaliser ces différentes expériences, il faut disposer de la séquence encodant ce triple mutant de FOXM1c, qui nous a été fournie dans le plasmide pCMV6 (Barger *et al.*, 2019) dans des vecteurs adéquats. Ainsi, cette étape de clonage a permis de disposer de cette séquence au sein des plasmides suivants : le pdest1899 et le pN-MS2-CP.

III.3.1 Clonage Gateway

La séquence encodant le triple mutant amplifiée par PCR et flanquée des sites attB a été insérée dans le pDONR223 via la réaction BP (deux réactions BP : BP1 et BP2) constituant le clone d'entrée du clonage Gateway. La construction de ce clone d'entrée ainsi que la séquence de l'insert ont ensuite été vérifiées par une digestion par l'enzyme de restriction NheI (G/CTAGC) (clones d'entrée BP1.1, BP1.2, BP2.1 et BP2.2) et a été envoyé au séquençage (clones d'entrée BP1.2 et BP2.2 ; amorces : DF756, DF757, DF2636 et DF2637 ; Annexe 2, Tableau I).

Le pDONR223 pourvu de l'insert possède trois sites de restrictions reconnus par l'enzyme NheI et donc, la digestion par cet enzyme fournit 3 fragments de 266, 1434 et 3379 pb. Le résultat de cette digestion est visualisé sur gel d'agarose représenté sur la figure 3.3. La bande de 266 pb n'est pas observable mais les bandes de 1434 et 3379 pb sont, quant à elle, bien présente montrant que l'insert a bien été intégré dans la bonne orientation. Le séquençage, quant à lui, permet de déterminer si la séquence encodant le triple mutant possède bien les mutations permettant la transformation des résidus Arg-286, His-287 et Ser-290 en résidus Ala. La séquence nucléotidique de ce triple mutant obtenue par ce séquençage du clone d'entrée BP1.2 est retrouvée au niveau de l'annexe 4. Aucune mutation non désirée n'y est détectée tandis que l'on peut observer que les codons CGC, CAC et TCC codant respectivement pour l'Arg-286, His-287 et Ser-290 sont remplacés par des codons GCC codant pour une alanine. L'insert possède donc bien, dans la séquence nucléotidique, les mutations désirées en vue de produire le triple mutant dont l'alignement de la séquence en acides aminés avec celle de FOXM1 est représenté à la figure 3.4. On y observe bien la présence des trois

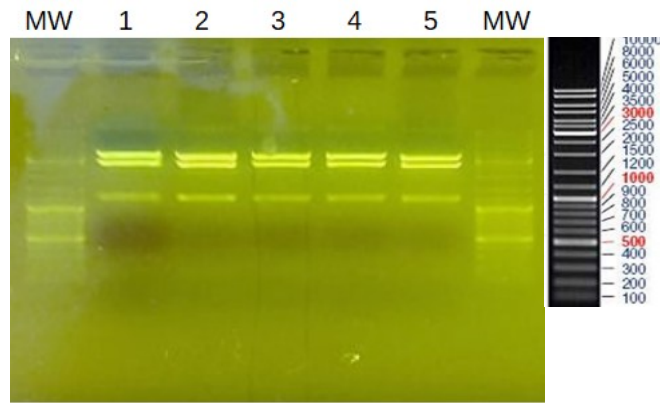


Figure 3.5. Gel d'agarose de la digestion par PvuII (CAG/CTG) du pdest1899-FOXM1c DBD MT – Vérification de la construction (MW = Molecular Weight ; 1 à 5 : digestion pdest1899-FOXM1c DBD MT par PvuII)

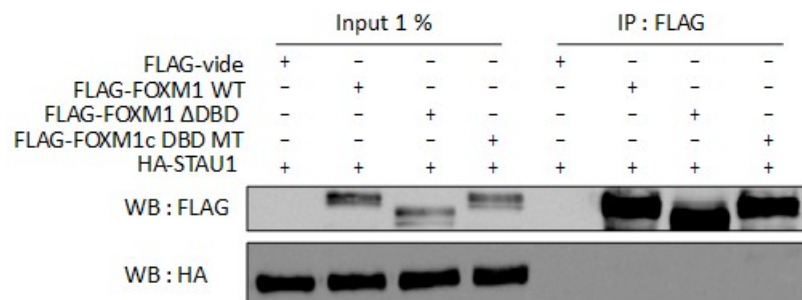


Figure 3.6. Co-immunoprécipitation de FOXM1 WT, de FOXM1 ΔDBD et de FOXM1c DBD MT avec STAU1 – Western Blot

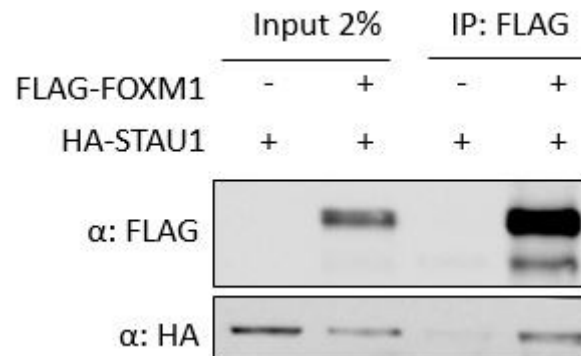


Figure 3.7. Co-immunoprécipitation de STAU1 avec FOXM1 WT – Western Blot

mutations R286A, H287A et S290A.

Ce clone d'entrée BP1.2 peut donc être utilisé pour la réaction LR en vue d'incorporer l'insert dans le vecteur de destination pdest1899 et ainsi constituer le clone d'expression. La construction de ce clone d'expression ainsi généré sera vérifiée par une digestion avec l'enzyme de restriction PvuII (CAG/CTG), coupant à 4 reprises dans ce clone d'expression et produisant des fragments de 151, 1138, 2525 et 3217 pb. Le résultat de cette digestion est visualisé sur gel d'agarose représenté sur la figure 3.5. La bande de 151 pb n'est pas observable mais les bandes de 1138, 2525 et 3217 pb sont, quant à elle, bien présente montrant que l'insert a bien été intégré au sein de ce pdest1899.

III.3.2 Co-immunoprécipitation

Ce plasmide pdest1899-FOX1c DBD MT est utilisé pour la transfection de cellules HEK293. Ces cellules ont été cotransfectées avec le pdest475-HA-STAU1 et soit le pdest1899 vide, le pdest1899-FOX1 WT, le pdest1899-FOX1 ΔDBD ou le pdest1899 FOX1c DBD MT. Une co-immunoprécipitation est alors réalisée avec des billes d'agarose munie d'anticorps anti-FLAG à partir des lysats extraits de ces cellules transfectées, afin de déterminer si il y a une interaction entre FOX1 (FOX1 WT, FOX1 ΔDBD ou FOX1c DBD MT) muni d'un tag FLAG et STAU1 muni d'un tag HA. Les résultats de cette co-IP sont observés par Western Blot et sont représentés sur la figure 3.6. Dans un premier temps, il est possible de remarquer que la transfection semble s'être bien déroulée pour les deux types de plasmides, permettant donc l'expression des protéines FOX1 WT, FOX1 ΔDBD, FOX1c DBD MT ainsi que la protéine STAU1 dont la présence est détecté au niveau des *input*. L'immunoprécipitation avec les billes anti-FLAG semble également s'être correctement déroulée au vu de la détection des protéines FOX1 WT, FOX1 ΔDBD et FOX1c DBD MT dans les fractions immunoprécipitées correspondantes. La co-immunoprécipitation de STAU1 avec FOX1 WT, FOX1 ΔDBD et FOX1c DBD MT, quant à elle, s'est moins bien déroulée. En effet, on ne détecte pas la protéine STAU1 en co-immunoprécipitation avec FOX1 WT, FOX1 ΔDBD et le triple mutant FOX1c DBD MT. Cependant, la co-immunoprécipitation de la protéine STAU1 avec FOX1 WT a déjà été montrée plusieurs fois par co-immunoprécipitation (Mariavelle, données non publiées), notamment lors de mon stage de master 1 (Figure 3.7). Par conséquent, vu que l'interaction de STAU1 avec FOX1 WT prouvée auparavant n'a pas pu être détectée, il est impossible d'établir des conclusions quant à l'interaction éventuelle de ce triple mutant avec la protéine STAU1. Il peut y avoir plusieurs raisons possibles qui, seules ou combinées, peuvent expliquer que la co-IP n'ait pas fonctionner correctement : le temps d'incubation des billes avec les fractions prévues pour la réalisation des co-IP, la composition des tampons, le pH des tampons, des lavages trop stricts (concentration en sels trop élevée) ou encore un problème au niveau des solutions stocks des différents composants des tampons IPLS et IPMS.

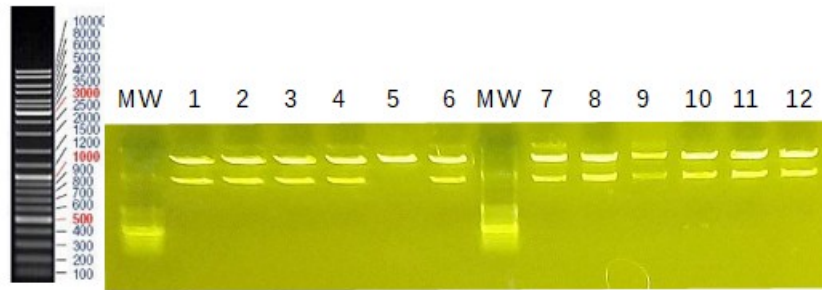


Figure 3.8. Gel d'agarose de la digestion par XhoI (C/TCGAG) du pN-MS2-FOXM1c DBD MT – Vérification de la construction (MW = Molecular Weight ; 1 à 12 : digestion de pN-MS2-FOXM1c DBD MT des colonies screenée (1 à 12) par XhoI)

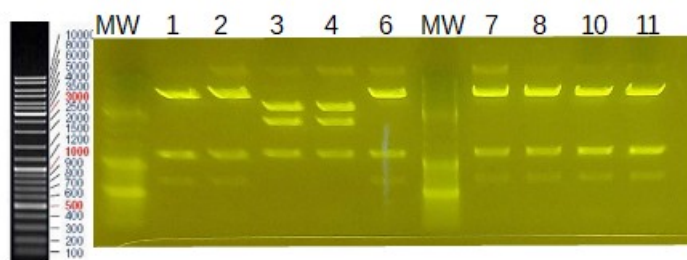


Figure 3.9. Gel d'agarose de la digestion par PvuII (CAG/CTG) du pN-MS2-FOXM1c DBD MT – Vérification de la construction (MW = Molecular Weight)

Dans un premier temps, cette expérience a de nouveau été réalisée, en augmentant de 2h à 4h le temps d'incubation des billes avec les fractions prévues pour les co-IP et en confectionnant et mettant à pH de nouvelles solutions d'IPLS et d'IPMS à partir des solutions stocks (Annexe 9, Figure VI). Cependant, aucune co-immunoprécipitation de STAU1 avec FOXM1 WT, FOXM1 ΔDBD et FOXM1c DBD MT a été détectée. Ensuite, cette expérience a été effectuée une troisième fois en modifiant les lavages. Ainsi, 4 lavages à l'IPLS ont été effectués (Annexe 9, Figure VII) en parallèle des lavages utilisés précédemment (Annexe 9, Figure VIII) mais aucune co-immunoprécipitation de STAU1 avec FOXM1 WT, FOXM1 ΔDBD et FOXM1c DBD MT a été détectée.

Par manque de temps, de nouvelles tentatives n'ont pas pu être réalisées mais il avait été envisagé de confectionner de nouvelles solutions stock afin de vérifier qu'il ne s'agissait pas d'un souci au niveau de celles utilisées (concentration, pH, ...).

III.3.3 Clonage en pN-MS2-CP

Le plasmide pdest1899 contenant la séquence encodant FOXM1c DBD MT est également utilisé comme point de départ pour le clonage de la séquence codante du triple mutant dans le pN-MS2-CP (point II.3.2) en vue de la réalisation de l'expérience de *MS2-tethering degradation assay*, abordée ultérieurement dans cette partie. La construction pN-MS2-FOXM1c DBD MT nouvellement générée a alors été vérifiée en trois temps :

- par une digestion avec l'enzyme de restriction XhoI (C/TCGAG) afin de détecter la présence de l'insert. La digestion de ce plasmide contenant l'insert génère deux fragments de 2300 et 5953 pb tandis que la plasmide vide ne génère qu'un fragment de 5953 pb. Le résultat de cette digestion des 12 colonies screenées est représenté sur la figure 3.8. On remarque que seul la colonie 5 ne contient pas l'insert ;
- par une digestion avec l'enzyme de restriction PvuII (CAG/CTG) pour vérifier l'orientation de l'insert. La digestion par cet enzyme génère 5 fragments. Ainsi, lorsque l'insert se trouve dans la bonne orientation, des fragments de 151, 1069, 1097, 2324 et 3604 pb sont générés tandis que quand l'insert est orienté dans le mauvais sens, les fragments générés sont de 151, 539, 1069, 1097 et 5389 pb. Les plasmides extraits des colonies 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 et 11 ont été digérés et les résultats sont représentés sur la figure 3.9. Les bandes de 151 pb ne sont pas observables. Les bandes de 1069 et 1097 pb ne sont pas distinguables au vu de leur proximité et ne représentent qu'une seule bande visible sur le gel. Ainsi, seules les plasmides issus des colonies 3 et 4 possèdent les bandes de 2324 et 3604 pb et contiennent donc l'insert dans la bonne orientation ;

FOXM1c	MTSPRRPLILKRRRLPLPVQNAFSETEEEPKRSPAQQESNQAESKEVAESNSCKFFA	60
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	MTSPRRPLILKRRRLPLPVQNAFSETEEEPKRSPAQQESNQAESKEVAESNSCKFFA	60
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	MTSPRRPLILKRRRLPLPVQNAFSETEEEPKRSPAQQESNQAESKEVAESNSCKFFA *****	60
FOXM1c	GIKIINHPTMPNTQVVAIPNNANIHSIIITALTAKGKESGSSGPNKFILISCGGAPTQPPG	120
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	GIKIINHPTMPNTQVVAIPNNANIHSIIITALTAKGKESGSSGPNKFILISCGGAPTQPPG	120
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GIKIINHPTMPNTQVVAIPNNANIHSIIITALTAKGKESGSSGPNKFILISCGGAPTQPPG *****	120
FOXM1c	LRPQTQTSYDAKRTTEVILETLGPKPAARDVNLPRPPGALCEQKRETCADGEAAGCTINNS	180
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	LRPQTQTSYDAKRTTEVILETLGPKPAARDVNLPRPPGALCEQKRETCADGEAAGCTINNS	180
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	LRPQTQTSYDAKRTTEVILETLGPKPAARDVNLPRPPGALCEQKRETCADGEAAGCTINNS *****	180
FOXM1c	LSNIQWLRKMSDGLGSRSIKQEMEEKENCHLEQRQVKVEEPSRPSASWQNSVSRPPYS	240
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	LSNIQWLRKMSDGLGSRSIKQEMEEKENCHLEQRQVKVEEPSRPSASWQNSVSRPPYS	240
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	LSNIQWLRKMSDGLGSRSIKQEMEEKENCHLEQRQVKVEEPSRPSASWQNSVSRPPYS *****	240
FOXM1c	YMAMIQFAINSTERKRMILKDIYTWIEDHFPYFKHIAKPGWKNIRHNLSDLHDMFVRETS	300
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	YMAMIQFAINSTERKRMILKDIYTWIEDHFPYFKHIAKPGWKNIRHNLSDLHDMFVRETS	300
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	YMAMIQFAINSTERKRMILKDIYTWIEDHFPYFKHIAKPGWKNIRHNLSDLHDMFVRETS ***** *:*****	300
FOXM1c	ANGKVSFWTIHPSANRYLTLQVFKPLDPGSPQLPEHLESQQKRNPELRNMTIKTELP	360
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	ANGKVSFWTIHPSANRYLTLQVFKPLDPGSPQLPEHLESQQKRNPELRNMTIKTELP	360
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	ANGKVSFWTIHPSANRYLTLQVFKPLDPGSPQLPEHLESQQKRNPELRNMTIKTELP *****	360
FOXM1c	LGARRKMKPLLPRVSSYLVP IQFFVNQSLVLQPSVKVPLPLAASLMSSELARHSKRVRIA	420
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	LGARRKMKPLLPRVSSYLVP IQFFVNQSLVLQPSVKVPLPLAASLMSSELARHSKRVRIA	420
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	LGARRKMKPLLPRVSSYLVP IQFFVNQSLVLQPSVKVPLPLAASLMSSELARHSKRVRIA *****	420
FOXM1c	PKVLLAEEGIAPLSSAGPGKEEKLDFEGGFSPLLVQTIKEEEIQGGEEMPHLARPIKVE	480
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	PKVLLAEEGIAPLSSAGPGKEEKLDFEGGFSPLLVQTIKEEEIQGGEEMPHLARPIKVE	480
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	PKVLLAEEGIAPLSSAGPGKEEKLDFEGGFSPLLVQTIKEEEIQGGEEMPHLARPIKVE *****	480
FOXM1c	SPLEEWPSPAPSFKEESSHSEDSSQSPTPRPKKSYGLRSPTRCVSEMLVIQHRERRE	540
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	SPLEEWPSPAPSFKEESSHSEDSSQSPTPRPKKSYGLRSPTRCVSEMLVIQHRERRE	540
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	SPLEEWPSPAPSFKEESSHSEDSSQSPTPRPKKSYGLRSPTRCVSEMLVIQHRERRE *****	540
FOXM1c	RSRSRRKQHLLPPCVDEPELLFSEGPSTSRWAAELPFPADSSDPASQLSYSQEVGGPFKT	600
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	RSRSRRKQHLLPPCVDEPELLFSEGPSTSRWAAELPFPADSSDPASQLSYSQEVGGPFKT	600
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	RSRSRRKQHLLPPCVDEPELLFSEGPSTSRWAAELPFPADSSDPASQLSYSQEVGGPFKT *****	600
FOXM1c	PIKETLPISSSTPSKSVLPRTPESWRLTPPAKVGGLDFSPVQTSQGASDPLDPLGLMDLS	660
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	PIKETLPISSSTPSKSVLPRTPESWRLTPPAKVGGLDFSPVQTSQGASDPLDPLGLMDLS	660
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	PIKETLPISSSTPSKSVLPRTPESWRLTPPAKVGGLDFSPVQTSQGASDPLDPLGLMDLS *****	660
FOXM1c	TTPLQSAPPLESPQRLLSSEPLDLISVPPFGNSSPSDIDVFKPGSPPEQVSGLAANRSLTE	720
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	TTPLQSAPPLESPQRLLSSEPLDLISVPPFGNSSPSDIDVFKPGSPPEQVSGLAANRSLTE	720
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	TTPLQSAPPLESPQRLLSSEPLDLISVPPFGNSSPSDIDVFKPGSPPEQVSGLAANRSLTE *****	720
FOXM1c	GLVLDTMNDSLSKILLDISFPGLDEDPFGPDNINWSQFIFELQ*	763
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	GLVLDTMNDSLSKILLDISFPGLDEDPFGPDNINWSQFIFELQ-	763
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GLVLDTMNDSLSKILLDISFPGLDEDPFGPDNINWSQFIFELQ- *****	763

Figure 3.10. Alignement des séquences en acides aminés de FOXM1c et du triple mutant FOXM1c DBD MT séquencés à partir du pDONR223-FOXM1c DBD MT et du pN-MS2-FOXM1c DBD MT

- par séquençage (amorces : DF1386, DF1387, DF2636 et DF2637 ; Annexe 2, Tableau I). La séquence nucléotidique de l'insert séquencé à partir du pN-MS2-FOXM1c DBD MT (plasmides extraits de la colonie 4) est alignée avec la séquence nucléotidique de FOXM1c et celle de FOXM1c DBD MT séquencé à partir du pDONR223-FOXM1c DBD MT (Annexe 9). On y observe les mutations désirées afin de modifier les résidus Arg-286, His-287 et Ser-290 en alanine. Cependant, on observe deux mutations potentielles où l'adénine serait remplacée par une guanine. En vérifiant sur le chromatogramme, on peut remarquer qu'il s'agit bel et bien, dans les deux cas, d'une adénine (Annexe 8, Figures IV et V) et donc que la séquence ne possède pas d'autres mutations que celles désirées. La figure 3.10 représente l'alignement des séquences en acide aminés du triple mutant séquencé à partir du pDONR223-FOXM1c DBD MT et du pN-MS2-FOXM1c DBD MT. Seuls les résidus désirés se retrouvent mutés.

La construction du plasmide pN-MS2-FOXM1c DBD MT ainsi que la séquence nucléotidique de l'insert ont été vérifiées. Ce plasmide pourra donc être utilisé en vue de l'expérience *MS2-tethering degradation assay*.

III.3.4 Perspectives d'expériences

Une fois le clonage de ce triple mutant de FOXM1c au niveau de son DBD effectuée, celui-ci pourra être utilisé dans une série d'expériences afin de tenter de fournir une réponse à la question « La fonction de FOXM1 dans la dégradation de l'ARNm est-elle liée à sa capacité de liaison à l'ADN ? ». Au vu des circonstances exceptionnelles dans lesquelles se sont déroulées ce mémoire, ces expériences n'ont pas eu le temps d'être réalisées ou d'être menées à bien et seront donc abordées d'un point de vue plus théorique. Elles permettront seulement de continuer la discussion de cette question, commencée au point III.2.

Dans un premier temps, le plasmide pN-MS2-FOXM1c DBD MT pourra être utilisé, comme mentionné auparavant, dans une expérience appelée *MS2-tethering degradation assay*. Pour rappel, il s'agit d'une technique de biologie moléculaire ayant pour but d'évaluer l'impact d'une protéine sur la stabilité d'un ARNm rapporteur lorsqu'elle est recrutée sur celui-ci (Rambout *et al.*, 2016). Cette méthode utilise la protéine de capsid du bactériophage MS2 (MS2-CP) et sa capacité à se lier au niveau d'une séquence d'ARN spécifique de 21 nucléotides possédant une structure en épingle à cheveux (Coller & Wickens, 2007; Johansson *et al.*, 1997). Ainsi, lorsqu'une protéine est fusionnée avec la protéine MS2-CP, elle peut être recrutée au niveau d'ARN possédant le site de liaison à la protéine MS2-CP (Barreau *et al.*, 2006). La séquence de ce triple mutant a donc été insérée au sein du plasmide pN-MS2-CP dans le but de fusionner ce mutant avec la protéine MS2-CP.

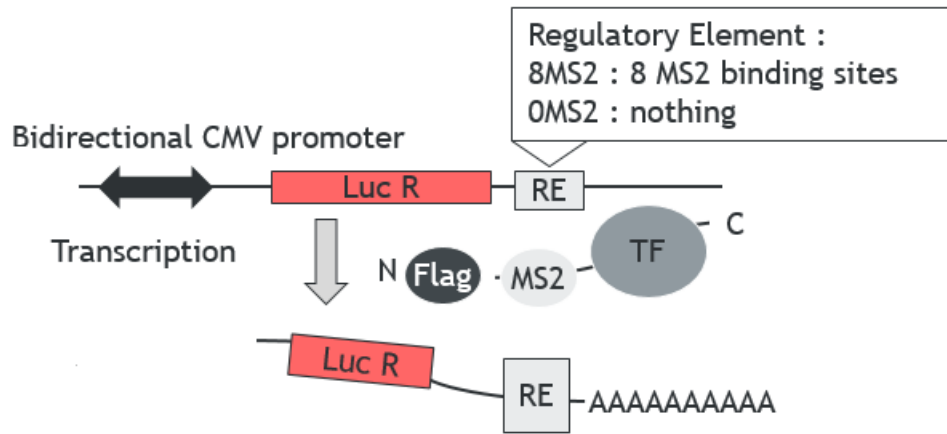


Figure 3.11. Construction permettant la production d'ARNm de la R-Luc possédant ou non les 8 sites de liaison de la protéine MS2-CP. Cette dernière, fusionné avec la protéine d'intérêt, va permettre le recrutement de celle-ci au niveau de la région 3' UTR de l'ARNm rapporteur (R-Luc-8MS2) comportant les sites de liaison précédemment mentionnés. L'impact sur la dégradation de cet ARNm rapporteur pourra alors être évalué (Mariavelle, 2019).

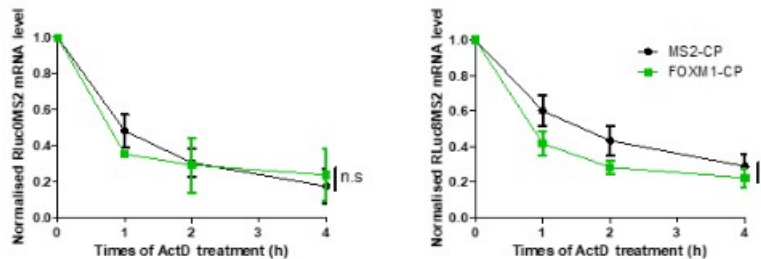


Figure 3.12. Analyse par RT-qPCR de la stabilité des ARNm rapporteurs R-Luc-8MS2 et R-Luc-0MS2. Les échantillons sont des échantillons d'ARN provenant de cellules HeLa transfectées avec la construction encodant l'ARNm rapporteur R-Luc correspondant et la construction encodant FOXM1-MS2-CP ou MS2-CP, et traitées à l'actinomycine D durant 0, 1, 2 ou 4h (Mariavelle, 2019). n.s : non significatif ; * p -value < 0.05 (two-tailed unpaired Student's t test)

Cette fusion traductionnelle est produite en vue de déterminer si le recrutement spécifique de FOXM1c DBD MT au niveau d'une ARNm rapporteur, en l'occurrence celui de la *Renilla luciferase*, possédant 8 répétitions du site de liaisons de la protéine MS2-CP au niveau de sa région 3'UTR (R-Luc-8MS2), impacte la stabilité de celui-ci (Figure 3.11).

Afin de déterminer l'impact de la protéine testée sur la stabilité de cet ARNm rapporteur, cette méthode se base sur l'évaluation de son taux de dégradation lorsque celle-ci est recrutée au niveau de sa région 3' UTR. En guise de contrôle, l'expérience est également réalisée avec la protéine MS2-CP seule, non fusionnée avec la protéine d'intérêts et/ou avec l'ARNm rapporteur ne comportant pas ces 8 sites de liaisons de la protéine MS2-CP (R-Luc-0MS2) afin de s'assurer que les effets observés sont bien imputables au recrutement de la protéine d'intérêt sur l'ARNm rapporteur.

En pratique, les cellules sont co-transfectées avec deux constructions : 1) la construction permettant soit l'expression de la protéine MS2-CP seule ou en fusion avec la protéine d'intérêt, et 2) la construction exprimant la R-Luc rapporteur avec ou sans les 8 sites de liaison de la protéine MS2-CP au niveau de la région 3'UTR de son ARNm. Les cellules vont ensuite subir un traitement à l'actinomycine D afin de générer des conditions de blocage transcriptionnel (temps de traitement : 0, 1, 2 et 4h) qui vont permettre de ne tenir compte que de la dégradation de l'ARNm rapporteur comme source de variation de sa quantité et donc, de mieux visualiser son taux de dégradation.

Après ces traitements, les ARN vont directement être extraits de ces cellules. Enfin, le niveau d'ARNm rapporteur sera quantifié pour chaque temps de traitement par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques et sera normalisé à l'aide du niveau moyen de différents ARNm stable (*GAPDH*, *RPL32* and *NDUFA12*), et le taux de dégradation pourra alors être déterminé (Rambout *et al.*, 2016).

Cette expérience de *MS2-tethering degradation assay* a déjà été réalisée précédemment avec la protéine FOXM1 WT fusionnée à la protéine MS2-CP, dont les résultats sont montrés au niveau de la figure 3.12. Il est possible d'y observer que le recrutement de FOXM1 WT au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm rapporteur R-Luc-8MS2 semble avoir un impact au niveau de la stabilité de celui-ci. En effet, le taux de dégradation est plus élevé lorsque la protéine MS2-CP fusionnée à FOXM1 WT est recrutée au niveau de cet ARNm rapporteur par rapport à quand la protéine MS2-CP seule y est recrutée tandis qu'aucune différence significative n'est observable sur le taux de dégradation de l'ARNm rapporteur R-Luc-0MS2. Par conséquent, les effets observés sur la stabilité de l'ARNm rapporteur R-Luc-8MS2 sont bien dus au recrutement de la protéine FOXM1 WT au niveau de sa région 3' UTR.

Ainsi, il est possible de s'imaginer ce que peuvent donner les résultats de cette expérience en la réalisant avec le triple mutant FOXM1c DBD MT. Cette expérience sera réalisée en parallèle avec FOXM1 WT dans le

but de comparer les résultats obtenus et de pouvoir tirer des conclusions. D'une part, si ce mutant impacte la stabilité de l'ARNm rapporteur R-Luc-8MS2 de la même façon que la forme WT, alors il serait possible de conclure que la fonction de FOXM1 dans la dégradation des ARNm ne semble pas être dépendante de sa fonction dans la transcription. D'autre part, si ce mutant FOXM1c DBD MT n'impacte pas le taux de dégradation de l'ARNm rapporteur R-Luc-8MS2 comme le fait FOXM1 WT, on s'orienterait vers la conclusion inverse, c'est-à-dire un lien entre ces fonctions de FOXM1. Au vu des résultats discutés dans le point III.2, la première conclusion semble être la plus plausible.

Une autre expérience, l'*oligo(dT) pulldown*, permettrait d'apporter plus d'éclaircissements dans la discussion concernant l'indépendance ou non de la fonction de FOXM1 dans la dégradation par rapport à sa fonction dans la transcription. Pour rappel, il s'agit d'une technique de biologie moléculaire permettant de déterminer si une protéine, en l'occurrence FOXM1c DBD MT dans notre cas, interagit avec l'ARNm. Si c'est le cas, cette expérience permet aussi de discriminer si son association avec celui-ci est directe ou indirecte. En d'autres mots, cela permet de déterminer si une protéine d'intérêt est retrouvée au sein des complexes ribonucléoprotéiques messagers. En pratique, les cellules vont subir soit un traitement aux UV afin de fixer les interactions ARN-protéine soit un traitement au formaldéhyde dans le but de fixer les interactions ARN-protéine et protéine-protéine (fixation des complexes protéiques). Ces cellules seront ensuite lysées et les lysats obtenus sont alors homogénéisés. Certains lysats subissent un traitement à la RNase A, dégradant l'ARN, constituant ainsi un contrôle négatif. Une partie de chaque lysat sera conservé et utilisé comme *input* tandis que le reste va servir à isoler les ARNm polyadénylés via une méthode de purification utilisant des billes magnétiques oligo(dT). Les billes, après diverses étapes de lavages, et les *input* sont alors resuspendus dans du tampon de chargement et analysés par SDS-PAGE et western blot (Rambout *et al.*, 2016). Afin de contrôler le bon déroulement de l'expérience, une protéine connue pour ne pas interagir avec l'ARNm et une protéine dont on sait qu'elle interagit directement (contrôle lors de traitements aux UVs et au formaldéhyde) ou indirectement (contrôle lors du traitement au formaldéhyde) avec l'ARNm sont utilisés respectivement comme contrôle négatif et contrôle positif lors de cette expérience. Elles seront détectées à l'aide d'anticorps spécifique lors du western blot.

Si la protéine testée est détectée par western blot au niveau des ARNm des cellules ayant subi un traitement au formaldéhyde ainsi que de celles ayant subi le traitement aux UV, alors l'interaction de la protéine testée avec l'ARNm est directe tandis que si l'interaction est indirecte, la protéine sera seulement détectée au niveau des ARNm des cellules ayant subi un traitement au formaldéhyde. Enfin, si la protéine ne fait pas partie des complexes mRNP, elle ne sera détectée dans aucun des deux traitements.

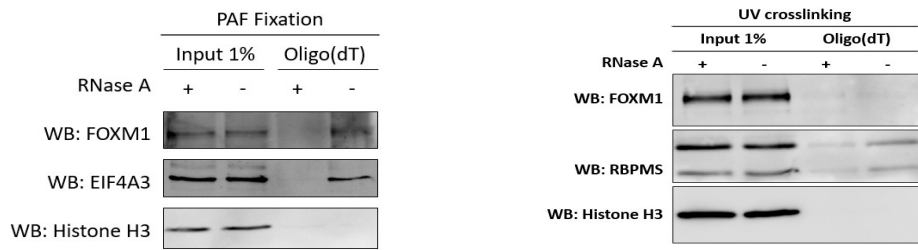


Figure 3.13. *Oligo(dT) pulldown* et western blot anti-FOXM1, anti-EIF4A3, anti-Histone H3 et anti-RBPMS. FOXM1 est détecté au niveau de la fraction oligo(dT)-liée des cellules traitées au formaldéhyde indiquant que FOXM1 est présent au niveau des complexe mRNP (Mariavelle, 2019)

Le facteur de transcription FOXM1 a pu être détecté au niveau des ARNm des cellules ayant subi un traitement au formaldéhyde mais pas au niveau de celles ayant été traitées aux UV (Figure 3.13). Ces données indiquent donc que FOXM1 est capable de s'associer de manière indirecte avec les complexes mRNP (Mariavelle, 2017, 2019). Par conséquent, il a fallu caractériser cette interaction indirecte de FOXM1 avec l'ARNm. C'est donc en investiguant quelle protéine permettait le recrutement de FOXM1 sur ces complexes mRNP que l'interaction avec STAU1 a été testée et démontrée par co-immunoprécipitation (Mariavelle, données non publiées). Ces deux expériences, l'*oligo(dT) pulldown* et la co-immunoprécipitation, ont fourni des données complémentaires dans le cadre de l'étude du rôle de FOXM1 dans la dégradation des ARNm, en détectant la présence de FOXM1 au niveau des complexes ribonucléoprotéiques, en déterminant que cette interaction avec l'ARNm est indirecte et ensuite en trouvant la RBP impliquée dans cette interaction indirecte.

Ces deux expériences peuvent également être réalisées avec le triple mutant FOXM1c DBD MT. Leur réalisation peut s'avérer redondante d'un point des vues des conclusions qu'il est possible de tirer mais peut permettre d'apporter plus de certitude dans celles-ci. Bien qu'elles n'aient pas été réalisées ou menées à bien, il est possible de discuter des résultats qui pourraient potentiellement être obtenus. Si l'expérience d'*oligo(dT) pulldown* fournit un résultat similaire à celui obtenu avec la forme non mutée, on peut s'attendre à ce que STAU1 co-immunoprécipite avec FOXM1c DBD MT. Ainsi, il pourrait être conclu que même en absence des résidus importants pour la fixation de FOXM1 sur l'ADN, ce dernier est encore capable d'interagir directement ou indirectement avec STAU1 et donc se retrouver au niveau des complexes mRNP. Cependant, si ce triple mutant ne montre pas d'interaction avec STAU1 par co-IP, il ne sera pas peut-être pas détecté dans le western blot de l'*oligo(dT) pulldown*. Il est possible que FOXM1 soit recruté par d'autres RBP sur l'ARN et donc qu'on le détecte toujours par *oligo(dT) pulldown*.

III.4 Discussion de la question : Conclusion

Pour rappel, l'un des objectifs de ce mémoire est de discuter la question suivante : « La fonction de FOXM1 dans la dégradation de l'ARNm est-elle liée à ses fonctions transcriptionnelles ? ». Cette discussion se base sur l'analyse de données collectées préalablement à ce mémoire mais également via la réalisation ou la proposition d'expériences nous aidant dans celle-ci.

De l'analyse des données du CHIP-Seq réalisé par l'équipe de (Grant *et al.*, 2013) et du RNA-Seq, il a été possible d'établir une première conclusion qui est que le rôle de FOXM1 dans le processus de dégradation des ARNm semble être indépendant par rapport à son rôle de FOXM1 dans la transcription des gènes.

Cependant, cette première conclusion se doit d'être renforcée par la réalisation d'autres expériences qui vont mettre en jeu le triple mutant de FOXM1 au niveau de son domaine de liaison à l'ADN, FOXM1c DBD

MT, bien qu'il ne garantisse pas une indépendance complète par rapport à la transcription. Pour réaliser celles-ci, la séquence encodant ce triple mutant a été clonée au sein du pdest1899 et du pN-MS2-CP. La réalisation de ces expériences établir la première perspective de ce mémoire. Ainsi, avec les résultats des expériences de *MS2-tethering degradation assay*, d'*oligo(dT) pulldown* et de co-immunoprécipitation avec STAU1, il sera possible de confirmer ou de contredire cette première conclusion.

III.5 Proposition d'un modèle

Comme énoncé dans les objectifs de ce mémoire, le but final de ce dernier est d'arriver à proposer un/des modèle(s) qui colle(nt) aux données actuelles.

Dans un premier temps, vu que le facteur de transcription FOXM1 intervient dans la transcription de certains gènes et donc dans la formation des ARNm correspondants mais également, au vu des évidences énoncées dans le point III.1, dans le processus de dégradation des ARNm, il est possible de s'imaginer qu'il pourrait accompagner l'ARNm depuis sa formation jusque sa dégradation et ainsi réguler ces deux étapes de la régulation de l'expression des gènes. Cependant, au vu des données résultants du CHIP-Seq et du RNA-Seq, environ 10 % des cibles de FOXM1 dans le processus de dégradation des ARNm sont également des cibles transcriptionnelles de celui-ci, suggérant une indépendance de ces deux rôles bien qu'il faille encore confirmer cette conclusion par la réalisation des expériences avec le triple mutant de FOXM1c incapable de se lier à l'ADN (*MS2-tethering degradation assay*, *oligo(dT) pulldown* et co-immunoprécipitation avec STAU1). En plus de venir appuyer la première conclusion, ces expériences pourront également permettre d'évaluer si le recrutement de FOXM1 sur l'ARNm requiert ou non sa liaison préalable sur l'ADN, sans pour autant être forcément impliqué dans la transcription.

Ainsi, si le rôle de FOXM1 dans la dégradation des ARNm ne requiert pas son rôle dans la transcription ainsi que sa liaison préalable à l'ADN, on s'orienterait plutôt vers un modèle où les deux fonctions de FOXM1 sont indépendantes l'une de l'autre. Dans le noyau, FOXM1 est capable de lier sa séquence consensus retrouvée au niveau de la région promotrice de ses gènes cibles, jouant ainsi son rôle de facteur de transcription. Dans le cytoplasme, où se trouve les ARNm et donc ses ARNm cibles, il pourrait être recruté sur ceux-ci via STAU1, une RBP reconnaissant un site ARN double-brin spécifique au niveau de la région 3'UTR du transcrit, le *STAU-binding site*.

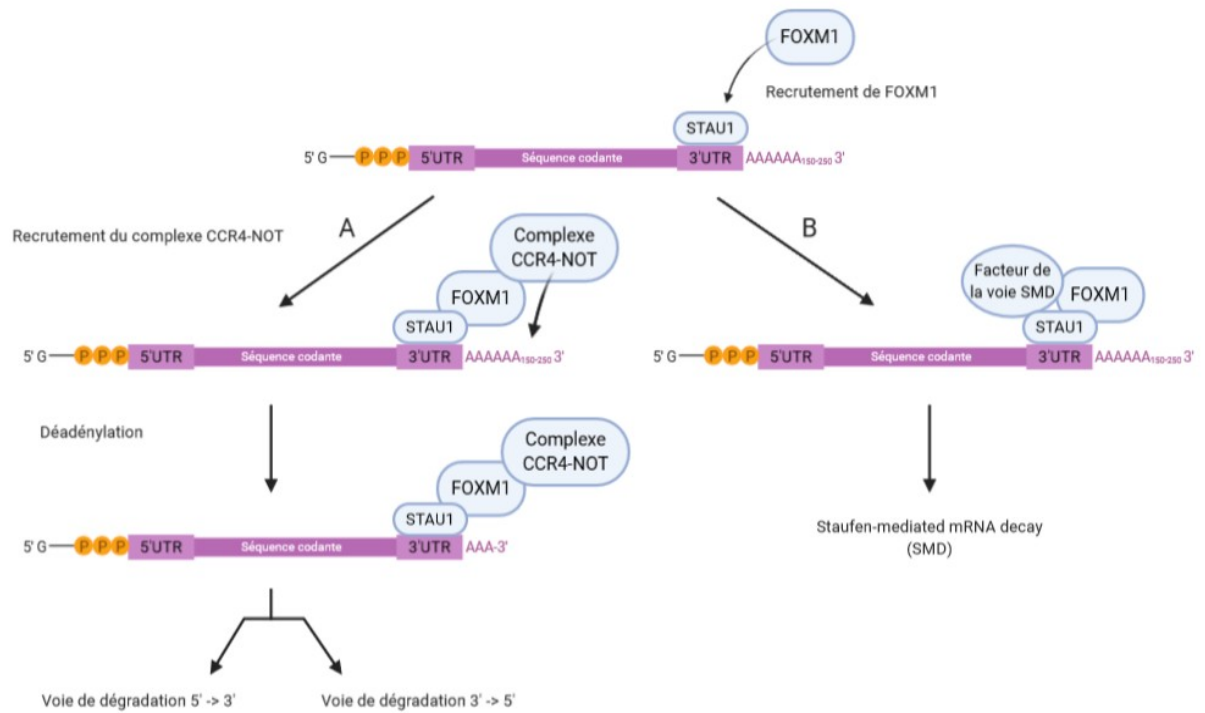


Figure 3.14. Proposition d'un modèle du processus de dégradation de l'ARNm médié par le facteur de transcription FOXM1. La protéine STAU1 reconnaît le STAU-binding site au niveau de la région 3'UTR du transcrit et peut y recruter FOXM1.

A : Ce dernier pourrait recruter une machinerie de dégradation, représentée ici par le complexe de déadénylation CCR4-NOT, ce qui a pour effet d'enclencher la dégradation de celui-ci. Dans cet exemple avec CCR4-NOT, le transcrit serait déadénylé par ce complexe et pourrait alors être dégradé par les voies de dégradation 5' → 3' et 3' → 5'.

B : Au vu de son interaction avec STAU1, FOXM1 pourrait avoir un lien voire même intervenir dans la voie de dégradation SMD, représenté sur la figure par le recrutement d'un facteur de la voie SMD.

À ce stade, on pourrait s'imaginer que FOXM1, en étant recruté sur l'ARNm, puisse impacter la stabilité de celui-ci, notamment en recrutant une machinerie de dégradation, comme par exemple le complexe de déadénylation CCR4-NOT, ce qui aurait pour effet d'enclencher la dégradation du transcrit (Figure 3.14).

Au vu de son interaction, directe ou indirecte, avec la protéine de liaison à l'ARN STAU1 qui est impliquée dans la voie de dégradation SMD, il serait également possible de penser que FOXM1 puisse avoir un lien voire même intervenir dans cette voie de dégradation (Figure 3.14).

III.6 Perspectives

La réalisation des trois expériences précédemment citées avec le triple mutant de FOXM1c incapable de se lier à l'ADN (*MS2-tethering degradation assay*, *oligo(dT) pulldown* et co-immunoprécipitation avec STAU1) représentent la première perspective en vue après ce mémoire. Ils permettront de discuter la question de départ « Est-ce que la fonction de FOXM1 dans la dégradation de l'ARNm est-elle liée à ses fonctions transcriptionnelles ? » mais également de déterminer si sa liaison à l'ADN est nécessaire pour son rôle dans la dégradation et sa présence au niveau des complexes mRNP.

Ensuite, vu que FOXM1 a montré une interaction avec STAU1 par co-immunoprécipitation, il serait intéressant d'utiliser d'autres méthodes pour confirmer cette interaction. Des expériences de gPCA (*Gaussia luciferase Protein Complementation Assay*) ont déjà été réalisées et ont confirmé que FOXM1 et STAU1 interagissent bien ensemble, sans pour autant déterminer si il s'agit d'une interaction directe ou indirecte (Mariavelle, données non publiées). Il serait également intéressant de tester l'expérience de co-immunoprécipitation avec les protéines endogènes, c'est-à-dire celles produites naturellement par les cellules non transfectées avec une construction plasmidique. Les protéines d'intérêt se retrouveraient dès lors à leur niveau d'expression « normal ».

De plus, il serait judicieux de caractériser cette interaction entre STAU1 et FOXM1, notamment en déterminant les domaines de chaque protéine intervenant dans cette interaction. Ainsi, en enlevant un domaine par mutagenèse et en utilisant les mutants générés dans des expériences de co-immunoprécipitation et/ou de gPCA, il sera possible de déterminer les domaines impliqués dans l'interaction. Il serait également intéressant de déterminer si l'interaction est conservée quand STAU1 n'est plus capable de lier l'ARN.

Afin de vérifier l'hypothèse que STAU1 permet le recrutement de FOXM1 au niveau de la région 3'UTR afin de promouvoir la dégradation de l'ARNm, une expérience d'immunoprécipitation d'ARN (RIP) peut être réalisée dans un contexte de « *MS2-tethering assay* ». Le principe est le suivant :

La protéine STAU1 peut être fusionnée avec la protéine MS2-CP dans le but de recruter celle-ci sur l'ARNm reporter R-Luc-8MS2. Les cellules peuvent être co-transfectées avec une construction permettant l'expression de FOXM1, une autre permettant l'expression de STAU1 en fusion avec la protéine MS2-CP et une troisième permettant l'expression du transcrit rapporteur R-Luc-8MS2. Ainsi, si l'ARNm rapporteur est détecté par RT-qPCR après immunoprécipitation de FOXM1 uniquement dans des cellules exprimant STAU1 en fusion avec MS2-CP, cela démontrerait que le recrutement de STAU1 au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm rapporteur promeut le recrutement de FOXM1 sur cette région 3'UTR de cet ARNm rapporteur. Ce qui montrerait que STAU1 permet le recrutement de FOXM1 au niveau de l'ARNm.

L'interaction de FOXM1 avec STAU1 pourraient aussi être testée en absence de facteurs clés intervenant dans la voie de dégradation des ARNm SMD. Ainsi, des co-IP réalisées à partir du lysats cellulaire de cellules transfectées avec les constructions encodant FOXM1 et STAU1 mais également avec un siRNA dirigé contre un de ses facteurs, par exemple le facteur clé de cette voie SMD, UPF1. L'interaction de FOXM1 avec ces facteurs clés pourraient également être testée par co-IP et/ou gPCA. Si certaines interactions sont montrées, la caractérisation de celles-ci pourrait également mise en place. Cela permettrait de caractériser le lien que FOXM1 pourrait potentiellement avoir avec la voie SMD.

Enfin, une perspective plus globale après avoir caractérisé le rôle de FOXM1 dans la dégradation de l'ARNm serait de tester d'autres facteurs de transcription qui pourrait potentiellement être impliqués dans ce processus de dégradation des ARNm.

IV. Bibliographie

IV. Bibliographie

- Anders, L., Ke, N., Hydbring, P., Choi, Y. J., Widlund, H. R., Chick, J. M., Zhai, H., Vidal, M., Gygi, S. P., Braun, P., & Sicinski, P. (2011). A Systematic Screen for CDK4/6 Substrates Links FOXM1 Phosphorylation to Senescence Suppression in Cancer Cells. *Cancer Cell*, 20(5), 620–634. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.001>
- Anderson, J. R., Mukherjee, D., Muthukumaraswamy, K., Moraes, K. C. M., Wilusz, C. J., & Wilusz, J. (2006). Sequence-specific RNA binding mediated by the RNase PH domain of components of the exosome. *Rna*, 12(10), 1810–1816. <https://doi.org/10.1261/rna.144606>
- Anderson, J. S. J., & Parker, R. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *The EMBO Journal*, 17(5), 1497–1506. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1497>
- Balagopal, V., Fluch, L., & Nissan, T. (2012). Ways and means of eukaryotic mRNA decay. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(6), 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.01.001>
- Barger, C. J., Branick, C., Chee, L., & Karpf, A. R. (2019). Pan-cancer analyses reveal genomic features of FOXM1 overexpression in cancer. *Cancers*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/cancers11020251>
- Barreau, C., Paillard, L., & Osborne, H. B. (2005). AU-rich elements and associated factors: Are there unifying principles? *Nucleic Acids Research*, 33(22), 7138–7150. <https://doi.org/10.1093/nar/gki1012>
- Barreau, C., Watrin, T., Beverley Osborne, H., & Paillard, L. (2006). Protein expression is increased by a class III AU-rich element and tethered CUG-BP1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(3), 723–730. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.177>
- Barrett, L. W., Fletcher, S., & Wilton, S. D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(21), 3613–3634. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0990-9>
- Bella, L., Zona, S., Moraes, G. N. De, & Lam, E. W. (2014). *Seminars in Cancer Biology FOXM1 : A key oncofoetal transcription factor in health and disease*. 29, 32–39.
- Benayoun, B. A., Caburet, S., & Veitia, R. A. (2011). Forkhead transcription factors: Key players in health and disease. *Trends in Genetics*, 27(6), 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.03.003>
- Bentley, D. L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature Reviews Genetics*, 15(3), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nrg3662>
- Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(2), 142–148. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00279-4](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00279-4)
- Bernstein, P., & Ross, J. (1989). Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends in Biochemical Sciences*, 14(9), 373–377. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(89\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90011-X)

- Bertero, A., Brown, S., Madrigal, P., Osnato, A., Ortmann, D., Yiangou, L., Kadiwala, J., Hubner, N. C., Mozos, I. R. D. L., Sadée, C., Lenaerts, A., Nakanoh, S., Grandy, R., Farnell, E., Ule, J., Stunnenberg, H. G., Mendjan, S., & Vallier, L. (2018). controls m 6 A mRNA methylation in pluripotency. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nature25784>
- Boehm, V., & Gehring, N. H. (2016). Exon Junction Complexes: Supervising the Gene Expression Assembly Line. *Trends in Genetics*, 32(11), 724–735. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.09.003>
- Bregues, M., Teixeira, D., & Parker, R. (2005). *Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies*. 310(October), 486–490.
- Bresson, S., & Tollervey, D. (2018). Previews Tailing Off : PABP and CNOT Generate Cycles of mRNA Deadenylation. *Molecular Cell*, 70(6), 987–988. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.009>
- Cheadle, C., Fan, J., Cho-Chung, Y. S., Werner, T., Ray, J., Do, L., Gorospe, M., & Becker, K. G. (2005). Control of gene expression during T cell activation: Alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC Genomics*, 6, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-75>
- Chen, C. Y. A., & Shyu, A. Bin. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11), 465–470. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89102-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89102-1)
- Cheng, X. H., Black, M., Ustiyani, V., Le, T., Fulford, L., Sridharan, A., Medvedovic, M., Kalinichenko, V. V., Whitsett, J. A., & Kalin, T. V. (2014). SPDEF Inhibits Prostate Carcinogenesis by Disrupting a Positive Feedback Loop in Regulation of the Foxm1 Oncogene. *PLoS Genetics*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004656>
- Cho, H., Park, O. H., Park, J., Ryu, I., Kim, J., Ko, J., & Kim, Y. K. (2015). Glucocorticoid receptor interacts with PNRC2 in a ligand-dependent manner to recruit UPF1 for rapid mRNA degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(13), E1540–E1549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409612112>
- Chu, Y., & Corey, D. R. (2012). RNA sequencing: Platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Therapeutics*, 22(4), 271–274. <https://doi.org/10.1089/nat.2012.0367>
- Collart, M. A. (2016). The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *WIREs RNA*, 7(4), 438–454. <https://doi.org/10.1002/wrna.1332>
- Coller, J., & Wickens, M. (2007). Tethered Function Assays: An Adaptable Approach to Study RNA Regulatory Proteins. *Methods in Enzymology*, 429(07), 299–321. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)29014-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)29014-7)
- Costello, J., Castelli, L. M., Rowe, W., Kershaw, C. J., Talavera, D., Mohammad-Qureshi, S. S., Sims, P. F. G., Grant, C. M., Pavitt, G. D., Hubbard, S. J., & Ashe, M. P. (2015). Global mRNA selection mechanisms for translation initiation. *Genome Biology*, 16(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0559-z>
- Davis, R., & Shi, Y. (2014). The polyadenylation code: A unified model for the regulation of mRNA alternative polyadenylation. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 15(5), 429–437. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400076>

- Doma, M. K., & Parker, R. (2006). *Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation*. *440*(March), 561–564. <https://doi.org/10.1038/nature04530>
- Eaton, J. D., & West, S. (2018). An end in sight? Xrn2 and transcriptional termination by RNA polymerase II. *Transcription*, *9*(5), 321–326. <https://doi.org/10.1080/21541264.2018.1498708>
- Eick, D., & Geyer, M. (2013). The RNA polymerase II carboxy-terminal domain (CTD) code. *Chemical Reviews*, *113*(11), 8456–8490. <https://doi.org/10.1021/cr400071f>
- Eisen, T. J., Eichhorn, S. W., Subtelny, A. O., Lin, K. S., Mcgeary, S. E., Gupta, S., Bartel, D. P., Eisen, T. J., Eichhorn, S. W., Subtelny, A. O., Lin, K. S., & Mcgeary, S. E. (2020). The Dynamics of Cytoplasmic mRNA Metabolism Article The Dynamics of Cytoplasmic mRNA Metabolism. *Molecular Cell*, *77*(4), 786–799.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.005>
- Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*, *79*(1), 351–379. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060308-103103>
- Fu, Z., Malureanu, L., Huang, J., Wang, W., Li, H., van Deursen, J. M., Tindall, D. J., & Chen, J. (2008). Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nature Cell Biology*, *10*(9), 1076–1082. <https://doi.org/10.1038/ncb1767>
- Furuichi, Y., LaFiandra, A., & Shatkin, A. J. (1977). 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature*, *266*(5599), 235–239. <https://doi.org/10.1038/266235a0>
- Gao, M., Fritz, D. T., Ford, L. P., & Wilusz, J. (2000). Interaction between a Poly(A)-Specific Ribonuclease and the 5' Cap Influences mRNA Deadenylation Rates In Vitro The 3' poly(A) tail, in association with specific poly(A) binding protein(s) (PABP), also plays a broad role in. *Molecular Cell*, *5*, 479–488.
- Garneau, N. L., Wilusz, J., & Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*, 113. <https://doi.org/10.1038/nrm2104>
- Gartel, A. L. (2015). Targeting FOXM1 auto-regulation in cancer. *Cancer Biology and Therapy*, *16*(2), 185–186. <https://doi.org/10.4161/15384047.2014.987566>
- Genin, E. C., Caron, N., Vandenbosch, R., Nguyen, L., & Malgrange, B. (2014). Concise Review: Forkhead Pathway in the Control of Adult Neurogenesis. *STEM CELLS*, *32*(6), 1398–1407. <https://doi.org/10.1002/stem.1673>
- Gowravaram, M., Schwarz, J., Khilji, S. K., Urlaub, H., & Chakrabarti, S. (2019). Insights into the assembly and architecture of a Staufin-mediated mRNA decay (SMD)-competent mRNP. *Nature Communications*, *10*(1), 5054. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13080-x>
- Grant, G. D., Brooks, L., Zhang, X., Mahoney, J. M., Martyanov, V., Wood, T. A., Sherlock, G., Cheng, C., & Whitfield, M. L. (2013). Identification of cell cycle-regulated genes periodically expressed in U2OS cells and their regulation by FOXM1 and E2F transcription factors. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(23), 3634–3650. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-05-0264>
- Halasi, M., & Gartel, A. L. (2009). A novel mode of FoxM1 regulation: Positive auto-regulatory loop. *Cell Cycle*, *8*(12), 1966–1967. <https://doi.org/10.4161/cc.8.12.8708>

- Halasi, M., & Gartel, A. L. (2013). *FOX (M1) News — It Is Cancer*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0712>
- Hannenhalli, S., & Kaestner, K. H. (2009). The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nature Reviews Genetics*, *10*(4), 233–240. <https://doi.org/10.1038/nrg2523>
- Harigaya, Y., & Parker, R. (2010). No-go decay: A quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *1*(1), 132–141. <https://doi.org/10.1002/wrna.17>
- Herzel, L., Ottoz, D. S. M., Alpert, T., & Neugebauer, K. M. (2017). Splicing and transcription touch base: Co-transcriptional spliceosome assembly and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(10), 637–650. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.63>
- Houseley, J., LaCava, J., & Tollervy, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(7), 529–539. <https://doi.org/10.1038/nrm1964>
- Huang, L., & Wilkinson, M. F. (2012). *Regulation of nonsense-mediated mRNA decay*. *3*(December), 807–828. <https://doi.org/10.1002/wrna.1137>
- Jackson, B. C., Carpenter, C., Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2010). Update of human and mouse forkhead box (FOX) gene families. *Human Genomics*, *4*(5), 345. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-5-345>
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, *33*(3S), 245–254. <https://doi.org/10.1038/ng1089>
- Jiang, L., Wang, P., Chen, L., & Chen, H. (2014). *Down-regulation of FoxM1 by thiostrepton or small interfering RNA inhibits proliferation, transformation ability and angiogenesis, and induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells*. *7*(9), 5450–5460.
- Johansson, H. E., Liljas, L., & Uhlenbeck, O. C. (1997). RNA recognition by the MS2 phage coat protein. *Seminars in Virology*, *8*(3), 176–185. <https://doi.org/10.1006/smv.1997.0120>
- Karamyshev, A. L., & Karamysheva, Z. N. (2018). Lost in translation: Ribosome-associated mRNA and protein quality controls. *Frontiers in Genetics*, *9*(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00431>
- Karlič, R., Chung, H. R., Lasserre, J., Vlahoviček, K., & Vingron, M. (2010). Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(7), 2926–2931. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909344107>
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., & Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1–Upf1–eRF1–eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Development*, 355–367. <https://doi.org/10.1101/gad.1389006.phenotype>
- Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *2*(4), 571–589. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.4.571>
- Kiebler, M. A., Hemraj, I., Verkade, P., Ko, M., Fortes, P., Mario, R. M., & Dotti, C. G. (1999). *The Mammalian Staufen Protein Localizes to the Somatodendritic Domain of Cultured Hippocampal Neurons: Implications for Its Involvement in mRNA Transport*. *19*(1), 288–297.

- Kim, Y. K., Furic, L., Desgroseillers, L., Maquat, L. E., & York, N. (2005). *Mammalian Staufen1 Recruits Upf1 to Specific mRNA 3' UTRs so as to Elicit mRNA Decay*. *120*, 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.050>
- Kim, Y. K. I., & Maquat, L. E. (2019). *UPF1 Front and center in RNA decay: UPF1 in nonsense-mediated mRNA decay and beyond*. 407–422. <https://doi.org/10.1261/rna.070136.118>.
- Korver, W., Roose, J., Wilson, A., & Clevers, H. (1997). The winged-helix transcription factor trident is expressed in actively dividing lymphocytes. *Immunobiology*, *198*(1–3), 157–161. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(97\)80036-8](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(97)80036-8)
- Lam, E. W. F., Brosens, J. J., Gomes, A. R., & Koo, C. (2013). *Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony*. *13*(July), 482–495. <https://doi.org/10.1038/nrc3539>
- Laoukili, J., Alvarez, F. M., & Medema, R. (2011). FOXM1 (forkhead box M1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, *12*(6), 432–434. <https://doi.org/10.4267/2042/38597>
- Laoukili, Jamila, Alvarez, M., Meijer, L. A. T., Stahl, M., Mohammed, S., Kleij, L., Heck, A. J. R., & Medema, R. H. (2008). Activation of FoxM1 during G2 Requires Cyclin A/Cdk-Dependent Relief of Autorepression by the FoxM1 N-Terminal Domain. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(9), 3076–3087. <https://doi.org/10.1128/mcb.01710-07>
- Laoukili, Jamila, Kooistra, M. R. H., Brás, A., Kauw, J., Kerkhoven, R. M., Morrison, A., Clevers, H., & Medema, R. H. (2005). *FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability*. *7*(2). <https://doi.org/10.1038/ncb1217>
- Laoukili, Jamila, Stahl, M., & Medema, R. H. (2007). FoxM1: At the crossroads of ageing and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, *1775*(1), 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.08.006>
- Lee, S., & Vasudevan, S. (2013). Ten Years of Progress in GW/P Body Research. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *768*, 97–126. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5107-5>
- Lehmann, O. J., Sowden, J. C., Carlsson, P., Jordan, T., & Bhattacharya, S. S. (2003). Fox's in development and disease. *Trends in Genetics*, *19*(6), 339–344. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00111-2)
- Liang, X., Peng, L., Baek, C.-H., & Katzen, F. (2013). Single step BP/LR combined Gateway reactions. *BioTechniques*, *55*(5), 265–268. <https://doi.org/10.2144/000114101>
- Liao, G.-B., Li, X.-Z., Zeng, S., Liu, C., Yang, S.-M., Yang, L., Hu, C.-J., & Bai, J.-Y. (2018). Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer. *Cell Communication and Signaling*, *16*(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0266-6>
- Lim, J., Chang, H., Kim, V. N., Yi, H., Park, J., Ha, M., Lim, J., Chang, H., & Kim, V. N. (2018). Article PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Article PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay. *Molecular Cell*, *70*(6), 1081-1088.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.009>

- Littler, D. R., Alvarez-Fernández, M., Stein, A., Hibbert, R. G., Heidebrecht, T., Aloy, P., Medema, R. H., & Perrakis, A. (2010). Structure of the FoxM1 DNA-recognition domain bound to a promoter sequence. *Nucleic Acids Research*, *38*(13), 4527–4538. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq194>
- Luo, Y., Na, Z., & Slavoff, S. A. (2018). P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry*, *57*(17), 2424–2431. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01162>
- Lv, C., Zhao, G., Sun, X., Wang, P., Xie, N., Luo, J., & Tong, T. (2016). Acetylation of FOXM1 is essential for its transactivation and tumor growth stimulation. *Oncotarget*, *7*(37), 60366–60382. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11332>
- Ma, R. Y. M., Tong, T. H. K., Cheung, A. M. S., Tsang, A. C. C., Leung, W. Y., & Yao, K. M. (2005). Raf/MEK/MAPK signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of FOXM1c. *Journal of Cell Science*, *118*(4), 795–806. <https://doi.org/10.1242/jcs.01657>
- Major, M. L., Lepe, R., & Costa, R. H. (2004). Forkhead Box M1B Transcriptional Activity Requires Binding of Cdk-Cyclin Complexes for Phosphorylation-Dependent Recruitment of p300 / CBP Coactivators. *24*(7), 2649–2661. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.2649>
- Maniatis, T., & Reed, R. (2002). Expression Machines. *Nature*, *416*(6880), 499–506. <https://doi.org/10.1038/416499a>
- Mariavelle, E. (2017). *Towards a new model of gene expression regulation: The transcription factor FOXM1 might be able to regulate mRNA decay.*
- Mariavelle, E. (2019). *Role of FOXM1 in mRNA decay.*
- Matthias, G., G., B. C., & Gideon, D. (1994). The mRNA Poly(A)-binding Protein: localization, abundance, and RNA-Binding Specificity. In *Experimental cell research* (p. 8).
- Mayya, V. K., & Duchaine, T. F. (2019). Ciphers and executioners: How 3' UTR untranslated regions determine the fate of messenger RNAs. *Frontiers in Genetics*, *10*(January), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00006>
- Moon, B. S., Bai, J., Cai, M., Liu, C., Shi, J., & Lu, W. (2018). Kruppel-like factor 4-dependent Staufen1-mediated mRNA decay regulates cortical neurogenesis. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02720-9>
- Moteki, S., & Price, D. (2002). Functional coupling of capping and transcription of mRNA. *Molecular Cell*, *10*(3), 599–609. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00660-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00660-3)
- Mugridge, J. S., Collier, J., & Gross, J. D. (2018). Structural and molecular mechanisms for the control of eukaryotic 5'–3' mRNA decay. *Nature Structural and Molecular Biology*, *25*(12), 1077–1085. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0164-z>
- Németh, A., & Längst, G. (2004). Chromatin higher order structure: Opening up chromatin for transcription. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, *2*(4), 334–343. <https://doi.org/10.1093/bfpg/2.4.334>
- Nojima, T., Hirose, T., Kimura, H., & Hagiwara, M. (2007). The interaction between cap-binding complex and RNA export factor is required for intronless mRNA export. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(21), 15645–15651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700629200>

- Pan, H., Zhu, Y., Wei, W., Shao, S., & Rui, X. (2018). Transcription factor FoxM1 is the downstream target of c-Myc and contributes to the development of prostate cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12957-018-1352-3>
- Park, E., Gleghorn, M. L., & Maquat, L. E. (2013). *Staufen2* functions in *Staufen1*-mediated mRNA decay by binding to itself and its paralog and promoting UPF1 helicase but not ATPase activity. 110(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.1213508110>
- Park, E., & Maquat, L. E. (2013). Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 4(4), 423–435. <https://doi.org/10.1002/wrna.1168>
- Park, O. H., Park, J., Yu, M., An, H., Ko, J., & Kim, Y. K. (2016). Identification and molecular characterization of cellular factors required for glucocorticoid receptor-mediated mRNA decay. 2093–2105. <https://doi.org/10.1101/gad.286484.116>.
- Park, P. J. (2009). ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), 669–680. <https://doi.org/10.1038/nrg2641>
- Peters, J. M. (1994). Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(9), 377–382. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90115-5)
- Plaschka, C., Hantsche, M., Dienemann, C., Burzinski, C., Plitzko, J., & Cramer, P. (2016). Transcription initiation complex structures elucidate DNA opening. *Nature*, 533(7603), 353–358. <https://doi.org/10.1038/nature17990>
- Prof. Franck Dequiedt, cours de « Biologie moléculaire du gène », 2017
- Rambout, X., Dequiedt, F., & Maquat, L. E. (2018a). Beyond Transcription: Roles of Transcription Factors in Pre-mRNA Splicing. *Chemical Reviews*, 118(8), 4339–4364. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00470>
- Rambout, X., Dequiedt, F., & Maquat, L. E. (2018b). Beyond Transcription: Roles of Transcription Factors in Pre-mRNA Splicing. *Chemical Reviews*, 118(8), 4339–4364. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00470>
- Rambout, X., Detiffe, C., Bruyr, J., Mariavelle, E., Cherkaoui, M., Brohée, S., Demoitié, P., Lebrun, M., Soin, R., Lesage, B., Guedri, K., Beullens, M., Bollen, M., Farazi, T. A., Kettmann, R., Struman, I., Hill, D. E., Vidal, M., Krays, V., ... Dequiedt, F. (2016). The transcription factor ERG recruits CCR4–NOT to control mRNA decay and mitotic progression. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23, 663. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3243>
- Raychaudhuri, P., & Park, H. J. (2011). FoxM1: A master regulator of tumor metastasis. *Cancer Research*, 71(13), 4329–4333. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0640>
- Reed, R. (2003). Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(3), 326–331. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00048-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00048-6)
- Rubie, C., Kempf, K., Hans, J., Su, T., Tilton, B., Georg, T., Brittner, B., Ludwig, B., & Schilling, M. (2005). Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and

- hepatic tissues. *Molecular and Cellular Probes*, 19(2), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.10.001>
- Sadasivam, S., Duan, S., & DeCaprio, J. A. (2012). The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. *Genes and Development*, 26(5), 474–489. <https://doi.org/10.1101/gad.181933.111>
- Saito, S., Hosoda, N., & Hoshino, S. I. (2013). The Hbs1-Dom34 protein complex functions in non-stop mRNA decay in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17832–17843. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448977>
- Schoenberg, D. R., & Maquat, L. E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 246–259. <https://doi.org/10.1038/nrg3160>
- Schwanhüsser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., & Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10098>
- Shatkin, A. J., & Manley, J. L. (2000). The ends of the affair: Capping and polyadenylation. *Nature Structural Biology*, 7(10), 838–842. <https://doi.org/10.1038/79583>
- She, M., Decker, C. J., Sundramurthy, K., Liu, Y., Chen, N., Parker, R., & Song, H. (2004). Crystal structure of Dcp1p and its functional implications in mRNA decapping. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(3), 249–256. <https://doi.org/10.1038/nsmb730>
- Sheth, U., & Parker, R. (2003). Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies. *Science*, 300(5620), 805 LP – 808. <https://doi.org/10.1126/science.1082320>
- Shoemaker, C. J., & Green, R. (2012). Translation drives mRNA quality control. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(6), 594–601. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2301>
- Smirnov, A., Panatta, E., Lena, A., Castiglia, D., Di Daniele, N., Melino, G., & Candi, E. (2016). FOXM1 regulates proliferation, senescence and oxidative stress in keratinocytes and cancer cells. *Aging*, 8(7), 1384–1397. <https://doi.org/10.18632/aging.100988>
- Song, X., Fiati Kenston, S. S., Zhao, J., Yang, D., & Gu, Y. (2017). Roles of FoxM1 in cell regulation and breast cancer targeting therapy. *Medical Oncology*, 34(3), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-0888-3>
- Tan, Y., Raychaudhuri, P., & Costa, R. H. (2007). Chk2 Mediates Stabilization of the FoxM1 Transcription Factor To Stimulate Expression of DNA Repair Genes. *Molecular and Cellular Biology*, 27(3), 1007–1016. <https://doi.org/10.1128/mcb.01068-06>
- Tang, S. J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N., Schuman, E., & Hhmi, C. (2001). A Role for a Rat Homolog of *Staufen* in the Transport of RNA to Neuronal Dendrites. 32, 463–475.
- Teixeira, D., & Parker, R. (2007). Analysis of P-Body Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 18(6), 2274–2287. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-03-0199>
- Tharun, S., & Parker, R. (2001). Targeting an mRNA for Decapping: Displacement of Translation Factors and Association of the Lsm1p–7p Complex on Deadenylation Yeast mRNAs. *Molecular Cell*, 8(5), 1075–1083. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00395-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00395-1)

- Tian, B., & Graber, J. H. (2012). Signals for pre-mRNA cleavage and polyadenylation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(3), 385–396. <https://doi.org/10.1002/wrna.116>
- Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., & Inada, T. (2012). Dom34: Hbs1 Plays a General Role in Quality-Control Systems by Dissociation of a Stalled Ribosome at the 3' End of Aberrant mRNA. *Molecular Cell*, 46(4), 518–529. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.03.013>
- Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P., & Nissbeck, M. (2013). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(2), 192–209. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.771132>
- Wahle, E., & Winkler, G. S. (2013). *Biochimica et Biophysica Acta RNA decay machines : Deadenylation by the Ccr4 – Not and Pan2 – Pan3 complexes* ☆. 1829, 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.01.003>
- Wang, J., Li, W., Zhao, Y., Kang, D., Fu, W., Zheng, X., Pang, X., & Du, G. (2018). Members of FOX family could be drug targets of cancers. *Pharmacology and Therapeutics*, 181(August 2017), 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.003>
- Wang, Zhong, Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Wang, Zuoren, Jiao, X., Carr-Schmid, A., & Kiledjian, M. (2002). The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 12663 LP – 12668. <https://doi.org/10.1073/pnas.192445599>
- Wang, Zuoren, Kiledjian, M., & Road, A. (2001). *Functional Link between the Mammalian Exosome and mRNA Decapping*. 107, 751–762.
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., & Sachs, A. B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular Cell*, 2(1), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80122-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80122-7)
- West, S., Gromak, N., & Proudfoot, N. J. (2004). Human 5' → 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature*, 432(7016), 522–525. <https://doi.org/10.1038/nature03035>
- Wierstra, I. (2013). Cyclin D1/Cdk4 increases the transcriptional activity of FOXM1c without phosphorylating FOXM1c. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(4), 753–759. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.037>
- Wierstra, I., & Alves, J. (2006). Transcription factor FOXM1c is repressed by RB and activated by cyclin D1/Cdk4. *Biological Chemistry*, 387(7), 949–962. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.119>
- Yamashita, A., Chang, T., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C. A., & Shyu, A. (2005). *Concerted action of poly (A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover*. 12(12). <https://doi.org/10.1038/nsmb1016>
- Yang, C.-Y., Ramamoorthy, S., Boller, S., Rosenbaum, M., Rodriguez Gil, A., Mittler, G., Imai, Y., Kuba, K., & Grosschedl, R. (2016). Interaction of CCR4-NOT with EBF1 regulates gene-specific transcription and

mRNA stability in B lymphopoiesis. *Genes & Development*, 30(20), 2310–2324. <https://doi.org/10.1101/gad.285452.116>

Yi, H., Park, J., Ha, M., Lim, J., Chang, H., & Kim, V. N. (2018). PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay. *Molecular Cell*, 70(6), 1081-1088.e5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.009>

Zhang, J., & Manley, J. L. (2013). Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. *Cancer Discovery*, 3(11), 1228–1237. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0253>

Zhang, W., Duan, N., Song, T., Li, Z., Zhang, C., & Chen, X. (2017). The emerging roles of forkhead box (FOX) proteins in osteosarcoma. *Journal of Cancer*, 8(9), 1619–1628. <https://doi.org/10.7150/jca.18778>

Zhang, X., Zhang, L., Du, Y., Zheng, H., Zhang, P., Sun, Y., Wang, Y., Chen, J., Ding, P., Wang, N., Yang, C., Huang, T., Yao, X., Qiao, Q., Gu, H., Cai, G., Cai, S., Zhou, X., & Hu, W. (2017). A novel FOXM1 isoform, FOXM1D, promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis through ROCKs activation in colorectal cancer. *Oncogene*, 36(6), 807–819. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.249>

Zona, S., Bella, L., Burton, M. J., Moraes, G. N. De, & Lam, E. W. (2014). *Biochimica et Biophysica Acta FOXM1 : An emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance*. 1839, 1316–1322. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.09.016>

V. Annexes

V. Annexes

Annexe 1. Cartes des différents plasmides

Figure I. Carte du plasmide pDONR223

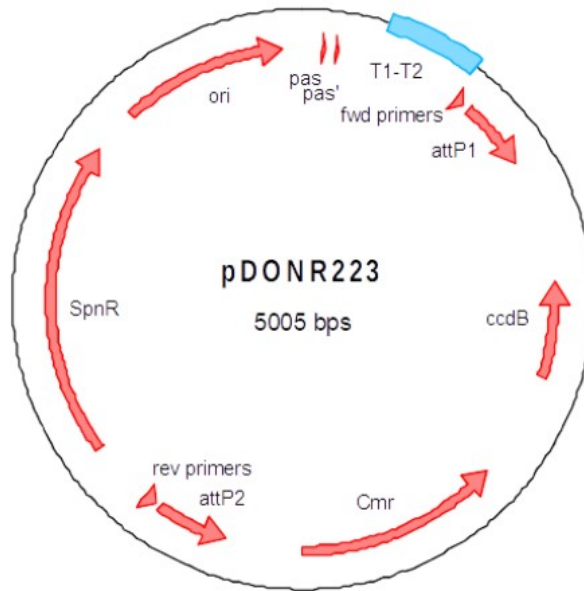


Figure II. Carte du plasmide pdest1899

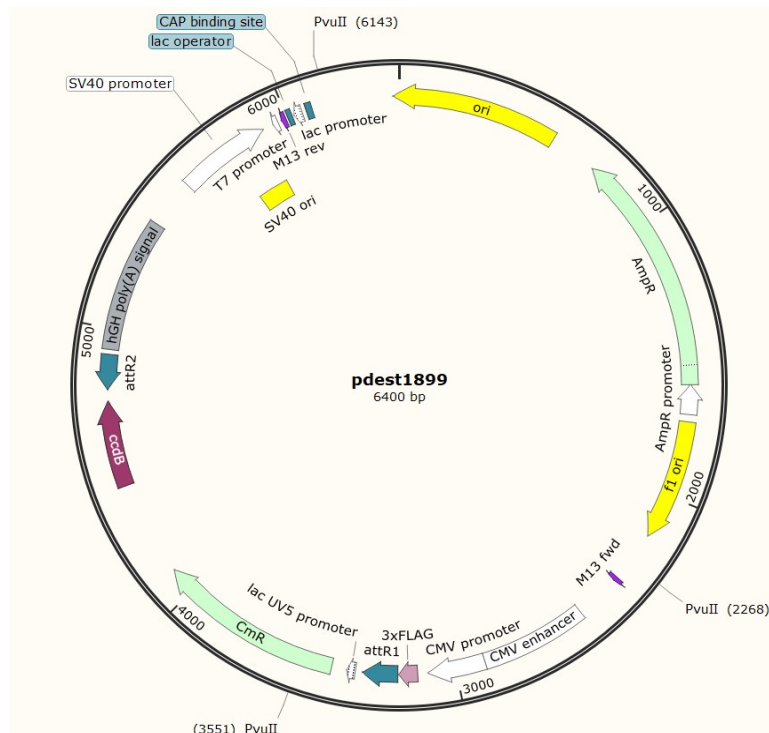
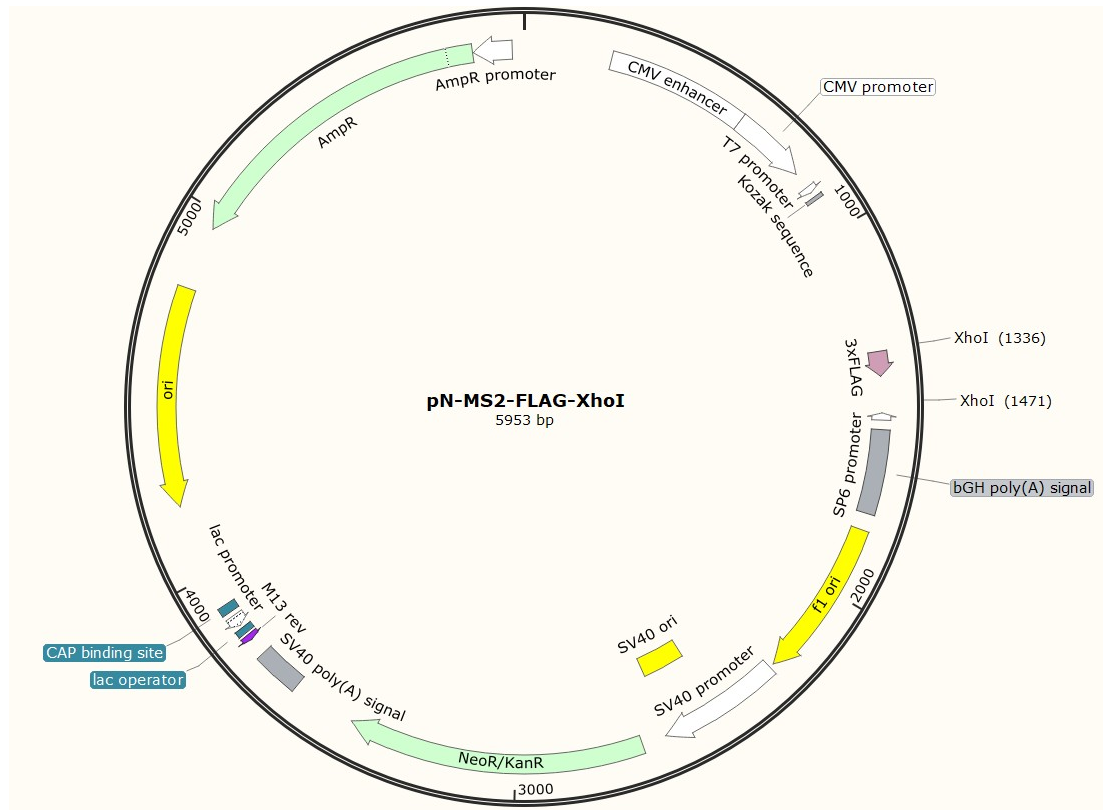


Figure III. Carte du plasmide pN-MS2-CP



Annexe 2. Anticorps pour le western blot

Tableau I. Anticorps primaires

Antigène	Dilution	Hôte	Milieu de dilution	Source	Référence
FLAG	1/1000	Mouse	TBS-T – lait 5 %	Sigma	F3165
HA	1/500	Rat	TBS-T – BSA 4 %	Roche	11867423001

Tableau II. Anticorps secondaires

Anticorps	Dilution	Source	Référence
Anti-mouse IgG HRP-linked	1/10000	Cell Signaling	7076S
Anti-rat IgG HRP-linked	1/10000	Cell Signaling	7077S

Annexe 3. Liste des séquences nucléotidiques

- **FOXM1c**

atgaaaactagccccctgcccactgattctcaaaagacggaggctgccccttctgttcaaaatgcccgaagtgaacatcagaggaggaacctaaag
agatccccctgcccacagaggatctaatacagcagaggcctccaaggaagtggcagagtgccaactcttgcaagtttccagctgggatcaagattattaac
caccaccatgcccacacgcaagtagtgccatcccccaacaatgctaataattcacagcatcatcacagcactgactgccaaggaaaagagagtgcc
agtagtgggcccaaaaattcatcctcatcagctgtgggggagccccactcagcctccaggactccggcctcaaacccaaaccagctatgatgccaaa
aggacagaagtgaacctggagaccttgggacaaaacctgcagctaggatgtgaatcttcttagaccacctggagcccttggcagcagaaaacgggag
acctgtgcagatggtgagcagcaggctgcactatcaacaatagcctatccaacatccagtggttgcgaaagatgagttctgatggactgggctccccg
agcatcaagcaagagatggaggaaaaggagaattgtcacctggagcagcagcaggttaaggttaggagccttcgagaccatcagcgtcctggcagAAC
tctgtgtctgagcggccaccctactcttacatggccatgatacaattcgccatcaacagcactgagaggaagcgcagcttggaaagacatctatacg
tggattgaggaccactttccctactttaagcacattgccaagccaggctggaagaactccatc**ggccca**aacctt**gcc**ctgcacgacatgtttgtccgg
gagacgtctgccaatggcaaggtctccttctggaccattcaccocagtgccaaccgctacttgacattggaccaggtgtttaagccactggaccaggg
tctccacaattgcccagcacttggaaatcacagcagaaaacgaccgaatccagagctccgcccgaacatgaccatcaaacccaactccccctgggcgca
cggcggaaagatgaagccactgctaccacgggtcagctcatacctggtagctatccagttccgggtgaaccagtcactggtgttgagccctcggtgaag
gtgccattgccccggcgcttccctcatgagctcagagcttgcccgcctatagcaagcagctccgcattgcccccaaggtgctgctagctgaggagggg
atagctcctcttcttctgagcagcagggaaagaggagaactcctgtttggagaagggttttctccttggctccagttcagactatcaaggaggaa
gaaatccagcctggggaggaatgccacacttagcagacccatcaaagtggagagcctcccttggaaagagtgccctccccggccccatctttcaaa
gaggaatcatctcactcctgggaggtctgccaatctcccaccccaagaccaagaagtcctacagtggttaggtcccccaaccgggtgtgtctcg
gaaatgcttgtgattcaacacagggagaggaggagagcgggtctcggaggaaacagcatctactgcctcctctgtgtggatgagccggagctgctc
ttctcagaggggcccagctacttcccgcctggccgcagagctcccgttccagcagactcctctgaccctgctcccagctcagctactcccaggaagtg
ggaggaccttttaagacaccattaaggaacgctgcccactctcctccaccccagcaaatctgtcctcccagaacccctgaatcctggaggctcagc
ccccagccaaagtaggggactggattcagcccagtaaaaacctcccagggtgctctgacccttgctgacccttggggctgatggatctcagc
accactccttgcaagtgctcccccttgaatcaccgcaaggtcctcagttcagaaccttagacctcatctcgtcccccttggcaactcttct
cctcagatatagagctccccagccaggtccccggagccacaggtttctggccttgacgcaatcgttctctgacagaagcctggctcctggacaca
atgaaatgacagcctcagcaagatcctgctggacatcagcttctcctggcctggagcaggaaccactggccctgacaacatcaactggtcccagttatt
cctgagctacagtag

- **FOXM1c DBD MT**

Séquence obtenue à partir du séquençage du pDONR223-FOXM1c DBD MT

atgaaaactagccccctgcccactgattctcaaaagacggaggctgccccttctgttcaaaatgcccgaagtgaacatcagaggaggaacctaaag
agatccccctgcccacagaggatctaatacagcagaggcctccaaggaagtggcagagtgccaactcttgcaagtttccagctgggatcaagattattaac
caccaccatgcccacacgcaagtagtgccatcccccaacaatgctaataattcacagcatcatcacagcactgactgccaaggaaaagagagtgcc
agtagtgggcccaaaaattcatcctcatcagctgtgggggagccccactcagcctccaggactccggcctcaaacccaaaccagctatgatgccaaa
aggacagaagtgaacctggagaccttgggacaaaacctgcagctaggatgtgaatcttcttagaccacctggagcccttggcagcagaaaacgggag
acctgtgcagatggtgagcagcaggctgcactatcaacaatagcctatccaacatccagtggttgcgaaagatgagttctgatggactgggctccccg
agcatcaagcaagagatggaggaaaaggagaattgtcacctggagcagcagcaggttaaggttaggagccttcgagaccatcagcgtcctggcagAAC
tctgtgtctgagcggccaccctactcttacatggccatgatacaattcgccatcaacagcactgagaggaagcgcagcttggaaagacatctatacg
tggattgaggaccactttccctactttaagcacattgccaagccaggctggaagaactccatc**ggccgc**aacctt**gcc**ctgcacgacatgtttgtccgg
gagacgtctgccaatggcaaggtctccttctggaccattcaccocagtgccaaccgctacttgacattggaccaggtgtttaagccactggaccaggg
tctccacaattgcccagcacttggaaatcacagcagaaaacgaccgaatccagagctccgcccgaacatgaccatcaaacccaactccccctgggcgca
cggcggaaagatgaagccactgctaccacgggtcagctcatacctggtagctatccagttccgggtgaaccagtcactggtgttgagccctcggtgaag
gtgccattgccccggcgcttccctcatgagctcagagcttgcccgcctatagcaagcagctccgcattgcccccaaggtgctgctagctgaggagggg
atagctcctcttcttctgagcagcagggaaagaggagaactcctgtttggagaagggttttctccttggctccagttcagactatcaaggaggaa
gaaatccagcctggggaggaatgccacacttagcagacccatcaaagtggagagcctcccttggaaagagtgccctccccggccccatctttcaaa
gaggaatcatctcactcctgggaggtctgccaatctcccaccccaagaccaagaagtcctacagtggttaggtcccccaaccgggtgtgtctcg
gaaatgcttgtgattcaacacagggagaggaggagagcgggtctcggaggaaacagcatctactgcctcctctgtgtggatgagccggagctgctc
ttctcagaggggcccagctacttcccgcctggccgcagagctcccgttccagcagactcctctgaccctgctcccagctcagctactcccaggaagtg
ggaggaccttttaagacaccattaaggaacgctgcccactctcctccaccccagcaaatctgtcctcccagaacccctgaatcctggaggctcagc

ccccagccaaagtaggggactggatttcagcccagtaaaaacctcccagggtgcctctgacccttgctgacccctggggctgatggatctcagc
accactcccttgcaaagtgtcccccttgaatcaccgcaaaggctcctcagttcagaaccttagacctcatctccgtcccttggcaactcttct
ccctcagatataagcgtccccaaagcaggtccccggagccacaggtttctggccttgacgcaaatcgttctctgacagaaggcctggctcctggacaca
atgaatgacagcctcagcaagatcctgtggacatcagcttctggcctggacgaggaccactgggcctgacaacatcaactggccagtttatt
cctgagctacagtca

- **FOXM1c ΔDBD**

atgaaaactagccccctgcccactgattctcaaaagacggaggctgccccctcctgttcaaaatgccccaaagtgaacatcagaggaggaacctaaag
agatccccctgcccacagaggtctaatcaagcagaggcctccaaggaagtggcagagttccaactcttgcaagtttccagctgggatacaagattattaac
caccaccatgcccacacgcaagtagtggccatccccacaatgctaataatcacagcatcatcacagcactgactgccaagggaaaagagagtggc
agtagtgggcccacaaatctcatcctcatcagctgtgggggagcctctgccaatggcaaggtctccttctggaccattcaccctcagtcacaaccgctac
ttgacattggaccaggtgtttaaagcactggaccagggtctccacaattgcccagcacttggaaatcacagcagaaaagaccgaatccagagctccgc
cggaaatgaccatcaaaacgcaactccccctggcgacggcggaagatgaagccactgctaccacgggtcagctcatacctggtacctatccagttc
ccggtgaaccagtcactggtgtgacagccctcgtgaaggtgccattgcccctggcggttccctcatgagctcagagctgcccgcatagcaagcga
gtccgcatgccccaaaggtgctgctagctgaggggtagctcctcttctctgacgagaccagggaaaagaggagaaactcctgttggagaaggg
tttctcctttgcttccagttcagactatcaaggaggaagaaatccagcctggggaggaatgccacacttagcagaccatcaagtgagagaccct
cccttgaagagtggccctccccgccccatcttcaagaggaatcatctcactcctgggaggttcctcccaatctcccaccccaagaccaagaag
tcctacagtgggcttagtccccacccgggtgtctcggaaatgcttgtgattcaacaaggagagggagggagaggagccggtctcggaggaaacag
catctactgcctccctgtgtggatgagccggagctgctcttctcagagggcccagtaacttcccgtggcgagagctcccgttcccagcagactcc
tctgaccctgcctcccagctcagctactcccaggaagtgggagaccctttaaagacaccatgaagaaacgctgcccatctcctcccaccccgagcaaa
tctgtcctcccagaacctgaatcctggaggctcacgccccagccaaagttaggggactggatttcagcccagtaaaaacctcccaggggtgcctct
gacccttgctgacccctggggtgatggatctcagaccactccctgcaaaagtgtcccccttgaatcacgcaaaggctcctcagttcagaa
cccttagacctcatctccgtcccttggcaactcttctccctcagatataagcgtccccaaagcaggtccccggagccacaggtttctggccttgca
gccaatcgttctctgacagaaggcctggtcctggacacaatgaatgacagcctcagcaagatcctgctggacatcagcttctcctggcctggacgaggac
ccactgggcctgacaacatcaactggccagtttattcctgagctacagttag

- **STAU1**

atgtctcaagttcaagtgcaagttcagaacccatctgctgctctcagggagccaaatactgaacaagaaccagttctctctcacagcctttgatg
agtattccttctactactagctctctgcccctgaaaaatgcaggttagaccattcaaaactctgctttaccctctgcatctattacatccaccagtgca
gctgcagaagcataaccctactgtagaactaaatgcactgtgcatgaaacttgaaaaaaaccaatgtataagcctgttgacccttactctcgatg
cagtcacataactacaacatgagaggaggtgcttcccccgaggtacttttaccatcttccagttccaccttactttatcaagtggaactttct
gtgggaggacagcaatataatggcaagaaagacaagacaggtgccaacacagatgctgctgccaagcggtgaggatcctgcagaatgagccctg
ccagagaggtgagggtgaatggaagagaatccgaagaagaaaatctcaataaatctgaataagtcaagtggttgagatgcaactaaacggaacttg
cctgtgaatctcaggtgccccgggagagtgcccacccacatgaagaactttgtgaccaaggttccggtggggagttgtgggggaaggtgaaggg
aaaagcaagaagatttcaagaaaaatgcccacatagctgttcttgaggagctgaagaagttaccgcccctgctgagttgaacagagtaaaagcctaga
atcaaaaaagaaaaaaaaccatagtcaggccacagacaagcccagaatattggccaggggatcaatccgattagccgactggcccagatccagcaggca
aaaaagagaaggagccagagtacacgctcctcacagagcagagcctcccgcgcccagggagtttgatgacaggtgaaggttgaaaccacactgca
gaaggaacgggcaccaacaagaaggtggccaagcgaatgcagccgagaacatgctggagatccttggtttcaaagtcccgcagggcagcccacaaa
cccgactcaagtcagagagagaagacaccataaagaaaccaggggatggaagaaaagtaacctttttgaaacctggctctggggatgaaaatgggact
agtaataaagaggatgagttcaggatgccttatctaagtcacagcagctgcctgctggaattcttcccaggtgcccaggtgcccaggtgttagga
gttagtcaaggacatcacacaaagattttaccagggcagctccgaatcctgccaaggccacggtaactgccatgatagcccagaggtgtgtgatggg
ggcactcggccacagccgagaccattttaaagaataacatctctcagggccagctacccatggacctctcacgagaccctctgagcaactggactat
cttccagagtccagggattccaggtggaatacaagacttccccaaaaacaagaacgaatttgatctcttatcaatgtctcctctcagccacct
ctgatcagccatggtatcggaaggtgtggagtcctgcatgatgctgctgcaacatcttaaagttgctgtctgagttggaccaacaagtagaca
gagatgccaagaacaggaacggaccaatgtctgtgtgtgggaggtgctga

Les nucléotides soulignés au niveau de la séquence nucléotidique FOXM1c DBD MT représentent les mutations générées afin de produire le triple mutant. Ceux soulignés dans la séquence de FOXM1c représentent les nucléotides non mutés correspondants.

Annexe 4. Enzymes de restriction

Tableau III. Tableau reprenant les différentes digestions réalisées par les enzymes de restriction ainsi que leur site de restriction et le tampon

Enzyme de restriction	Digestion	Site de restriction	Tampon
PvuII	pdest1899 – FOXM1c DBD MT pN-MS2-CP – FOXM1c DBD MT	5' - CAG/CTG - 3'	10x Buffer G
NheI	pDONR223 – FOXM1c DBD MT	5' - G/CTAGC - 3'	10x Buffer Tango
XhoI	pN-MS2-CP – FOXM1c DBD MT	5' - C/TCGAG - 3'	10x Buffer R
DpnI	Insert FOXM1c DBD MT – clonage en pN-MS2-CP	5' – Gm6A/TC - 3'	10x Buffer Tango

Annexe 5. Western Blot : Taille de protéines

Tableau IV. Taille des protéines

Protéines	Taille
STAU1	63.2 kDa
FOXM1c ΔDBD	74 kDa
FOXM1c DBD MT	84.1 kDa
FOXM1c	84.3 kDa

Annexe 6. Composition des gels de polyacrylamide pour le SDS-PAGE : gel de concentration et de séparation

Tableau V. Composition des gels de polyacrylamide pour le SDS-PAGE : gel de concentration et gel de séparation (12%)

	Gel de concentration 4 %	Gel de séparation 10 %
Acrylamide 40 %	0.48 mL	1.875 mL
0.5M Tris Reagent pH 6.8 ; 0.4% SDS (w/v)	1.25 mL	
1.5M Tris Reagent pH 8.8 ; 0.4% SDS (w/v)		1.875 mL
H ₂ O	3.22 mL	3 mL
Glycérol 50 %		0.75 mL
Temed	25 µL	25 µL
APS 10 %	5 µL	5 µL

Annexe 7. Aligement des séquences nucléotidiques de FOXM1c, FOXM1c DBD MT séquencés à partir du pDONR223-FOXM1c DBD MT et FOXM1c DBD MT

séquences à partir du pN-MS2-FOXM1c DBD MT

FOXM1c	atgaaaaactagccccctgcccactgattctcaaaaagacggaggctgcccttctctgtt	60	FOXM1c	tacatggccatgatacaattcgccatcaacagcactgagagggaagcgcgatgactttgaaa	780
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	atgaaaaactagccccctgcccactgattctcaaaaagacggaggctgcccttctctgtt	60	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	tacatggccatgatacaattcgccatcaacagcactgagagggaagcgcgatgactttgaaa	780
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	ATGAAAACTAGCCCCGTCCGCCACTGATCTCTAAAAGACGGAGGCTGCCCTTCTCTGTT	60	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	TACATGGCCATGATACAATTCCGCATCAACAGCACTGAGAGGAAGCGCATGACTTTGAAA	780
	*****			*****	
FOXM1c	caaaatgcccccaagtgaacatcagaggaggaacctaagagatccccctgcccaacaggag	120	FOXM1c	gacatctatactggtgattgaggaccactttccctactttaagcacattgccaagccaggc	840
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	caaaatgcccccaagtgaacatcagaggaggaacctaagagatccccctgcccaacaggag	120	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	gacatctatactggtgattgaggaccactttccctactttaagcacattgccaagccaggc	840
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CAAAATGCCCAAGTGAACATCAGAGGAGGAACCTAGAGATCCCTGCCCAACAGGAG	120	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GACATCTATACGTGGATTGAGGACCACCTTCCCTACTTTAAGCACATTGCCAAGCCAGGC	840
	*****			*****	
FOXM1c	tctaatcaagcagaggctccaaggaagtggcagagtcacaactcttgcagatttccagct	180	FOXM1c	tggaagaactccatccgccacaacctttccctgcacgacatggttgcggggagacgtct	900
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	tctaatcaagcagaggctccaaggaagtggcagagtcacaactcttgcagatttccagct	180	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	tggaagaactccatccgccccaaccttgcctgcacgacatggttgcggggagacgtct	900
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	TCTAATCAAGCAGAGGCTCCAAGGAGTGGCAGAGTCCGACTCTTGCAGTTTCCAGCT	180	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	TGGAAGAACTCCATCGCCGCAACCTTGCCCTGCACACATGTTTCCCGGGAGACGTCT	900
	*****			*****	
FOXM1c	gggatcaagattattaaccaccccaccatgcccaaacgcgaagttagtggccatccccaac	240	FOXM1c	gccaatggcaaggtctccttctggaccattaccaccagtgccaaccgctacttgacattg	960
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	gggatcaagattattaaccaccccaccatgcccaaacgcgaagttagtggccatccccaac	240	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	gccaatggcaaggtctccttctggaccattaccaccagtgccaaccgctacttgacattg	960
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GGGATCAAGATTATTAACCACCCACCATGCCCAACAGCGCAAGTAGTGGCCATCCCCAAC	240	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GCCAATGGCAAGGTCTCCTTCTGGACCATTACCCCCAGTGCCCAACCGCTACTTGACATTG	960
	*****			*****	
FOXM1c	aatgctaattattcacagcatcatcacagcactgactgccaagggaaaagagagtggcagt	300	FOXM1c	gaccaggtgtttaagccactggaccagggtctccacaattgcccgagcacttggaaatca	1020
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	aatgctaattattcacagcatcatcacagcactgactgccaagggaaaagagagtggcagt	300	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	gaccaggtgtttaagccactggaccagggtctccacaattgcccgagcacttggaaatca	1020
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	AATGCTAATATTACAGCATCATCACAGCACTACTGCCAAGGAAAAGAGAGTGGCAGT	300	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GACCAGGTGTTTAAGCCACTGGACCAGGCTCTCCACAAITGCCCGAGCACTTGGAGTCA	1020
	*****			*****	
FOXM1c	agtgggccccacaattcatctcatcagctgtggggagccccactcagcctccagga	360	FOXM1c	cagcagaaaacgccaatccagagctccgcccgaacatgaccatcaaaaccgaactcccc	1080
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	agtgggccccacaattcatctcatcagctgtggggagccccactcagcctccagga	360	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	cagcagaaaacgccaatccagagctccgcccgaacatgaccatcaaaaccgaactcccc	1080
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	AGTGGCCCAACAAATTCATCTCATCAGCTGTGGGGGAGCCCCAAGTCCAGCTCAGCTC	360	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CAGCAGAAAACGACCGAATCCAGAGCTCCGCGGACATGACCATCAAAACCGAAGTCCCC	1080
	*****			*****	
FOXM1c	ctccggcctcaaacccccaccagctatgatgccaagaagcagaagtgcacctggagacc	420	FOXM1c	ctgggagcagcgggaagatgaagcactgctaccagggctcagctcatacctggtagct	1140
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	ctccggcctcaaacccccaccagctatgatgccaagaagcagaagtgcacctggagacc	420	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	ctgggagcagcgggaagatgaagcactgctaccagggctcagctcatacctggtagct	1140
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CTCCGGCTCAAAACCCAAACAGCTATGATGCCAAAAGGACAGAGTGAACCTGACCGAC	420	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CTGGGACACCGCGGAAGATGAAGCCACTGCTACCACGGGAGCTCATACTGGTAGCT	1140
	*****			*****	
FOXM1c	ttgggacaaaacctgcagctaggatgtgaattctctagaccactggagccttttgc	480	FOXM1c	atccagttcccgtgtaaccagctcactgggtgtgagcctcctggtgaaggtgccattgccc	1200
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	ttgggacaaaacctgcagctaggatgtgaattctctagaccactggagccttttgc	480	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	atccagttcccgtgtaaccagctcactgggtgtgagcctcctggtgaaggtgccattgccc	1200
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	TTGGGACAAAACCTGCAGCTAGGATGTGAATCTCTTAGACCCTGGAGCCCTTTGC	480	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	ATCCAGTTCCCGTTGAACCACTGGTGTGACGCCCTCGGTGAAGGTGCCATTGCC	1200
	*****			*****	
FOXM1c	gagcagaaaacggagacctgtgcagatggtgagcagcagctgcactatcaacaatagc	540	FOXM1c	ctggcggcttccctcatgagctcagagcttgcgcccatagcaagcagctccgattgccc	1260
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	gagcagaaaacggagacctgtgcagatggtgagcagcagctgcactatcaacaatagc	540	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	ctggcggcttccctcatgagctcagagcttgcgcccatagcaagcagctccgattgccc	1260
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GAGCAGAAAACGGGAGACCTGTGCAGATGTTGAGGAGCAGAGCTGCACATCAACAATAGC	540	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CTGGCGCTTCCCTCATGAGCTCAGAGCTTGCGCCCATAGCAAGCAGAGTCCGATTTGCC	1260
	*****			*****	
FOXM1c	ctatccaacatccagtggtctgaaagatgagttctgtaggactgggtcccgagcactc	600	FOXM1c	ccaaggtgctgtagctgaggagggatagctcctcttcttctctgagaccagggaaa	1320
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	ctatccaacatccagtggtctgaaagatgagttctgtaggactgggtcccgagcactc	600	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	ccaaggtgctgtagctgaggagggatagctcctcttcttctctgagaccagggaaa	1320
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CTATCCAACATCCAGTGGCTTCGAAAGATGAGTTCGTAGGACTGGCTCCCGCAGCATC	600	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CCCAAGGTGCTGACTAGCTGAGGAGGGATAGCTCCTCTTTCTTCTCAGGACCCAGGAAA	1320
	*****			*****	
FOXM1c	aagcaagagatggaggaaaaggagaattgtccactggagcagcaggttaagggttag	660	FOXM1c	gaggagaaaactcctggttggagaagggttttctccttctgctccagttcagactatcaag	1380
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	aagcaagagatggaggaaaaggagaattgtccactggagcagcaggttaagggttag	660	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	gaggagaaaactcctggttggagaagggttttctccttctgctccagttcagactatcaag	1380
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	AAGCAAGAGATGGAGGAAAAGGAGAATTGTCCACTGGAGCAGCGACAGGTTAAGGTTGAG	660	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GAGGAGAAAACCTCTGTTTGGAGAAGGGTTTTCTCCCTTTGCTCCAGTTCAGACTATCAAG	1380
	*****			*****	
FOXM1c	gagccttcgagaccatcagcgtcctggcagaactctgtgtctgagcggccacctactct	720	FOXM1c	gaggaagaaatccagcctggggaggaatgccacacttagcgagcccatcaaaagtggag	1440
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	gagccttcgagaccatcagcgtcctggcagaactctgtgtctgagcggccacctactct	720	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	gaggaagaaatccagcctggggaggaatgccacacttagcgagcccatcaaaagtggag	1440
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GAGCCTTCGAGACCATCAGCGTCCCTGGCAGAACCTGTGTCTGAGCGGCCACCCACTCT	720	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GAGGAGAAAACCTCCAGCTGGGAGGAAATGCCACACTTAGCGAGCCCATCAAGTGGAG	1440
	*****			*****	

FOXM1c	agccctcccttgaagagtgccctccccggccccatctttcaaagaggaatcatctcac	1500	FOXM1c	ggcctggctcctggacacaatgaatgacagcctcagcaagatcctgctggacatcagcttt	2220
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	agccctcccttgaagagtgccctccccggccccatctttcaaagaggaatcatctcac	1500	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	ggcctggctcctggacacaatgaatgacagcctcagcaagatcctgctggacatcagcttt	2220
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	AGCCCTCCCTTGAAGAGTGGCCCTCCCCGGCCCCATCTTTCAAAGAGGAATCATCTCAC	1500	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GGCCTGGTCTCGGACACAATGAATGACAGCCTCAGCAAGATCCTGCTGGACATCAGCTTT	2220
	*****			*****	
FOXM1c	tctctgggaggtatcgtcccaatctcccaccocaaagaccocaaagagtcctacagtggtt	1560	FOXM1c	cctggcctggacgaggaccocactgggcccctgacaacatcaactgggtccagtttattcct	2280
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	tctctgggaggtatcgtcccaatctcccaccocaaagaccocaaagagtcctacagtggtt	1560	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	cctggcctggacgaggaccocactgggcccctgacaacatcaactgggtccagtttattcct	2280
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	TCTCTGGGAGGATTCGTCCCAATCTCCACCCCAAGACCCAAAGATCCTACAGTGGGCTT	1560	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CCTGGCCTGGACGAGGACCCACTGGGCCCTGACAAACATCAACTGGTCCAGTTTATTCTT	2280
	*****			*****	
FOXM1c	aggtcccaaccgggtgtgtctcggaaatgcttgtgattcaacacagggagagggaggag	1620	FOXM1c	gagctacagtag	2292
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	aggtcccaaccgggtgtgtctcggaaatgcttgtgattcaacacagggagagggaggag	1620	FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	gagctacagtag	2292
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	AGGTCCCAACCGGTGTGTCTCGGAAATGCTTGTGATTCAACACAGGGAGAGGAGGAG	1620	FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	GAGCTACAGTCA	2292
	*****			*****	
FOXM1c	aggagccggtctcggaggaaacagcatctactgcctccctgtgtggatgagccggagctg	1680			
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	aggagccggtctcggaggaaacagcatctactgcctccctgtgtggatgagccggagctg	1680			
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	AGGAGCCGCTCTCGGAGGAAACAGCATCTACTGCCTCCCTGTGGATGAGCCGAGCTG	1680			

FOXM1c	ctcttctcagaggggccagtagtacttcccgtgggcccagagctcccgttcccagcagac	1740			
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	ctcttctcagaggggccagtagtacttcccgtgggcccagagctcccgttcccagcagac	1740			
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CTCTTCTCAGAGGGGCCAGTACTTCCCCTGGGCCGAGAGCTCCCGTTCCCAGCAGAC	1740			

FOXM1c	tcctctgaccctgcctcccagctcagctactcccaggaagtgggaggaccttttaagaca	1800			
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	tcctctgaccctgcctcccagctcagctactcccaggaagtgggaggaccttttaagaca	1800			
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	TCCTCTGACCCTGCCTCCCAGCTCAGCTACTCCCAGGAAGTGGGAGGACCTTTTAAGACA	1800			

FOXM1c	cccattaaggaacgctgccatctcctccaccocagcaaatctgtcctcccagaacc	1860			
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	cccattaaggaacgctgccatctcctccaccocagcaaatctgtcctcccagaacc	1860			
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CCCATTAAAGGAACGCTGCCATCTCTCCACCCCGAGCAAATCTGTCTCCCAGAAC	1860			

FOXM1c	cctgaatcctggaggctcagcgcocccagccaaagttaggggactggatttcagcccagta	1920			
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	cctgaatcctggaggctcagcgcocccagccaaagttaggggactggatttcagcccagta	1920			
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CCTGAATCCTGGAGGCTCAGGCCCCAGCCAAAGTAGGGGACTGGATTTCAGCCCAGTA	1920			

FOXM1c	caaacctcccagggtgcctctgacccttgcctgacccctggggctgatggatctcagc	1980			
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	caaacctcccagggtgcctctgacccttgcctgacccctggggctgatggatctcagc	1980			
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CAAACCTCCCAGGGTGCCTCTGACCCCTTGCTGACCCCTGGGGCTGATGGATCTCAGC	1980			

FOXM1c	accactcccttgcaaatgctcccccccttgaatcacccgcaaggtcctcagttcagaa	2040			
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	accactcccttgcaaatgctcccccccttgaatcacccgcaaggtcctcagttcagaa	2040			
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	ACCACCTCCCTTGCAAAGTGTCCCCCCTTGAATCACCCGCAAAGGCTCCTCAGTTCAGAA	2040			

FOXM1c	cccttagacctcatctccgtccccttggcaactcttctccctcagatataagacgtcccc	2100			
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	cccttagacctcatctccgtccccttggcaactcttctccctcagatataagacgtcccc	2100			
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	CCCTTAGACCTCATCTCCGTCCCCTTGGCAACTCTTCTCCCTCAGATATAGACGTCCCC	2100			

FOXM1c	aagccaggctccccggagccacaggtttctggccttgacccaatcgttctctgacagaa	2160			
FOXM1c_DBD_MT_pDONR223	aagccaggctccccggagccacaggtttctggccttgacccaatcgttctctgacagaa	2160			
FOXM1c_DBD_MT_pN-MS2-CP	AAGCCAGGCTCCCCGGAGCCACAGGTTTCTGGCCTTGACCCAATCGTTCTCTGACAGAA	2160			

Les deux flèches montrent la présence de 2 mutations potentielles où l'adénine est remplacée par une guanine

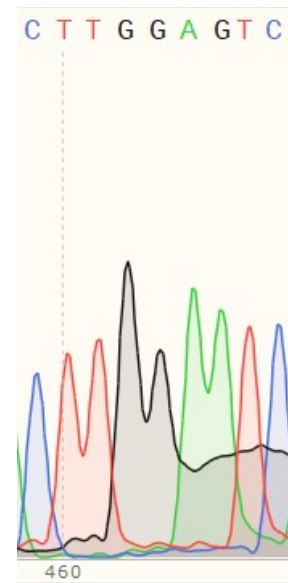
Annexe 8. Chromatogramme du séquençage de FOXM1c DBD MT à partir du pN-MS2-FOXM1c DBD MT -

Vérification de la séquence

Figure IV. Partie du chromatogramme montrant la première mutation non désirée détectée.



Figure V. Partie du chromatogramme montrant la deuxième mutation non désirée détectée.



Les mutations non désirées potentielles repérées dans l'alignement de l'annexe 7 (flèches bleues) ne sont, après vérification sur le chromatogramme issu du séquençage, pas présentes. Le résidu est bel et bien une adénine dans les deux cas.

Annexe 9. Western Blot des co-IP

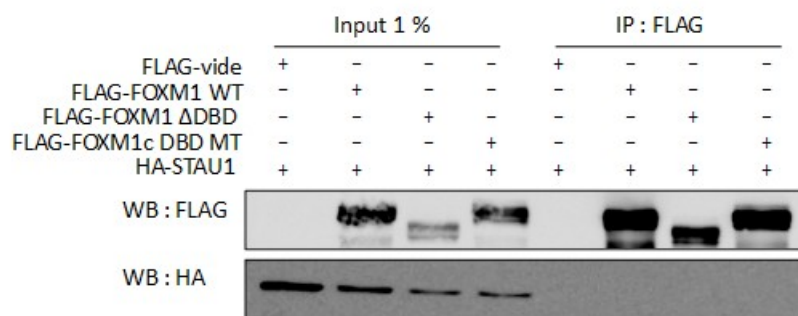


Figure VI. Co-immunoprécipitation de FOXM1 WT, de FOXM1 ΔDBD et de FOXM1c DBD MT avec STAU1 – Western Blot

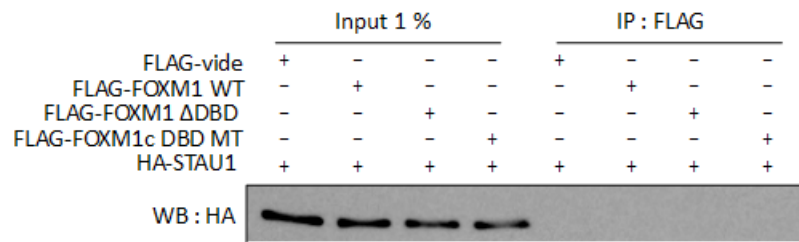


Figure VII. Co-immunoprécipitation de FOXM1 WT, de FOXM1 ΔDBD et de FOXM1c DBD MT avec STAU1 – 4 lavages à l’IPLS – Western Blot. Ce dernier a été arrêté avant la révélation avec l’anticorps anti-FLAG

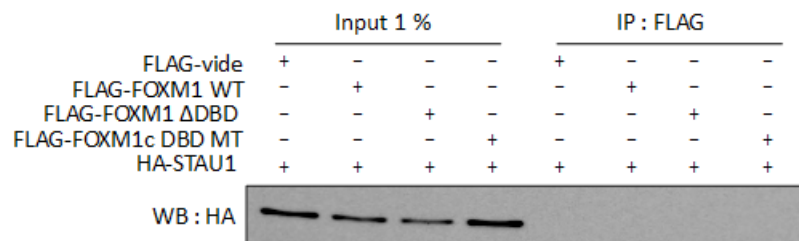


Figure VIII. Co-immunoprécipitation de FOXM1 WT, de FOXM1 ΔDBD et de FOXM1c DBD MT avec STAU1 – lavages utilisés précédemment – Western Blot. Ce dernier a été arrêté avant la révélation avec l’anticorps anti-FLAG