

Ecole doctorale de Biochimie, Biologie moléculaire et cellulaire, Bioinforma-  
tique et modélisation

# ÉPISSAGE ALTERNATIF DES ARN PRÉ-MESSAGERS INDUIT PAR LES AGENTS CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES GÉNOTOXIQUES: UN NOUVEAU RÔLE POUR C-JUN

Thèse réalisée par Adeline Deward  
dans le laboratoire de Virologie et Immunologie -  
GIGA-R

Pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences  
Année académique 2015-2016

Promoteur: Yvette Habraken

Jury: Marc Muller (Président)  
Pierre Close (Secrétaire)  
Martin Dutertre (Membre étranger)  
Véronique Kruys (Membre belge hors ULg)  
Alain Colige  
Marc Thiry  
Yvette Habraken (Promoteur)



# MERCI :)

**I**l était une fois... heu... en fait non, je ne dirais pas que ma thèse a été un conte de fées... Plutôt une belle aventure! Une de celle qui vous pousse à vous dépasser, à aller toujours plus loin, à apprendre sur les autres mais surtout sur soi,... à grandir en somme!

Oyé moussaillons... hissons les voiles, levons l'ancre et partons pour un voyage d'un peu plus de 4 ans en eaux pas toujours troubles... « Yo ho yo ho, a pirate's life for me »

J'aimerais tout d'abord remercier le Capitaine Jacques Piette pour m'avoir accueillie dans son navire, pour avoir su me pousser au delà de mes limites, vers de nouveaux horizons. Merci pour vos conseils et votre patience.

Merci bien sûr au contremaitre Yvette Habraken, pour m'avoir fait confiance en m'engageant mais aussi de m'avoir laissée faire évoluer le projet. Merci aussi pour vos conseils et pour avoir accepté de me laisser la liberté dont j'avais parfois besoin.

Cette histoire commence par une rencontre dans un couloir sombre... Nous étions quelques ex-étudiants à nous être rassemblés dans les couloirs du XX août pour remettre nos projets FRIA. Une ex-étudiante, un (tout) petit peu plus ancienne que les autres est arrivée avec une offre de recrutement: sa collègue cherchait un nouveau matelot... Merci Sylvie d'avoir été là au bon moment au bon endroit, et d'avoir, avec Yvette, décidé de me permettre de prendre part à ce voyage.

C'est ainsi qu'un master en poche, j'embarque pour une thèse. Les navires sont les endroits parfaits pour rencontrer des gens de tous les horizons...

À celles et ceux qui étaient là à mon arrivée, merci de m'avoir accueillie, d'avoir partager votre expérience et de m'avoir donné vos conseils. Merci également pour les sorties et les traditionnelles festivités du labo: merci à Hélène, Claude, Aurore, Fanny, Caro, Xavier, IsaG, Leila, Karim et Sarah.

Dans chaque aventure, il y a une personne, un mentor, celui qui voit en vous « les prémises de la grandeur » et vous pousse à vous dépasser. Merci à Laura, pour avoir cru en moi et m'avoir toujours encouragée dans les moments difficiles. Merci à Laurent, pour ton aide, pour nos nombreuses discussions scientifiques et alimentaires, merci pour le tournoi de Beach Basket. Merci surtout à vous deux d'avoir été là jusqu'un bout, merci pour les restos chinois, les visites à Lille et le voyage à Disney pour nos anniversaires.

Certains matelots ont fait (pratiquement) toute la traversée avec moi, nous avons partagé rires larmes, espoirs... et désespoirs. Nous avons franchis les tempêtes et profité des éclaircies. On s'est même permis quelques virées ressourçantes. Merci à Céline, tu as

toujours été un modèle, pour ton organisation mais surtout pour ta capacité à tout gérer: thèse, vie de famille, amitié. Merci pour tes recherches éclairés sur Google, tes conseils et ton écoute. Maintenant qu'on est arrivées à bon port, j'espère qu'on restera amies. Mon petit Greg, « t'es un mec bien » ;), merci pour ta gentillesse et tes conseils, pour ton attitude Grumpy et pour tes expressions incomparables! Cécile, merci pour tout, ta gentillesse, ta compréhension, ton sourire, je garde un souvenir merveilleux de notre escapade à Berlin, à ton tour maintenant d'accoster, courage tu y es presque! Merci Manu pour ton humour, pour les séances d'escalade et pour tes conseils, ton recul est toujours important quand on a l'impression de boire la tasse. Un énoooooorme merci à Cédric, tu es la figure de proue de la Viro, celui qui amène le sourire et l'espoir, j'ai eu la chance de partager ton bureau et ton U, on a beaucoup rit et un peu râlé aussi... Tu as toujours le mot pour rire et le recul qui nous permet de relativiser. Merci aussi à Marielle, pour les sorties, les séances d'escalades, les expériences amusantes et pour les longues discussions (... parfois inutiles).

Merci également à Catherine, pour son regard différent sur les choses, son recul, merci aussi de m'avoir permis d'animer la journée portes ouvertes.

J'ai eu la chance de ne pas naviguer seule, le LBTC n'était jamais bien loin. Au début du voyage, nous abordions de temps en temps, puis de plus en plus souvent jusqu'à lier nos bateaux complètement. Merci à Alain de m'avoir accueillie et de m'avoir fait confiance, merci de m'avoir confié de co-premier. Charlie, merci pour la supervision du projet, les conseils, ton aide et ton sourire. Maude, MERCIIIIIIIIIII, plus qu'une collaboratrice tu as été une véritable amie. Merci pour les rires, les larmes... et les rires jusqu'aux larmes, les manip du dimanches et en chambre froide, le shopping, le congrès en Italie où on papotait jusqu'à tard dans la nuit, pour le soutien pendant les galères et finalement les bonnes nouvelles! Merci de t'être battue pour moi alors que d'autres n'auraient (n'ont) rien fait. C'est sur, cette traversée aurait été beaucoup plus dure sans toi! Merci également au reste de l'équipage pour m'avoir toujours accueillie avec le sourire et aidé quand j'en avais besoin.

Aux pauvres âmes en perditions, toujours dans la galère, souvenez vous, « c'est pas l'homme qui prend la mer, c'est la mer qui prend l'homme ». Pas la peine d'essayer de tout contrôler, laisser le courant vous emporter, il vous mènera toujours bien au rivage. « Si tu veux de la chance, prends ta chance comme elle vient ». Que serait le récit d'aventure sans le personnage drôle et attachant... à mon hibustier préféré (Tang, si tu ne t'es pas reconnu)... MERCI!!! J'ai tellement de raison de te remercier que je vais en oublier mille!!! On a partagé des délires, de la nourriture, le shopping, les cinés, Disney, la nuit des publivores, le sport (enfin on a plus papoté et joué à Jérémy emmêlé dans ses fils que réellement à faire du sport...soit, c'était top!), ... Bien plus qu'un sourire, tu as aussi été un soutien, je n'oublierai jamais le petit carnet de survie que tu m'as laissé quand tu es partis, et le pass ciné que tu nous a offert pour qu'on puisse se divertir quand ça allait

mal. J'espère un jour pouvoir te rendre tout ce que tu m'as apporté! N'oublie pas ton pot de terre pour ne pas être dévoré par le Kraken! Megan, tu auras été ma confidente, en peu de temps on a partagé énormément de choses: Disney, nourriture, shopping, sport, sorties,... On s'est soutenues dans les moments difficiles mais on a aussi beaucoup ri et profité des petits plaisir de la vie. Pour toi aussi j'ai peur d'oublier plein de choses! Je vais juste citer quelques moments, « ces petits bonheurs, qui sont dans nos coeur pour la vie », marcher dans l'herbe après avoir couru, un merveilleux week end Disney-Shopping-Mariage, nos éclats des rires, les t-shirt de princesses, ma super tasse, les glaces au soleil, les verres et les sorties, ton soutien quand j'allais mal, merci d'avoir passé la soirée avec moi, de m'avoir offert une pizza et d'avoir ensuite continué à me soutenir. Si ça peut t'aider dans les moments difficiles, rappelle toi que « de deux pence de papier ficelle », tu peux te fabriquer tes propres ailes... je me réjouis que tu sois « ce grand oiseau qui chante et vole »... Charlotte merci pour les fou-rires et pour ta naïveté, je pense toujours à toi quand j'entends « j'ai l'estomac, dans les talons, à l'heure du quatre heure ». Merci aussi pour le voyage en France et pour ton mariage qui était top. Courage, dans un an ça sera ton tour, prends bien soin de toi et de ta petite princesse! Alex ton rire va me manquer! Merci pour les rires, les sorties, les restos portugais, pour le voyage à Disney, les soirées filles, les confidences (quand on était saoules...ou pas) merci d'avoir été Joie quand j'étais Tristesse, merci pour pleins d'autres choses encore. Merci à François pour ton humour, ta manière de raconter les (des) histoires, nos fou-rires, partager ton U était vraiment un plaisir. Merci pour les sorties, et le voyage à Disney aussi, on aura bien ri... stp ne fais pas de mal à Bambi! Merci a Andréa, tu as réellement contribué à ce que ce U soit le meilleur, puis on est presque de la même famille maintenant ;). Merci à Charlotte V aussi, je suis ravie de t'avoir connue, merci pour les soirées, les rires et les pauses thés. Merci à Anouck et John, pour les BBQ, les discussions surtout, je ne vous remerciais jamais assez d'avoir joué « Pumpkin » et « Honney Bunny » dans thesis fiction. Merci à Cyprien, pour les rires, la construction du bonhomme de neige « je voudrai un bonhomme de neige... » et pour ce mariage de folie! Merci à Marco, pour ton sourire et pour nous avoir souvent fait rire. Et merci aux autres, avec qui j'ai peut être moins d'expériences à raconter mais qui ont enrichi le voyage de leur présence, conseils, humour, expérience et personnalité: Emeline, Despoina, Majid, Caro, Ilona, Cécile Martin, Julien, Nicolas, Quentin, Bastienne, Alice, Géraldine, Elodie, Amandine, Sarah, les deux Nathalies et tous les autres.

Je ne vous dirai qu'une chose, même si c'est souvent dur, ne laissez pas les eaux troubles vous marquer, concentrez vous sur les moments de calme et regardez vers l'horizon, les côtes sont peut être plus proches que vous ne le pensez. « L'eau est loin d'être calme » mais c'est ce qui fait sa richesse.

« L'aventure scelle les liens » et beaucoup d'entre vous sont bien plus que des compagnons de traversée, certains sont maintenant de vrais amis! Vous me manquez déjà,

mais je sais qu'on se reverra...

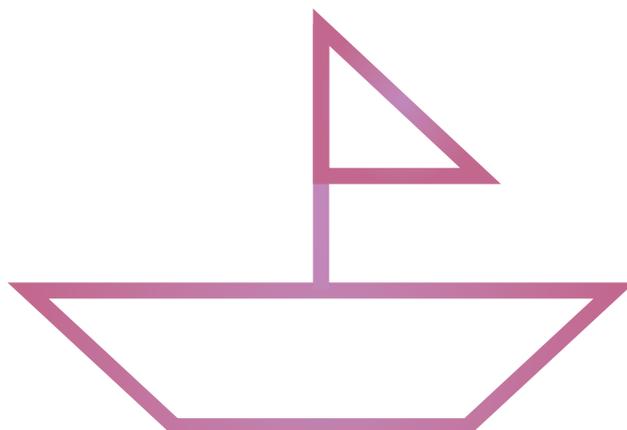
Durant le voyage, j'ai quand même régulièrement pris de temps d'embarquer sur un canot de sauvetage pour faire une escapade près de Marine. J'ai également mille raisons de te remercier et je vais en oublier plein. Nos temps de midis étaient une véritable bouffée d'oxygène! Merci également pour tout le reste, les excursions, les repas, les soirées, ... Merci pour le soutien et pour avoir tout partagé avec moi! On était mal parties et pourtant au fil des années, une réelle amitié s'est forgée et durera encore longtemps! Merci à Laurent pour les soirées jeux et les excursions, j'espère qu'il y en aura plein d'autres. En parlant de bouffée d'oxygène, merci aux JSB (Nath, Seb, Harmo, Nico et Lucia) pour m'avoir donné l'opportunité d'animer, ça m'a ressourcée!

Pour éviter le mal de mer, il vaut toujours mieux grader une attache sur Terre. Merci à tout ceux, ami et surtout famille qui m'ont permis d'amarrer quand j'en avait besoin ou envie. Merci à Michèle et José, pour les repas, les vacances, ... puis surtout, merci pour Eléna! Cette petite merveille qui donne le sourire dès qu'on la voit! Merci à Cath, pour les guindailles, les repas, les BBQ, j'ai tellement de bons souvenirs, on s'est vraiment éclatées! Merci à Greg, depuis le master, on en a des souvenirs! Le temps de midis pendant le mémoire, les trajets en voitures, les sorties, les mots croisés à la cafet quand les cours nous ennuyaient, et puis merci d'avoir amené Steph!!! Steph, je t'adore, merci pour les discussions, les sorties (bon pas quand tu vomis dans ma voiture, par contre quand tu prend l'étang pour une piscine tu es géniale! C'est pour ça qu'on t'aime!), ... Merci pour votre mariage, le thème était trop cool!!! Merci à Joséphine, pour ton sourire, pour l'oxam, pour les sorties et les trajets en bus. Merci à Marie-Noëlle (et à Freddo), ton regard sur la vie est précieux, tu m'as appris des tas de choses, j'espère un jour avoir ta sagesse. Merci à tous autres que j'ai côtoyé de près ou de loin, au graduat, à l'unif, aux cours de photos et de graphisme, en sortie... Un merci particulier à ma famille! On ne choisi pas sa famille mais je n'en voudrai pas une autre. Je vous aime pour plein de choses, pour la complicité, les traditionnelles fêtes, et tous les moments partagés. Vous êtes fous mais « seuls les gens biens le sont! ». Un petit mots à mes parents, qui sont toujours là pour nous, merci d'avoir écouté quand ça n'allait pas et de ne pas avoir insisté quand je n'avait pas envie de parler. Vous nous avez donné tout ce dont on pouvait rêver, merci pour notre enfance et la suite, finalement rien n'a changé! Merci pour toutes les petites attentions qui font qu'on se sent aimés et importants. Merci à mes soeurs, pour tout ce qu'on partage (non pas que Disney ;) ) pour nos virées entre filles, pour nos discussions, pour les innombrables heures à regarder des dessins animés, à jouer, à bricoler, à coudre, à rire et à pleurer, pour tout ce qu'on a partagé et pour tout ce qu'on partagera encore! Merci aussi à ma belle famille, à Patricia pour ses attentions et son écoute. A Julie pour ces choses qui nous rassemble... et les autres. Merci à Claudio pour les discussion enrichissante sur tous les sujets. Merci à tous les deux pour les moments qu'on a partagé.

Quand la fin approche (« la fête approche »), il faut trouver une nouvelle aventure. J'ai déjà eu la chance d'en vivre deux. Merci à Enzo, qui tel le magicien d'Oz, m'a emportée dans une tornade. De l'autre côté de l'arc-en-ciel, dans un monde de créativité, de makers, de châteaux, de dragons, de poussières de fée et de princesses. Dans un moment difficile de ma vie, N-Zone m'a permis de tout oublier et de vivre des expériences folles. Ce petit radeau m'a permis d'atteindre le bon port, Eurogentec. Merci de m'avoir fait confiance, j'ai enfin trouvé ma place! Merci à la « fine équipe », Benoît pour les fou rires et le côté scorpion qui prend parfois le dessus sur la chèvre, Laurie, je t'assure qu'en terme de Grumpy cat je connais ton maître, merci pour ton sourire et ton dynamisme. Malika, rebelle ou Dory (ou les deux) merci pour tout ce que tu m'apprends. Alisson, notre Wonder Wowan merci pour ton sourire, dommage que tu ne sois pas dans le bureau avec nous. Marie ton rire machiavélique est génial! Merci aussi à Muriel, Aurélie, Yves, Nico, Alain, Vero et tous les autres. J'espère vivre une belle aventure à vos côtés.

Le meilleur pour la fin, je ne te dirai jamais assez merci mon ange! Tu es ma bouée de sauvetage, tu m'as toujours soutenue et rassurée, tu étais à mes côtés dans les bons moments comme dans les mauvais. Tu m'as empêchée de boire la tasse et tu m'as serrée fort dans les moments de panique. Merci de partager ma vie. Tu as été tolérant quand j'étais chiante et/ou déprimée, tu m'as toujours permis de relativiser. Tu m'a maintenue à flot quand je pensais que le courant allait m'emporter. Merci de m'avoir donné un petit bout qui dans 6 mois nous comblera de bonheur!

Quand l'aventure touche à sa fin, il faut faire les bilans. Ce que j'écrirai dans mon carnet de bord c'est que ce voyage m'a permis de savoir qui je suis, ce que je veut et ce que je ne veut plus ... mais surtout de garder une cargaison de souvenirs! J'ai rencontré des gens merveilleux qui continueront un bout de chemin à mes côtés. J'ai aussi renforcé les liens avec ceux qui étaient déjà avec moi au départ. J'ai grandi et j'ai enfin trouvé ma place. « C'est vrai c'est étrange, de voir comme on change, sans même y penser »





# TABLE DES MATIÈRES

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1. Cancer</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Généralités</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Traitement du cancer</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Agents génotoxiques</b>	<b>6</b>
1.3.1. Le Cisplatine	6
1.3.2. La Camptothécine	8
1.3.3. Autres composés	10
1.3.4. Voies signalétiques activées	10
La réponse aux dommages à l'ADN canonique	10
Les mitogen activated protein kinases	13
Les PI3K	14
1.3.4.1. <i>Cas du Cisplatine</i>	14
DDR	15
MAPK	15
PI3K	15
Cycle cellulaire	15
1.3.4.2. <i>Cas de la Camptothécine</i>	15
DDR	15
MAPK	16
PI3K	16
Cycle cellulaire	16
1.3.5. <b>Conséquences cellulaires</b>	<b>16</b>
Nucléole	16
Les nuclear speckles	17
Les corps de Cajal	17
Granules de stress cytoplasmiques	17
Granules de stress nucléaires	18
<b>2. Epissage</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Constitutif</b>	<b>20</b>
2.1.1. Le splicéosome	21
2.1.2. Sites d'épissage	21
2.1.3. Réactions de transestérification	22
2.1.4. L'épissage pas à pas	22
<b>2.2. Alternatif</b>	<b>24</b>
2.2.1. Rôles	24
Changement des capacités de liaison de la protéine	25
Changement des modifications post-traductionnelles	25
Changement de la localisation intra-cellulaire	25
Changement de la stabilité de la protéine	25
2.2.2. Types	27
<b>2.3. Régulation</b>	<b>28</b>
2.3.1. Au niveau des séquences	28
Cas des éléments Alu	30

2.3.2. Au niveau des protéines régulatrices	31
2.3.2.1. Protéines SR et hnRNP	31
2.3.2.2. Différents types de régulations	34
2.3.2.3. Voies signalétiques impliquées	37
2.3.3. Organites cellulaires impliqués dans l'épissage	37
Les corps de Cajal	39
Les nuclear speckles	39
Quel rôle pour le nucléole?	40
2.3.4. Couplage de l'AS avec d'autres mécanismes	41
Ajout de la coiffe	41
Polyadénylation	41
Export	43
Traduction	43
NMD	43
Structure de la chromatine	43
2.3.5. Existe-t-il un splicing code ?	45
<b>3. Epissage dans le cancer</b>	<b>46</b>
<b>3.1. Altérations connues de l'épissage dans le cancer</b>	<b>47</b>
3.1.1. Mutations des facteurs d'épissage	47
3.1.2. Modifications d'expression et post-traductionnelles de facteurs d'épissage	48
3.1.3. Mutations dans les séquences régulatrices	49
<b>3.2. Modifications de l'AS en cours de cancérisation</b>	<b>49</b>
3.2.1. Voies signalétiques	50
3.2.2. Métabolisme	50
3.2.3. Microenvironnement tumoral et métastases	50
3.2.4. Mutations et instabilité génomique	51
De nombreux acteurs de la DDRcet de la réparation subissent de l'AS	51
Les facteurs d'épissage protègent contre les mutations	51
Les facteurs d'épissage participent à la DDRcet à la réparation	52
<b>3.3. Effets des traitements anticancéreux sur l'AS</b>	<b>53</b>
3.3.1. Conséquences de l'induction d'un stress génotoxique sur l'AS	53
3.3.1.1. Types d'agents utilisés pour induire d'AS	53
3.3.1.2. Etudes à grande échelle	55
3.3.1.3. Exemples de transcrits modifiés	56
3.3.2. Mécanismes par lesquels les agents génotoxiques modifient l'AS	58
3.3.2.1. Modifications de l'expression des facteurs d'épissage	58
3.3.2.2. Modifications post-traductionnelles des facteurs d'épissage	58
3.3.2.3. Modification de la vitesse de transcription	59
3.3.2.4. Modification de localisation des facteurs d'épissage	59
<b>3.4. Possibilités d'amélioration des traitements anticancéreux par modulation de l'épissage</b>	<b>59</b>
Oligonucléotides	60
siRNAs	61

Anticorps	61
Inhibiteurs	61
<b>Objectifs</b>	<b>65</b>
<b>Matériels &amp; méthodes</b>	<b>69</b>
1. Culture cellulaire	71
2. Transfections de siRNAs	71
3. Constructions de vecteurs d'expression	75
4. Transfections de protéines recombinantes	75
5. Mesure de la mortalité cellulaire	75
6. Purification d'ARN et RT-PCR	76
7. Immunofluorescences	78
8. Extraction de protéines et western blot	78
9. Co-Immunoprécipitations	79
10. Chromatographie d'exclusion moléculaire	80
11. Essais Luciférase	80
12. Séquençage de l'ARN	80
13. Statistiques	81
<b>Résultats</b>	<b>83</b>
1. Identification de transcrits dont l'AS est modifié par le cis.	85
<b>1.1. Détermination des conditions expérimentales utilisées pour l'analyse transcriptomique</b>	<b>85</b>
<b>1.2. Analyse transcriptomique de cellules MCF7 traitées au cis-platine</b>	<b>86</b>
1.2.1. événements d'AS identifiés à l'aide de SpliceSeq	86
1.2.2. Alternative au programme Spliceseq pour découvrir des variants d'épissage	87
2. Voies signalétiques empruntées pour induire l'AS	91
<b>2.1. DDRc</b>	<b>91</b>
<b>2.2. PI3K et AKT</b>	<b>91</b>
<b>2.3. MAPK</b>	<b>93</b>
3. Identification de facteurs d'épissage régulant les événements d'AS étudiés	95
<b>3.1. Facteurs favorisant l'inclusion des exons</b>	<b>95</b>
<b>3.2. Facteurs favorisant l'exclusion des exons</b>	<b>98</b>
<b>3.3. Autres facteurs</b>	<b>100</b>
4. Interconnexions entre les facteurs d'épissage et les voies signalétiques	100
<b>4.1. Effet du cis sur les RBPs</b>	<b>100</b>
A. Du point de vue du niveau protéique	<b>102</b>

B. Du point de vue de la localisation cellulaire	102
<b>4.2. Rôle du stress nucléolaire dans l'AS</b>	
Les composés qui génèrent un stress nucléolaire induisent également l'AS	104 105
L'induction de l'AS n'induit pas un stress nucléolaire	105
<b>4.3. Rôle de c-Jun dans l'AS</b>	107
C-Jun forme un complexe avec des RBPs	111
C-Jun est important pour l'AS induit par le Cis	114
<b>4.4. Rôle d'AP-1 dans l'AS</b>	
5. Conséquences de l'AS sur la mortalité cellulaire	115
6. Comparaison de l'induction de l'AS par différents agents génotoxiques	115
<b>6.1. Comparaison de l'induction de l'AS par différents agents génotoxiques</b>	116
<b>6.2. Dépendance de l'AS à la synthèse protéique</b>	116
<b>6.3. Dépendance de l'AS à des kinases</b>	117
Cdk et DYRK	118
DDR	119
MAPK	
<b>6.4. Effet de la CPT sur les RBP</b>	
	<b>121</b>
<b><i>Discussion &amp; Perspectives</i></b>	123
1. Mécanismes d'induction de l'AS	123
1.1. Non implication de la DDR	124
1.2. Implication des PI3K	124
1.3. Implication des MAPK	126
1.4. Quel lien entre les PI3K et les MAPK?	127
1.5. Voie d'activation différente en fonction du composé utilisé	127
1.6. Rôle des facteurs d'épissage	130
1.7. Quel rôle pour la transcription?	130
1.8. Quel rôle pour le nucléole?	132
1.9. Quel rôle pour les éléments Alu?	133
2. Rôle de l'AS	133
2.1. Modification du protéome cellulaire	134
2.2. Réponse au stress cellulaire	135
2.3. Induction de la mortalité cellulaire	<b>137</b>
<b><i>Conclusion</i></b>	<b>141</b>
<b><i>Bibliographie</i></b>	<b>177</b>
<b><i>Annexes</i></b>	<b>263</b>

## *Résumé*



<b>ACT</b>	Actinomycine D
<b>ARN Pol</b>	Polymérase de l'ARN
<b>AS</b>	Epissage alternatif
<b>BU</b>	Busulfan
<b>CDK</b>	Kinase dépendante des cyclines
<b>CF</b>	Centre fibrillaire
<b>CFD</b>	Composante fibrillaire dense
<b>CG</b>	Constituant granulaire
<b>Cis</b>	Cisplatine
<b>CPT</b>	Camptothécine
<b>CTD</b>	Partie C-terminale de la polymérase de l'ARN II
<b>DDRc</b>	Réponse canonique aux dommages à l'ADN
<b>DOX</b>	Doxorubicine
<b>EJC</b>	Complexe de jonction exonique
<b>EMT</b>	Transition épithélio-mésenchymateuse
<b>ESE</b>	« Exonic splicing enhancer »
<b>ESS</b>	« Exonic splicing silencer »
<b>Eto</b>	Etoposide
<b>GPCR</b>	Récepteur couplé aux protéines G
<b>HR</b>	Recombinaison homologue
<b>ICG</b>	Granule interchromatinienne
<b>ISE</b>	« intronic splicing silencer »
<b>ISS</b>	« Intronic splicing silencer »
<b>MAPK</b>	« Mitogen activated protein kinases »
<b>MC</b>	Mitomycine C
<b>MET</b>	Transition mésenchymato-épithéliale
<b>MTX</b>	Methotrexate

<b>NER</b>	Réparation par excision de nucléotide
<b>NHEJ</b>	Jonction des extrémités non-homologues
<b>NLS</b>	Signal de localisation nucléaire
<b>NMD</b>	« Non sense mediated decay »
<b>PF</b>	Fibrilles périchromatiniennes
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
<b>RBP</b>	Protéine de liaison à l'ARN
<b>ROS</b>	Espèce réactive de l'Oxygène
<b>RRM</b>	« RNA recognition motif »
<b>RTK</b>	Récepteur à tyroine kinase
<b>Top1cc</b>	Complexe de clivage de la topoisomérase 1
<b>Topo</b>	Topoisomérase
<b>UTR</b>	Extrémité non traduite de l'ARN

<b>Ser</b>	Sérine
<b>Thr</b>	Thréonine
<b>Tyr</b>	Tyrosine
<b>Arg</b>	Arginine
<b>Gly</b>	Glycine
<b>A</b>	Adénine
<b>C</b>	Cytosine
<b>T</b>	Thymine
<b>G</b>	Guanine
<b>U</b>	Uracile
<b>Y</b>	Pyrimidine
<b>R</b>	Purine



# INTRODUCTION



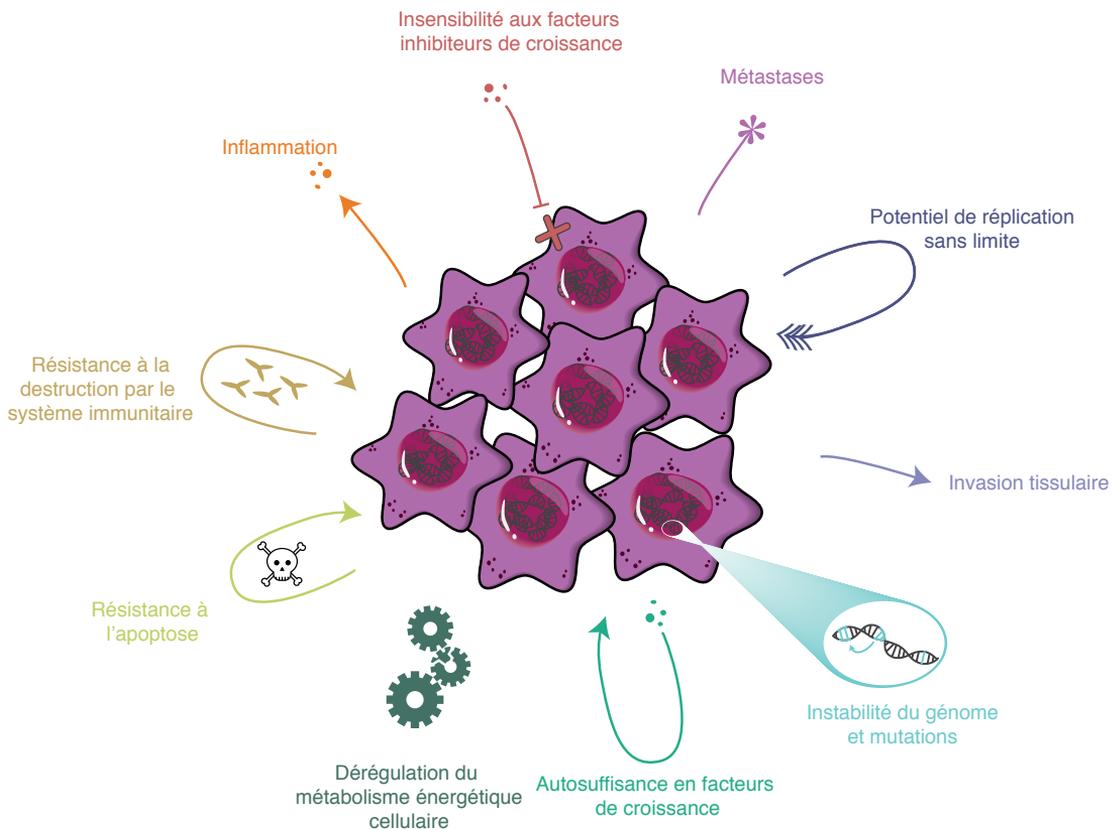
# 1. CANCER

## 1.1. GÉNÉRALITÉS

Le cancer est une des causes majeures de mortalité dans le monde. Il est dû à la prolifération anormale de cellules (dérivées d'un clone) qui acquièrent la capacité de se diviser indéfiniment. Le génome des tumeurs subit plusieurs changements et accumule des mutations<sup>1</sup>. En effet, la tumorigenèse est un processus qui se produit en plusieurs étapes au cours desquelles les cellules normales se transforment progressivement en cellules malignes et invasives<sup>2</sup>. La cancérisation est un processus évolutif darwinien: une succession de modifications donnant un avantage à la croissance et amenant à une transformation progressive vers le cancer<sup>3</sup>. Les tumeurs sont constituées de différents types cellulaires. Des cellules non dérivées du clone originel y sont recrutées et participent à la tumorigenèse<sup>4</sup>.

Il existe de nombreux types de cancers mais tous ont en commun dix caractéristiques générales décrites par Hanahan et Weinberg<sup>4-5</sup> (Figure 1):

- autosuffisance en signaux de croissance;
- insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance;
- résistance à la mort cellulaire programmée (apoptose);
- potentiel de réplication sans limite;
- invasion tissulaire;
- métastases;
- résistance à la destruction par le système immunitaire;
- inflammation induite par la tumeur;
- instabilité du génome et mutations;
- dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire.



**Figure 1. Caractéristiques des cellules cancéreuses.** La plupart des cellules cancéreuses possèdent les mêmes caractéristiques. Image adaptée de 4

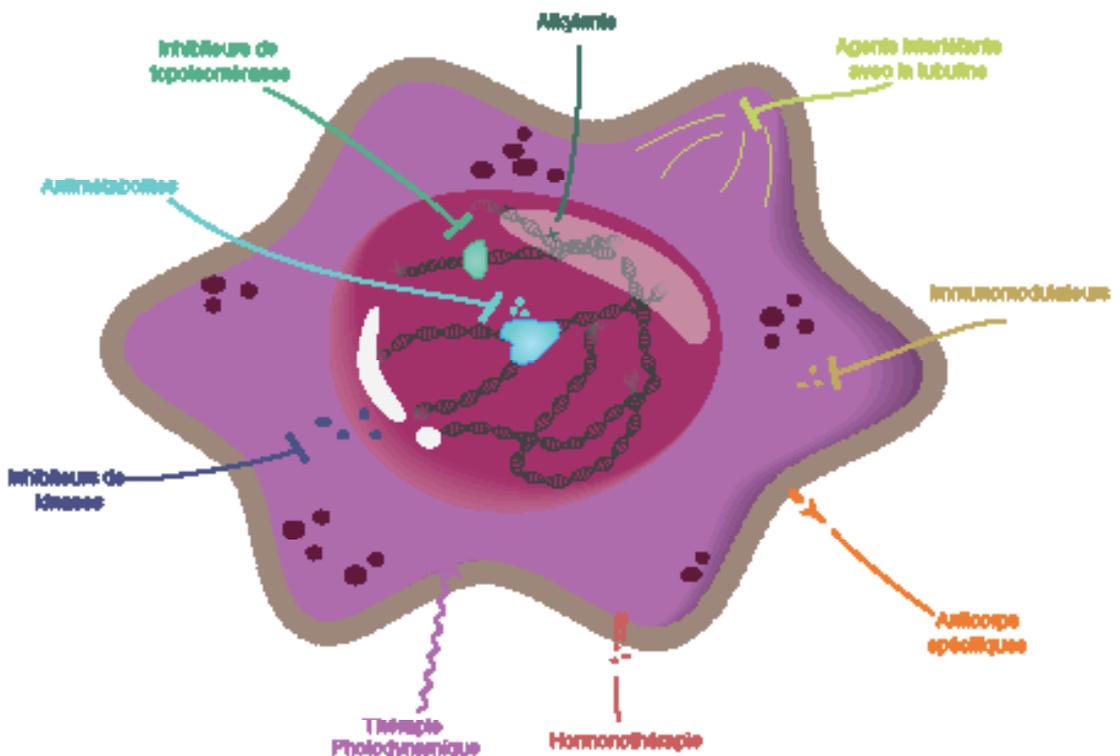
## 1.2. TRAITEMENT DU CANCER

**A** l'origine, le seul traitement disponible contre le cancer était la chirurgie. Au 19<sup>ème</sup> siècle, l'hormonothérapie a été découverte. Elle a permis de réduire de 50% la mortalité liée au cancer du sein grâce aux anti-oestrogènes. Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, la radiothérapie a commencé à être utilisée et n'a cessé de se perfectionner. Pendant la Seconde Guerre mondiale, des observations ont démontré que les gaz moutardes (qui ont maintenant donné naissance aux moutardes azotées telles que le cyclophosphamide ou le melphalan) avaient des effets anticancéreux. C'est ainsi que la chimiothérapie anticancéreuse est née.

Actuellement, les bases du traitement du cancer sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. De nouvelles thérapies (dont nous ne discuterons pas ici) sont également en cours de développement. Certaines sont déjà utilisées pour améliorer le traitement classique ou pour limiter les cas de résistances (par exemples: les anticorps spécifiques, l'immunothérapie, les inhibiteurs de kinases ou encore la thérapie photodynamique).

Il existe différentes classes d'agents chimiothérapeutiques (Figure 2):

- les agents génotoxiques (voir paragraphe 1.3, page 6);
- les antimétabolites sont des analogues de purine (R) (comme la fludarabine ou le 6-mercaptopurine) ou de pyrimidine (Y) (comme le 5 fluorouracile ou la capécitabine). Ils empêchent notamment la réplication de l'ADN en s'y incorporant, causant ainsi l'arrêt de la synthèse. Le méthotrexate (MTX) est également repris dans les antimétaboliques; c'est un analogue de l'acide folique qui empêche, par compétition, la formation de la forme active du folate nécessaire à la synthèse des R et des Y;
- les agents interférant avec la polymérisation (comme la vinorelbine) ou de la dépolymérisation (comme le Paclitaxel) de la tubuline et empêchent ainsi la division cellulaire;
- les immunomodulateurs ont des actions anti-angiogènes ou anti-inflammatoires (comme par exemple le thalidomide qui inhibe le TNF-alpha).



**Figure 2. Représentation non exhaustive de différentes classes d'agents utilisés en chimiothérapie anticancéreuse.** Ils agissent à différents niveaux. Les antimétabolites empêchent la réplication de l'ADN. Les inhibiteurs de Topos et les alkylants endommagent l'ADN. Certains composés empêchent la division cellulaire en interférant avec la tubuline. Les immunomodulateurs diminuent la réponse inflammatoire ou l'angiogenèse; les anticorps s'attaquent spécifiquement aux tumeurs; des anti-oestrogènes sont utilisés en hormonothérapie; la thérapie photodynamique utilise des agents photosensibilisants qui permettent de tuer les cellules cancéreuses en les rendant sensibles à la lumière; des inhibiteurs de kinases permettent de diminuer la prolifération et de tuer les cellules.

## 1.3. AGENTS GÉNOTOXIQUES

Les agents génotoxiques sont fréquemment utilisés en thérapie anticancéreuse. Il en existe deux grands types:

- les agents alkylants établissent des liaisons covalentes avec l'ADN (les trois classes majeures sont les moutardes azotées, les dérivés du platine, les nitroso-urées auxquelles viennent s'ajouter d'autres agents alkylants comme le busulfan ou le témozolomide). Ils sont généralement considérées comme pro-cancer. Cependant, l'utilisation de fortes concentrations surcharge les systèmes de réparation cellulaire et conduit à l'apoptose<sup>6</sup>;
- les inhibiteurs de topoisomérases (Topo) inactivent ces enzymes qui modifient la topologie de l'ADN en clivant transitoirement un seul ou deux brins de l'ADN [topoisomérase de type I et de type II, respectivement]. Ces enzymes sont essentielles pour garantir l'intégrité du génome pendant la transcription, la réplication, la réparation de l'ADN et le remodelage de la chromatine<sup>7-9</sup>. Il existe des composés ayant un effet sur les Topos de type I (comme la camptothécine (CPT) ou la quercétine) ou de type II (comme l'étoposide (Eto) et la Doxorubicine (DOX)). Les inhibiteurs de Topos sont sélectifs des cellules cancéreuses car elles se divisent plus vite et surexpriment les Topos<sup>10</sup>.

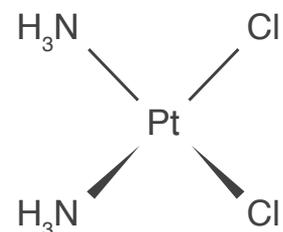
Nous décrivons ici les agents employés au cours de cette étude et plus particulièrement le cisplatine (Cis) et la CPT, les deux agents ayant été les plus utilisés.

### 1.3.1. LE CISPLATINE

Le Cis (cis-diaminedichloroplatine(II)) est utilisé depuis 1978<sup>11</sup> pour le traitement de nombreux types de cancers (poumon, sein, ovaires, testicules, prostate, estomac vessie, os, muscles, lymphoïdes,...)<sup>12-13</sup> (Figure 3)

Le Cis est capable d'entrer (ou de sortir) de la cellule essentiellement par des transporteurs au cuivre comme CTR1<sup>14-15</sup>, par les pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup><sup>16-17</sup> ou plus rarement par diffusion passive. Une fois dans le cytoplasme, il y a un échange entre les atomes de chlore et l'eau, ce qui entraîne l'apparition d'une charge positive permettant au Cis d'interagir avec les sites nucléophiles des protéines, de l'ARN et de l'ADN<sup>18-20</sup> (Figure 4). Entre le début de son activation et son interaction avec ses cibles, le Cis peut être inactivé par des composés cytoplasmiques comme le glutathion par exemple<sup>12</sup>.

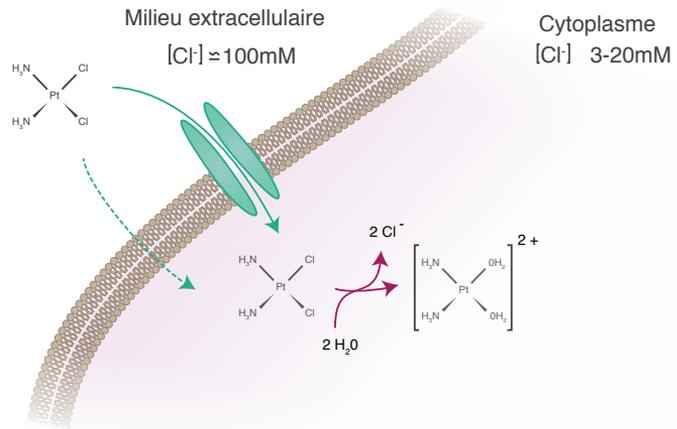
Les liaisons avec l'ADN et plus particulièrement les liaisons



**Figure 3. Cisplatine:** le Cis est un composé neutre et planaire qui possède deux ligands amines et deux atomes de chlore labiles.

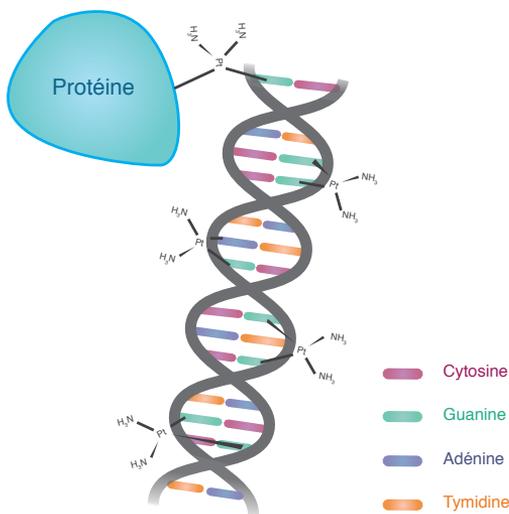
#### Figure 4. Activation du Cis.

Le Cis entre dans la cellule par les transporteurs au cuivre ou par diffusion passive. La concentration en chlore étant moins importante dans le cytoplasme, il y a un échange entre les atomes de chlore du Cis et des molécules d'eau entraînant l'apparition de deux charges positives.



intra-chaînes, sont les plus étudiées et sont responsables de son action cytotoxique<sup>21-22</sup>. Il existe une corrélation positive entre la quantité de Cis liée à l'ADN et sa cytotoxicité<sup>23</sup>. Il est capable d'établir des liens covalents avec l'azote (N7) des adénines (A) et des guanines (G), ce qui mène le plus fréquemment à des liaisons intra-chaînes sur deux R adjacentes ou séparées d'une base (plus de 85% des lésions<sup>24</sup>) et, plus rarement, à des liaisons inter-chaînes. Le Cis peut également générer des liaisons ADN-protéines<sup>25</sup> (Figure 5).

La liaison du Cis cause une distorsion de la double hélice de l'ADN en rompant les liaisons hydrogènes<sup>26</sup>.



**Figure 5. Liaison du Cis à l'ADN.** Le Cis se lie aux A et aux G adjacentes ou séparées d'une base. Plus rarement, il peut lier deux R sur des brins opposés causant des liaisons inter-chaînes. Le Cis peut également mener à la liaison de protéines à l'ADN.

Bien que le Cis affecte la réplication et la transcription, il n'y a pas toujours de corrélation entre celles-ci et la cytotoxicité<sup>27-28</sup>. C'est probablement dû au fait que les signaux induits par les lésions peuvent être soit pro-soit anti-apoptotiques et que c'est l'intensité et/ou la durée de l'exposition au Cis qui va décider du destin de la cellule<sup>12</sup>.

Bien que d'autres systèmes de réparations interviennent, les lésions dues au Cis sont majoritairement réparées par l'excision de nucléotides (NER)<sup>29</sup>. En plus des protéines nécessaires à la détection et à la réparation des dommages, d'autres protéines comme HMG, TBP ou UBF sont recrutées au niveau de la lésion<sup>30-32</sup>. Cependant, leur rôle à ce niveau n'est pas encore connu.

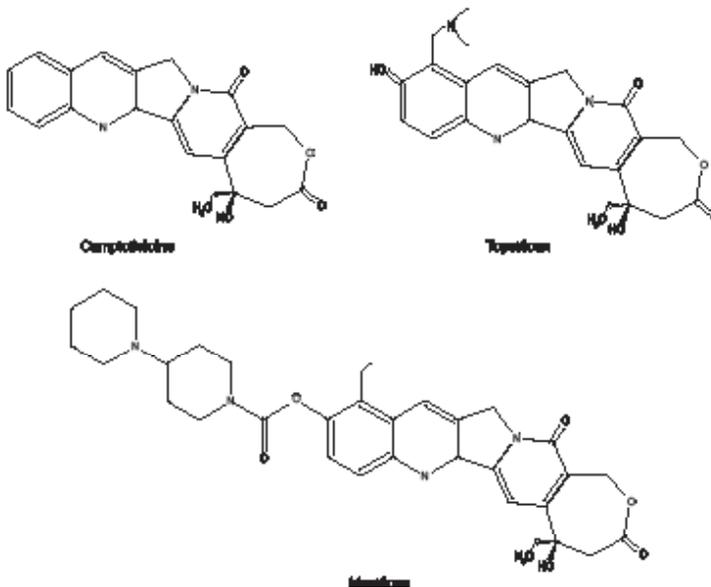
Si les lésions ne sont pas réparées, elles

vont conduire à l'arrêt de la transcription et/ou de la réplication menant à une cassure double-brin<sup>33-34</sup>.

Le Cis est aussi capable d'induire un stress oxydant qui peut à son tour causer des dommages à l'ADN<sup>35</sup>. Ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites par l'intermédiaire de la NAD(P)H oxydase<sup>36</sup>.

### 1.3.2. LA CAMPTOTHÉCINE

La CPT est un alcaloïde pentacyclique isolé de l'arbre *Camptotheca acuminata* dans les années 60. Elle est instable en milieu aqueux. Ce sont donc ses dérivés plus stables (topotécan et irinotécan) qui sont utilisés en thérapie depuis la fin des années 90 (Figure 6).



**Figure 6. Structure de la CPT et de ses dérivés.** La CPT est un alcaloïde pentacyclique instable dans l'eau. Des dérivés plus stables (le topotécan et l'irinotécan) ont été synthétisés pour être utilisés en thérapie anticancéreuse.

La CPT est très sélective et cause des cassures simple-brin dues à l'inhibition de la Topo 1, sa seule cible connue<sup>37</sup> (son fonctionnement est expliqué dans la [Box 1](#)). La liaison avec celle-ci est très rapide (après quelques minutes), non covalente et résulte de liaisons hydrogènes. La CPT se dissocie donc très vite du complexe, c'est pourquoi elle doit être présente tout au long du traitement<sup>10</sup>. De plus, les cassures simple-brin disparaissent aussitôt que le composé est inactivé ou retiré du milieu<sup>42-46</sup>.

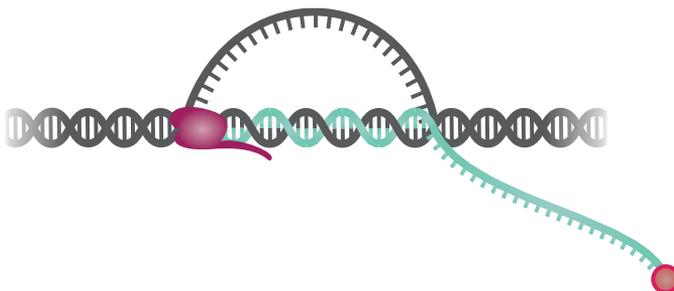
La CPT stabilise les Top1cc (complexe clivable formé entre le clivage et la ligation ([Box 1](#))) en se plaçant entre des acides aminés de l'enzyme et les bases de l'ADN, à côté du site de clivage<sup>47-48</sup>. Elle est sélective aux Top1cc avec un G à l'extrémité 5' de la cassure<sup>49-51</sup>. La stabilisation des Top1cc induit donc des cassures simple-brin. Ces Top1cc réversibles sont convertis en dommages à l'ADN irréversibles par la collision avec les fourches de transcription ou de réplication. Dans ce cas, des cassures double-brin sont générées. Les fourches de réplication arrêtées sont des structures très instables qui doivent être rapidement traitées pour éviter des phénomènes de recombinaisons inappropriées et

l'instabilité du génome<sup>52-53</sup>. L'utilisation de fortes concentrations de CPT peut également mener à des cassures double-brin dues à des Top1cc présents sur les brins opposés.

La Topo 1 est essentielle pour la transcription et c'est probablement pourquoi la CPT diminue la présence de la polymérase de l'ARN II (ARN Pol II) au niveau du site de pause des promoteurs<sup>54</sup>. De plus, l'ARN Pol II est rapidement hyperphosphorylée en présence de CPT ce qui inhibe la transcription<sup>55</sup>.

La CPT induit également des dommages à l'ADN par l'intermédiaire des boucles R. Les boucles R sont des structures comprenant trois brins d'acide nucléique<sup>56</sup>. Elles sont formées pendant la transcription lorsque l'ARN en cours de synthèse s'hybride au brin d'ADN parent, le brin d'ADN complémentaire est alors « déplacé »<sup>57</sup> (Figure 7).

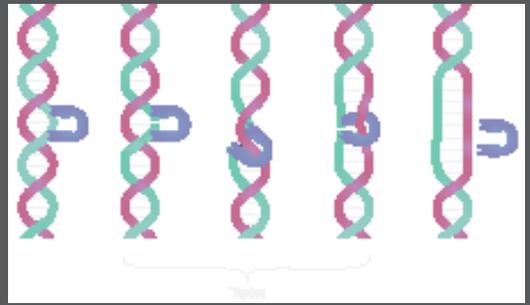
Les boucles R se forment de manière spontanée<sup>58-60</sup> préférentiellement aux niveaux des promoteurs et des séquences de terminaisons<sup>60-63</sup>. Elles sont impliquées dans plusieurs mécanismes cellulaires comme la régulation de l'expression, la réplication de l'ADN, la recombinaison ou la réparation de l'ADN<sup>64-65</sup>. Plusieurs enzymes ont un rôle dans la résolution des boucles R dont la Topo 1<sup>66</sup>. Son inhibition conduit à une augmentation du nombre de boucles R. Ces dernières peuvent conduire à des dommages à l'ADN. En effet, les zones d'ADN simple-brin sont sensibles aux nucléases. De plus, elles sont reconnues par le mécanisme de NER qui va les transformer en cassures double-brin. Enfin, la collision avec



**Figure 7. Boucle R.** Pendant la transcription, l'ARN en cours de synthèse (vert) peut s'hybrider au brin d'ADN parent, le brin d'ADN complémentaire est alors déplacé.

#### Box 1. Fonctionnement de la Topo 1 :

La Topo 1 possède une fonction de clivage et une fonction de ligation. Cette enzyme coupe un brin de l'ADN. Le résidu tyrosyl situé dans le site catalytique de la Topo 1 attaque l'ADN et est fixé covalentiellement à l'extrémité 3' de l'ADN générant une cassure simple brin. Cet intermédiaire est appelé complexe clivable de la Topo 1 (Top1cc). L'entaille formée permet à l'extrémité 5' libre de pivoter autour du brin intact<sup>38-40</sup> menant à un relâchement de la torsion de l'ADN. La Topo 1 joint alors aussitôt les brins coupés, rompant ainsi le lien covalent qui la lie à l'ADN. Elle est alors dissociée. Dans les conditions normales, la jonction des brins est plus rapide que le clivage de manière à ce qu'il y ait le moins possible de Top1cc<sup>41</sup>.



les fourches de réplication peut également conduire à des cassures double-brin<sup>66</sup>.

Les dommages dus à la CPT sont essentiellement réparés par la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR).

### 1.3.3. AUTRES COMPOSÉS

---

Les autres composés utilisés dans cette étude sont:

- **le busulfan** (BU), un agent alkylant de la famille des diméthane sulfonoxy-alkanes surtout utilisé pour le traitement des cancers des lignées myéloïdes. Il forme des liens intra-chaînes entre deux G ou un G et un A<sup>67</sup>;
- **la mitomycine C** (MC), un agent alkylant extrait de souches de streptomycètes. Il réagit spécifiquement avec les G des îlots CpG<sup>68</sup>;
- **l'Eto**, un inhibiteur de la Topo II extrait de la mandragore découvert dans les années 60. Il est utilisé notamment pour traiter les cancers des testicules, des poumons et les leucémies. Il cause des cassures double-brin de l'ADN<sup>69</sup>;
- **la DOX**, un inhibiteur de la Topo II extrait de souches de streptomycètes, utilisé depuis les années 60. Cet agent intercalant s'insère entre les bases de l'ADN et inhibe la Topo II en formant un complexe qui empêche la religation de l'ADN. De plus, la DOX est un oxydant qui favorise la production de radicaux libres capables d'endommager, entre autres, l'ADN;
- **l'actinomycine D** (ACT), un agent intercalant isolé de souches d'actinomycètes. Il est utilisé pour le traitement de nombreux cancers dont le sarcome d'Ewing et les cancers gastriques. Il inhibe la transcription en s'intercalant préférentiellement dans les séquences riches en îlots CpG (notamment les séquences transcrites par l'ARN Pol I et les promoteurs).

### 1.3.4. VOIES SIGNALÉTIQUES ACTIVÉES

---

Nous discuterons ici des trois voies principales de transduction du signal qui sont activées après les dommages à l'ADN: la Réponse aux dommages à l'ADN canonique (DDR), les *Mitogen activated protein kinases* (MAPKs) et les Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks).

#### La réponse aux dommages à l'ADN canonique (Figure 8A)

Les trois principales kinases responsables de la DDR sont ATM, ATR et DNA-PK. ATM et DNA-PK sont recrutées et activées au niveau des cassures double-brin et ATR au niveau des zones simple-brin ainsi que par un arrêt de la fourche de réplication. Ces kinases phosphorylent de nombreux substrats dont les plus importants sont les kinases CHK1, CHK2 et le facteur de transcription p53. ATM et ATR phosphorylent respectivement CHK2 et CHK1. Ces dernières vont conduire aux réponses cellulaires qui peuvent être la réparation des dommages, l'arrêt du cycle cellulaire (Box 2) ou l'apoptose (Box 3). Un acteur majeur de la DDR est p53. L'activation de CHK1 et CHK2 conduit, entre autres, à

la phosphorylation de p53 sur la serine (Ser) 20 empêchant son ubiquitination par l'intermédiaire de l'ubiquitine ligase MDM2 et sa dégradation consécutive. p53 peut également être phosphorylé directement sur la Ser15 par ATM et ATR<sup>70</sup>. Cette phosphorylation stabilise p53 qui s'accumule dans le noyau et agit comme facteur de transcription. Il régle des gènes:

- pro-apoptotiques (*FAS, BAX, PUMA,...*);
- anti-apoptotiques ayant un rôle dans la réparation des dommages (*DD2B, MGMT...*);
- qui ont un rôle dans le cycle cellulaire (p21 qui inhibe les CDK et permet de bloquer l'entrée en G1 et en G2/M);

p53 est également capable d'induire la transcription de MDM2, ce qui conduit à une boucle de contrôle rétroactif<sup>71</sup>.

De plus, des foyers se créent au niveau des zones endommagées où de nombreuses protéines sont recrutées, notamment PARP qui conduit à l'ajout de 2 à 200 ADP-riboses<sup>75</sup> ce qui peut mener au recrutement de nombreux facteurs. L'histone H2AX est phosphorylée au niveau de ces foyers.

La quantité de dommages détermine le sort de la cellule: si la quantité de dommages est faible, la réparation est favorisée et la cellule survit alors que dans le cas contraire, la cellule meurt par apoptose<sup>76</sup>.

Cependant, les cassures double-brin et les liaisons inter-chaînes sont les lésions les plus difficiles à réparer, dans ce cas un faible niveau de dommages induit l'apoptose.

### Box 2. Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire reprend les étapes nécessaires à la division des cellules. Après la mitose et avant la phase de réplication de l'ADN, les cellules sont en phase G1. La phase de réplication de l'ADN est appelée S. Une fois l'ADN répliqué, la cellule entre en phase G2 qui précède la mitose puis le cycle recommence. Le cycle est étroitement régulé notamment par les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDK)<sup>72</sup>. Les points de contrôle à la fin de chaque étape évitent à une cellule endommagée ou dont l'ADN n'est pas entièrement répliqué de poursuivre le cycle.

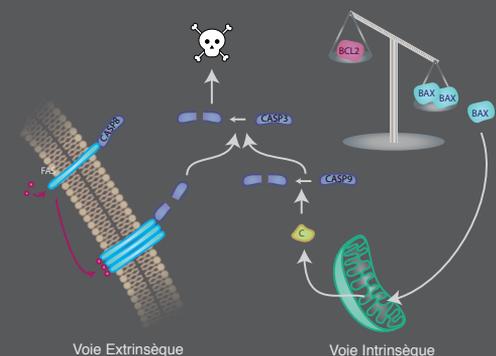


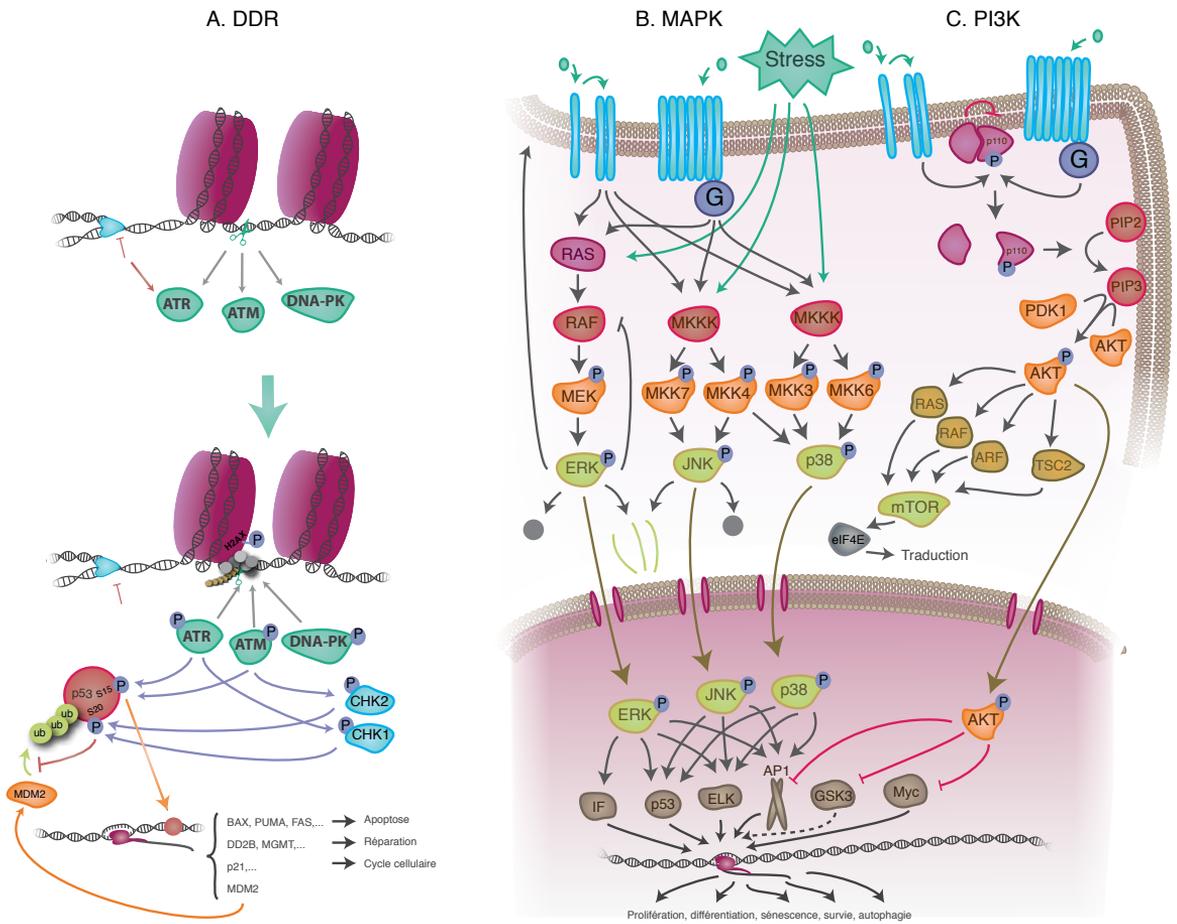
### Box 3. Apoptose.

Il existe deux voies majeures de l'apoptose, l'intrinsèque et l'extrinsèque.

La voie intrinsèque est notamment induite par l'équilibre entre Bcl2 (anti-apoptotique) et Bax (pro-apoptotique). Cet équilibre détermine le choix entre la survie et la mort. Quand p53 induit la production de BAX, l'équilibre penche vers la mort. Dans la mitochondrie, Bax induit l'apoptose notamment par le relargage du cytochrome C qui active les caspases 3 et 9<sup>73-74</sup>.

La voie extrinsèque est notamment activée par Fas. Ce dernier est un récepteur situé à la surface des cellules qui conduit à l'apoptose. La fixation de son ligand mène à l'oligomérisation du récepteur qui conduit à l'apoptose par l'activation de la caspase 8. Celle-ci active la caspase 3.





**Figure 8. Principales voies signalétiques activées par un stress génotoxique:** A. DDR: les lésions de l'ADN conduisent à l'activation d'ATR, ATM et DNA-PK. De nombreuses protéines sont recrutées au niveau des dommages (en gris). H2AX est phosphorylée et PARP ajoute des chaînes d'ADP-riboses (couleur moutarde). ATM active CHK2 et ATR active CHK1. p53 est phosphorylé sur la Ser15 par ATM et ATR et sur la Ser20 par CHK1 et CHK2. Cette dernière inhibe l'ubiquitination de p53 par MDM2. La phosphorylation sur la Ser20 permet l'accumulation dans le noyau et active la transcription de MDM2 et de gènes importants pour l'apoptose, la réparation des dommages et le contrôle du cycle cellulaire. B. MAPK: les MAPKs sont activées par des stress et par les RTKs ou les GPCRs. Les MKKKs sont activées (rouge) et vont activer les MKKs (orange). Ces dernières activent ERK, JNK et p38 qui peuvent activer des substrats cytoplasmiques (gris), au niveau du cytosquelette (jaune), au niveau des membranes ou migrer dans le noyau où elles activent des facteurs de transcription comme p53, AP-1 ou ELK. C. PI3K: les récepteurs membranaires activent la sous-unité catalytique des PI3Ks ce qui conduit à la dissociation de la sous-unité régulatrice. La sous-unité catalytique phosphoryle alors le PIP2 en PIP3, ce qui permet la phosphorylation d'AKT (via le recrutement de sa kinase et de lui-même). AKT migre dans le noyau pour réprimer certains facteurs de transcription et active les GTPases (couleur moutarde) dans le cytoplasme. Ces dernières activent mTOR qui régule la traduction notamment par l'intermédiaire de eIF4E.

## Les mitogen activated protein kinases (Figure 8B)

Cette voie est activée dans de nombreux processus cellulaires comme la réponse au stress, la différenciation, la mobilité, la survie ou la prolifération. La voie des MAPKs est activée par une cascade à trois niveaux. Les MAPKKKs sont activées en réponse à un signal extracellulaire transmis par les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) par exemple, par l'activation d'un membre de la famille Ras. Elles activent les MAPKKs par phosphorylation, ces dernières activant alors les MAPKs en les phosphorylant sur des résidus tyrosines (Tyr) et thréonines (Thr)<sup>77</sup>. Celles-ci phosphorylent ensuite des facteurs de transcription mais aussi des protéines participant à la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, à l'apoptose et à l'épissage. Il existe trois sous-familles principales de MAPK: ERK, JNK et p38<sup>76,78-80</sup>.

**La voie ERK** est activée par des cytokines, des stress, l'insuline et des facteurs de croissance<sup>81-82</sup>. Les récepteurs membranaires de la famille des récepteurs à activité Tyr kinase (RTKs) ou des GPCRs activent la famille Raf. Celle-ci active les MEK qui, à leur tour, activent les ERK. Après stimulation, celles-ci s'accumulent dans le noyau<sup>83</sup>. ERK active des facteurs de transcription nucléaires comme ELK, AP-1 ou HIF1alpha. Il possède également des substrats membranaires, dans le cytosquelette et cytoplasmiques (notamment Raf qui permet une boucle de contrôle rétroactif). De plus, ERK est capable de conduire à la phosphorylation de p53 sur la Ser15<sup>84</sup>.

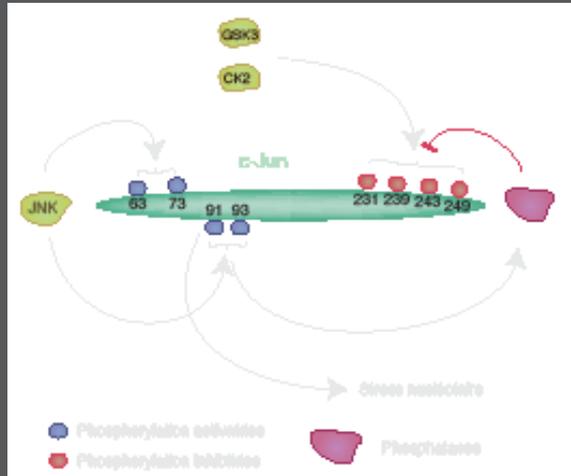
**La voie JNK** est activée par de nombreux stress cellulaires, notamment par les stress génotoxiques<sup>85</sup>. Son activation dépend de la double phosphorylation de motifs Thr-Pro-Tyr par les MAPKKs 4 et 7. Elle contrôle l'activation de nombreux facteurs de transcription tels que les membres d'AP-1 (c-Jun (Box 4), c-Fos, ATF2) mais aussi p53 et ELK. JNK peut également phosphoryler des protéines cytoplasmiques comme Bcl2 et Bax ou des protéines du cytosquelette<sup>87</sup>. Il module ainsi de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la mobilité, la réparation des dommages, l'apoptose ou l'autophagie<sup>88</sup>. L'apoptose dépendante de JNK est activée par deux voies dépendantes de FAS, sous la dépendance du facteur de transcription AP-1 ou de la phosphorylation de Bax et Bcl2<sup>89</sup>.

**La voie p38** est fortement activée par des stress environnementaux et génotoxiques<sup>90-91</sup>. Les MAPKKKs (MTK, MLK2, MLK3, DLK, ASK et TAK1) activées entraînent l'activation des MAPKKs 3 et 6, puis celle de p38 (qui peut également être activé par MAPKK4)<sup>92</sup>. p38 activé migre alors dans le noyau où il phosphoryle des facteurs de transcription (comme GSK3 par exemple). En réponse aux agents chimiothérapeutiques, p38 augmente l'apoptose<sup>93</sup>. Il a aussi un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et l'inhibition de la croissance<sup>94</sup>. Cependant, dans certaines conditions, p38 peut induire une résistance à l'apoptose<sup>95-99</sup>.

L'activation des MAPK conduit à la régulation de la prolifération, de la différenciation, de la sénescence, de la survie, de l'apoptose ou encore de l'autophagie<sup>100-104</sup>.

**Box 4. C-JUN**

AP-1 est un facteur de transcription de type «leucine zipper» homo- ou hétéro-dimérique formé par les membres des familles c-Jun, c-Fos et ATF notamment. Il permet l'activation de gènes comme *ERCC1*, *GST*, *GSH*<sup>105-106</sup>. Dans cette étude, nous avons travaillé essentiellement sur c-Jun que nous décrivons ici. c-Jun possède des rôles en tant que facteur de transcription notamment dans la survie et la prolifération<sup>107</sup>. Il peut être régulé d'un point de vue transcriptionnel mais également par des modifications post-traductionnelles. Les phosphorylations sur les résidus Ser63 et Ser73 sont connues pour activer son pouvoir transactivateur<sup>108-109</sup>. Plusieurs kinases sont capables d'induire ces phosphorylations mais la principale est JNK<sup>110</sup>. Inversement, les phosphorylations sur sa partie C-terminale (Thr 231, Thr 239, Ser 243 et Ser 249), induites par GSK3 et CK2, sont plutôt inhibitrices et doivent être retirées pour que c-Jun puisse se lier à l'ADN. Les phosphorylations (moins étudiées) sur les résidus Thr91 et Thr93 (notamment par JNK<sup>111</sup>) sont également activatrices de c-Jun, elles conduisent à une modification conformationnelle de la protéine permettant l'accès aux phosphatases nécessaires à la déphosphorylation de la partie C-terminale<sup>112</sup>. Il a également été montré que c-Jun peut avoir un rôle dans la réponse nucléolaire au stress indépendamment de son rôle dans la transcription par l'intermédiaire de la phosphorylation sur la Thr91<sup>113</sup>.



**Les PI3K** (Figure 8 C)

Celles-ci peuvent également être divisées en trois classes mais nous ne parlerons que de la classe 1. Les PI3Ks sont des hétérodimères composés d'une sous-unité catalytique (p110) et d'une sous-unité régulatrice (p101, p85alpha, p84 ou p87) qui inhibe l'activité des premières. Les PI3Ks sont activées par phosphorylation par les RTKs ou les GPCRs. Cette phosphorylation induit une modification conformationnelle et la dissociation du complexe au niveau des membranes. La sous-unité catalytique phosphoryle alors le PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) en PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate)<sup>114</sup>. Celui-ci joue le rôle de messenger, il recrute AKT et sa kinase activatrice PDK1 qui la phosphoryle sur la Thr308. AKT active alors mTOR par l'intermédiaire de TSC2 et des petites GTPases (Ras, Rac et Arf). mTOR augmente la traduction par l'intermédiaire de eIF4E. AKT est également capable de réguler négativement GSK3, Myc et c-Jun<sup>115</sup>.

**1.3.4.1. CAS DU CISPLATINE**

**DDR**

Le Cis active préférentiellement ATR<sup>116-117</sup> qui active p53 et CHK1. Le Cis est également capable d'activer CHK2 mais indépendamment d'ATM<sup>116</sup>. L'apoptose due au Cis est induite

notamment par la modification de l'équilibre Bax/Bcl2, mais aussi par l'intermédiaire de Fas<sup>118-119</sup> même si, dans certains systèmes, l'apoptose induite par le Cis est indépendante de Fas<sup>120-121</sup>.

### MAPK

Les trois sous-familles de MAPKs sont activées par le Cis mais la plus importante pour induire l'apoptose, serait la voie ERK<sup>73</sup>. Cependant, l'effet de ERK sur la survie suite à un traitement au Cis est controversé puisque, selon diverses études, il pourrait la favoriser ou la réprimer<sup>100, 122-132</sup>. Il est possible que les deux effets soient vérifiés mais que le choix de l'un ou de l'autre soit dicté par le contexte cellulaire ou l'étendue des dommages<sup>12</sup>. Il a également été montré que la sensibilité du Cis dépend de p38<sup>133</sup>.

La production de GST et de GSH par AP-1 augmente l'inactivation cytoplasmique du Cis, et celle de ERCC1 augmente la réparation des dommages diminuant la réponse au Cis<sup>12</sup>.

### PI3K

Le Cis est capable d'activer la voie des PI3Ks<sup>134</sup> notamment via l'activation du récepteur HER-2/neu qui va activer certaines PI3Ks et MAPKs<sup>135</sup>. Il a été montré qu'un inhibiteur des PI3K augmentait la cytotoxicité du Cis notamment en empêchant le blocage en G1<sup>136-139</sup> et que l'activation de cette voie contribuait à la résistance au Cis<sup>140</sup>.

### Cycle cellulaire

Le Cis induit un arrêt transitoire en phase S suivit d'un blocage en G2/M dû à l'inhibition des cyclines Cdc2<sup>141-142</sup>. L'inhibition de ce blocage augmente la sensibilité des cellules au Cis<sup>143-144</sup>. De la même manière, une inhibition de p21 sensibilise les cellules au Cis<sup>145</sup>.

#### *1.3.4.2. CAS DE LA CAMPTOTHÉCINE*

### DDR

Les cassures double-brin causées par la rencontre des fourches de réplication avec les Top1cc activent les voies d'ATM et d'ATR menant à la phosphorylation des kinases CHK1, CHK2 et de H2AX, à la stabilisation de p53 et à l'activation des voies de réparation et de l'apoptose<sup>146-150</sup>. La collision avec la machinerie de transcription cause un blocage de celle-ci qui mène à l'activation de la DDRc via ATR<sup>150-152</sup>.

Bien que ATM et CHK2 soient activées, cette voie ne semble pas être prédominante. En effet, leur inhibition ne conduit pas à une hypersensibilité des cellules à la CPT<sup>153</sup>.

## MAPK

Comme dans le cas du Cis, l'importance des MAPKs pour la mort cellulaire induite par la CPT est controversée. Alors que certains auteurs ont montré que la CPT est capable d'activer la voie de RAS/RAF, de ERK, de JNK et de p38 et donc induit l'apoptose<sup>154-155</sup>, d'autres travaux ont montré qu'une inhibition des voies ERK et p38 n'a pas d'effet sur la mort induite par la CPT<sup>156</sup>. Enfin, il a également été montré que l'inhibition de JNK sensibilise les cellules à l'apoptose induite par la CPT<sup>157-158</sup>. Une fois encore, le contexte ou la quantité de dommages pourrait expliquer les différences obtenues.

## PI3K

La CPT induit la voie des PI3Ks même à faible dose<sup>159-160</sup>. L'inhibition de celle-ci empêche le blocage en G1 et protège les cellules des effets de la CPT<sup>136</sup>.

## Cycle cellulaire

A faible concentration, la CPT induit un blocage transitoire en G2 alors qu'à concentration plus forte elle cause une prolongation de la phase S et un arrêt en G2<sup>161</sup>. La CPT induit fortement l'expression de p21 d'une manière dépendante de p38<sup>155</sup>. La phosphorylation de CHK1 sur la Ser345 suite à un traitement à la CPT cause la dégradation de Cdc25a et a un blocage en S et en G2/M<sup>153,162-165</sup>. L'inhibition du blocage en G2/M augmente la cytotoxicité due à la CPT.

## 1.3.5. CONSÉQUENCES CELLULAIRES

---

La réponse au stress peut induire la réorganisation de plusieurs structures cellulaires comme le nucléole, les *nuclear speckles*, les granules de stress ou encore des corps de Cajal (Figure 9).

### Nucléole

Le nucléole est un organite nucléaire composé de trois parties: le centre fibrillaire (CF), la composante fibrillaire dense (CFD) et la composante granulaire (CG). A l'origine connu pour sa fonction de synthèse et de maturation des ARNs ribosomiaux, il possède également des fonctions dans le contrôle du cycle cellulaire<sup>166</sup>, la sénescence<sup>167</sup>, l'apoptose<sup>168</sup> ou la réponse au stress<sup>169-170</sup>. Sa participation à la DDR est maintenant établie<sup>171</sup>.

En cas de dommages à l'ADN, la CFD se ségrège, le CF et CG se condensent et se séparent. Ils forment des structures appelées *nucleolar caps*<sup>172</sup>. L'inhibition de l'ARN Pol II ou de kinases peut également conduire à une ségrégation du nucléole mais d'un type

différent<sup>173-174</sup>. Lors d'un stress génotoxique, la composition nucléolaire change. Certains facteurs se relocalisent dans le nucléole, probablement à cause de l'inhibition de l'ARN Pol II. Des facteurs nucléolaires, en revanche, le quittent suite à l'inhibition de l'ARN Pol I<sup>175</sup>.

Voici quelques exemples de protéines qui lient le nucléole aux stress génotoxiques:

- la protéine nucléolaire p14ARF a un double rôle: elle intervient dans la ribogénèse<sup>176</sup> et séquestre MDM2 dans le nucléole, l'empêchant d'interagir avec p53<sup>177</sup>. En cas de stress génotoxique, (ou d'autres stress affectant le nucléole), p53 est stabilisé d'une manière dépendante du nucléole<sup>178</sup>;
- NBS1 est recrutée au niveau du nucléole en cas de dommage à l'ADN<sup>179</sup>;
- TBP et UBF sont deux facteurs nécessaires à la transcription par l'ARN Pol I. Lors d'un traitement au Cis, ils sont séquestrés au niveau des lésions, entraînant une inhibition de l'ARN Pol I<sup>28</sup>;
- la diminution de la biogenèse des ribosomes est dépendante du facteur de transcription TIF1-A qui, en cas de stress, est phosphorylé par JNK2, l'empêchant d'interagir avec l'ARN Pol I<sup>180</sup>.

### Les nuclear speckles

Les *nuclear speckles* sont des structures dynamiques de stockage des facteurs d'épissage (voir paragraphe «Les nuclear speckles», page 39). Les dommages à l'ADN s'accompagnent souvent d'une inhibition (ou d'un ralentissement) de la transcription. Cela a pour conséquence une diminution du groupe de facteurs d'épissage actifs et un élargissement des *nuclear speckles*<sup>181-182</sup>.

### Les corps de Cajal

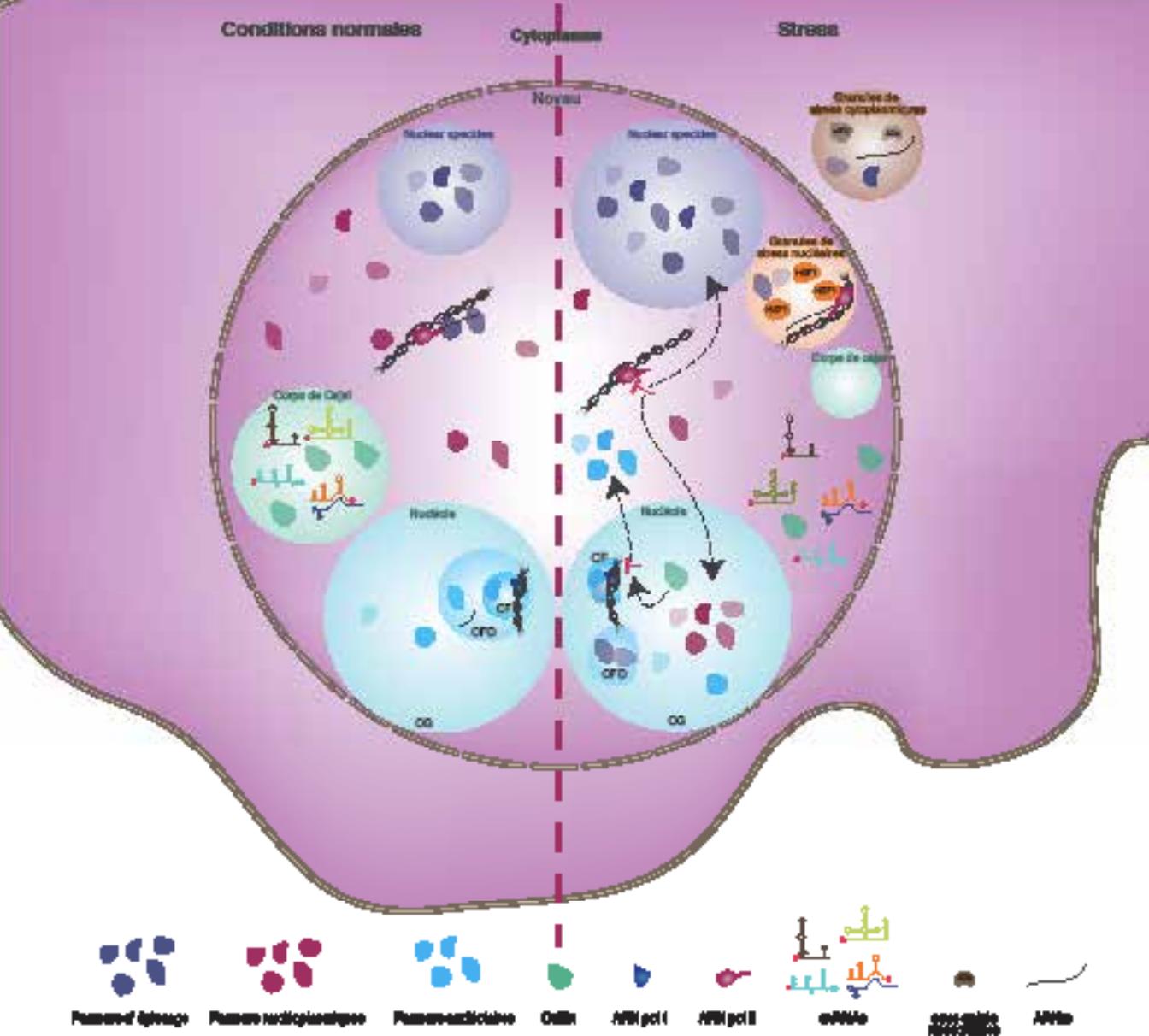
Ces petites structures nucléaires sont responsables, entre autres, de la maturation des snRNPs (voir paragraphe «Les corps de Cajal», page 39). La protéine autour de laquelle se forment les corps de Cajal est la coilin. En cas de dommages à l'ADN (suite à une exposition aux UV), les corps de Cajal sont perturbés et la coilin ainsi que les snRNPs et des facteurs nécessaires à leur maturation en sont exclus<sup>183</sup>.

### Granules de stress cytoplasmiques

Lors de nombreux stress, incluant les stress génotoxiques, des granules de stress cytoplasmiques sont formées. On y retrouve des facteurs de traduction, des ribosomes, des ARNs messager, des protéines de liaison à l'ARN (RBP) et des facteurs de signalisation. Elles sont, en général, formées suite à la phosphorylation de facteurs de traduction tel que eIF2<sup>184</sup>.

## Granules de stress nucléaires

Ce sont des structures de transcription active de microsatellites. Ces séquences sont constituées de répétitions de motifs de 2 à 10 nucléotides et leur transcription est activée par HSF1. Les granules de stress nucléaires ont été découvertes après un choc thermique mais peuvent aussi être observés suite à un stress génotoxique. On y retrouve des facteurs de transcription, de modelage de la chromatine et d'épissage<sup>185</sup>.



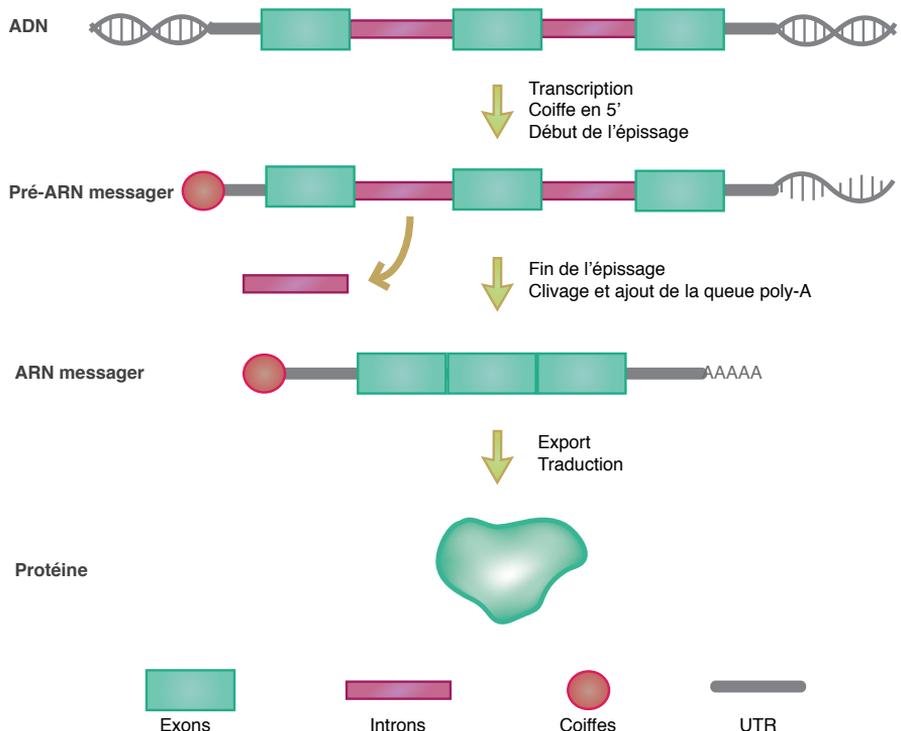
**Figure 9. Conséquences d'un stress génotoxique sur les organites cellulaires.** Lors d'un stress génotoxique, les *nuclear speckles* s'élargissent car des facteurs d'épissage (mauve) y sont relocalisés, notamment à cause de l'inhibition de la transcription. Des granules de stress nucléaires et cytoplasmiques se forment. Les premières sont des zones de transcription des microsatellites où se localisent des facteurs de transcription et d'épissage. Les secondes rassemblent des ARNs messagers, des facteurs de traduction et d'épissage. Les snRNAs et la coilin sortent des corps de Cajal. Le CF et la CFD du nucléole se condensent et se séparent. Des facteurs d'épissage (mauve) et nucléoplasmiques (rose) peuvent entrer dans le nucléole alors que des facteurs nucléolaires (bleu) en sortent. La transcription par l'ARN Pol I est inhibée par la délocalisation de facteurs mais aussi par l'entrée de la coilin dans le nucléole.

## 2. ÉPISSAGE

En 1977, un mécanisme concernant l'ARN a été découvert: l'épissage<sup>186-187</sup>. Les séquences des gènes, et par conséquent les ARN pré-messager dérivés de ceux-ci, ne sont pas uniquement composés de séquences codantes. En plus des extrémités 3' et 5' du gène, qui une fois transcrites, sont appelées régions non traduites de l'ARN messager (UTR), la plupart des gènes eucaryotes sont composés d'une succession de zones codantes (appelées exons) entrecoupées de zones non codantes (appelées introns) (Figure 10)

### 2.1. CONSTITUTIF

Au cours de la maturation de l'ARN pré-messager, les introns sont retirés du transcrit afin de ne laisser que les exons et les UTRs dans celui-ci, c'est le phénomène d'épissage. Une fois l'épissage achevé, le transcrit pourra être traduit en protéines (Figure 10). Les introns sont reconnus et excisés par une des machineries moléculaires les plus complexes de la cellule: le spliceosome.



**Figure 10. De l'ADN à la protéine.** Un gène n'est pas uniquement composé de séquences codantes. Dans l'ARN pré-messager, des UTR sont situés aux deux extrémités et des introns (roses) sont situés entre les exons (turquoises). L'épissage permet de retirer les introns. L'ARN messager coiffé, épissé et polyadénylé est exporté puis traduit en protéine.

### 2.1.1. LE SPLICÉOSOME

Le splicéosome est un énorme complexe composé de cinq snRNPs et de plus de 100 protéines<sup>188</sup>. Il existe deux splicéosomes appelés majeur et mineur. Nous ne développerons ici que le splicéosome majeur, le mineur ne permettant l'épissage que de moins de 1% des introns. Les snRNPs du splicéosome majeur sont appelées U1, U2, U4, U5 et U6 et sont composées de petites séquences d'ARNs spécifiques ainsi que de protéines.

### 2.1.2. SITES D'ÉPISSAGE

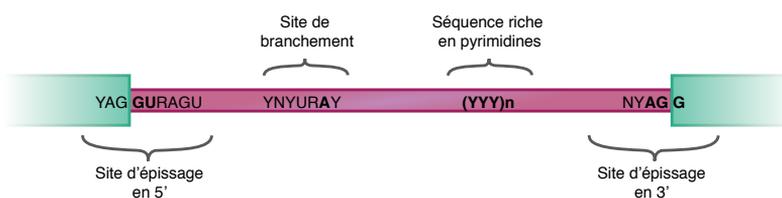
Dans ce paragraphe, nous discuterons des séquences permettant la reconnaissance et l'excision des introns. D'autres séquences, permettant la régulation de l'épissage, notamment par le biais des facteurs d'épissage, seront décrites dans le paragraphe 2.3.1, page 28.

Bien qu'elles ne soient pas suffisantes pour définir un intron, certaines séquences sont nécessaires au recrutement du splicéosome et à l'excision de l'intron l'ARN pré-messager (Figure 11):

- le site d'épissage en 5' de l'intron (également appelé le site donneur) est constitué de la séquence consensus GURAGU à l'extrémité 5' de l'intron mais aussi de la séquence YAG à l'extrémité 3' de l'exon;
- le site de branchement est constitué de la séquence consensus YNYURAY dans laquelle le résidu A est appelé point de branchement. Il est situé du côté 3' de l'intron;
- une séquence de 10 à 40 résidus, riche en Y, est située du côté 3' de l'intron;
- le site d'épissage en 3' de l'intron (appelé site accepteur) est défini par la séquence NYAG.

Y = pyrimidine; R = purine; N= n'importe quel nucléotide.

Cependant, en raison de leur dégénérescence, ces séquences ne représentent que 50% de l'information nécessaire à la reconnaissance correcte du site d'épissage<sup>189</sup>. Le reste de l'information est contenue dans d'autres séquences, dont nous discuterons plus tard.



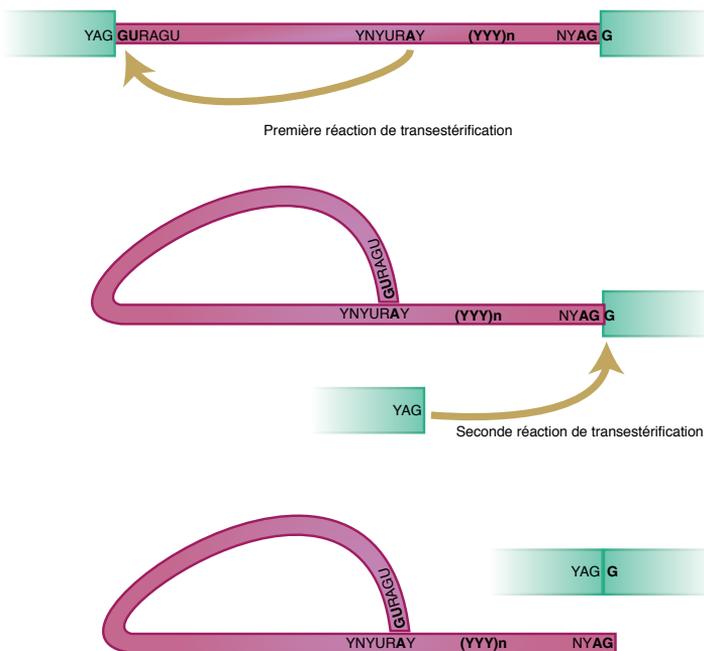
**Figure 11. Sites d'épissage.**

Certaines séquences sont nécessaires à l'épissage: les sites d'épissage en 5' et en 3', le site de branchement et la séquence riche en Y.

### 2.1.3. RÉACTIONS DE TRANSESTÉRIFICATION

Chimiquement, l'élimination de l'intron et la liaison entre deux exons sont réalisées à l'aide de deux réactions de transestérification (Figure 12). Ces réactions ne sont pas catalysées par des protéines mais par l'ARN pré-messager lui-même lorsqu'il est placé dans la bonne position par ses interactions avec le spliceosome. Certains introns sont d'ailleurs capables de s'auto-épisser: l'épissage aura lieu sans l'aide ni du spliceosome ni d'aucune protéine<sup>190</sup>.

La première réaction est une attaque nucléophile de l'A du point de branchement sur le site donneur. La liaison phosphodiester 3'-5' entre le G (de la séquence GURAGU) et la dernière base de l'exon est rompue. L'ARN prend une conformation particulière appelée lariat. L'extrémité 3' de l'exon, à présent libre, attaque alors le site accepteur (seconde réaction). La liaison phosphodiester est rompue ce qui mène à la libération de l'intron et à la liaison des deux exons. L'intron est alors dégradé dans le noyau par des ribonucléases<sup>191</sup>.

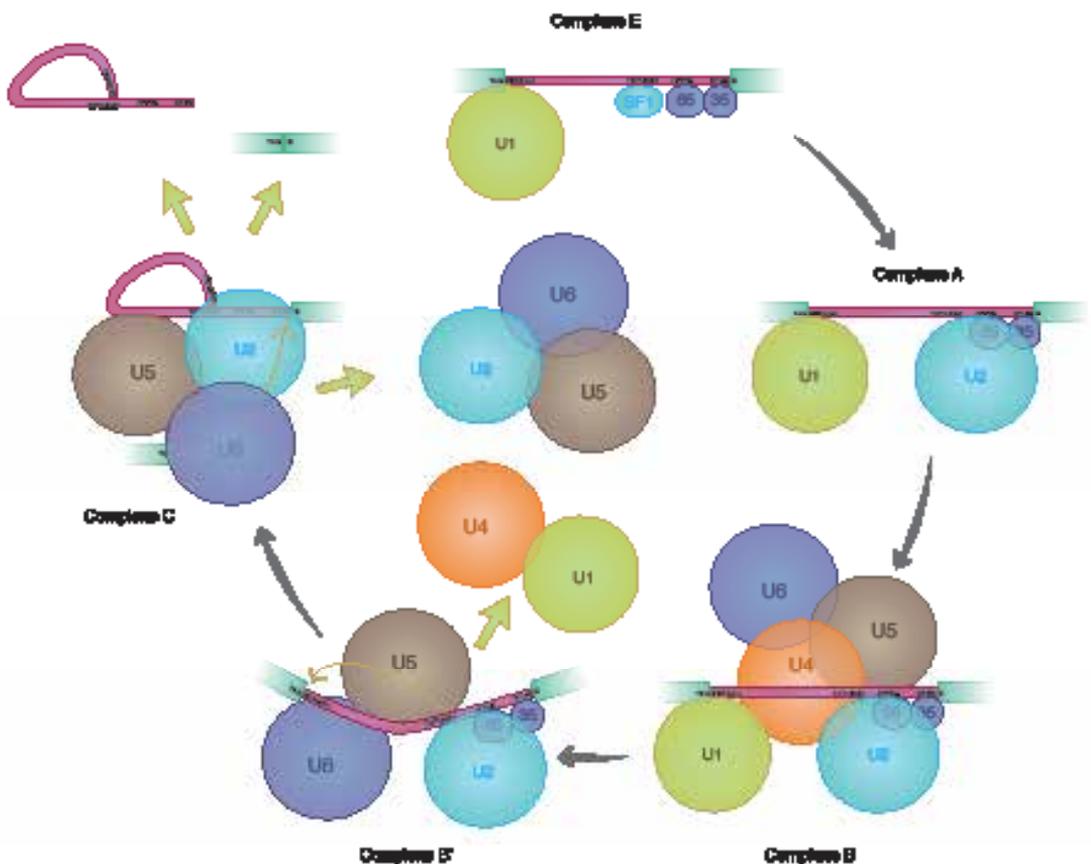


**Figure 12. Réactions de transestérification.** La première est une attaque nucléophile de l'A du site de branchement sur le site d'épissage en 5'. La seconde est une attaque de la G de l'exon sur le site d'épissage en 3'.

### 2.1.4. L'ÉPISSAGE PAS À PAS

Le spliceosome s'assemble en plusieurs étapes (Figure 13), chacune correspondant à un complexe composé de facteurs protéiques et ribonucléiques spécifiques:

- Complexe E: U1 reconnaît le site en 5'. SF1, U2AF65 et U2AF35 reconnaissent respectivement le site de branchement, la suite riche en pyrimidines et le site d'épissage en 3' ;
- Complexe A: l'interaction de SF1 et du complexe U2AF permet le recrutement d'U2. SF1 est relâchée permettant à U2 de se lier au site de branchement ;
- Complexe B: le tri-snRNP U4, U6, U5 est alors recruté au site d'épissage en 5' ;
- Complexe B\*: des changements conformationnels mènent à la déstabilisation des interactions de U4 et U1 et à la première réaction de transestérification ;
- Complexe C: une seconde vague de réarrangements mène à la seconde réaction de transestérification. L'intron est alors éliminé, les snRNP en sont dissociées et l'intron est dégradé.



**Figure 13. L'épissage pas à pas.** Le complexe E est formé par l'association de U1, SF1 et du complexe U2AF qui interagissent, respectivement, avec le site d'épissage en 5', le site de branchement ainsi que la séquence riche en Y et le site d'épissage en 3'. SF1 et U2AF permettent le recrutement de U2 formant ainsi le complexe A. Le triplex U4-U6-U5 est recruté pour former le complexe B. U4 et U1 sont dissociés et la première attaque nucléophile a lieu, c'est le complexe B'. Des modifications conformationnelles permettent la formation du complexe C et la seconde réaction de transestérification. Le spliceosome se dissocie et l'intron libéré est dégradé.

## 2.2. ALTERNATIF

---

L'ARN est bien plus qu'une simple copie de morceaux d'ADN. Un seul gène peut donner naissance à plusieurs transcrits grâce à un mécanisme appelé « épissage alternatif » (AS)<sup>192</sup>. Chez l'homme, on considère que le nombre de transcrits est d'au moins 200 000 alors que le génome humain compte moins de 25 000 gènes.

Des parties de séquences peuvent être retenues ou exclues de l'ARN messager mature grâce à l'AS. Si le nombre de nucléotides inclus ou exclus de la séquence codante est un multiple de 3, il n'y aura pas de modification du cadre de lecture (environ 40% des événements d'AS)<sup>193</sup>. L'AS sera alors appelé *frame preserving*. Dans le cas contraire (*frame-switching*), les modifications du cadre de lecture vont mener à un codon stop prématuré. Certains de ces transcrits seront éliminés par un mécanisme de surveillance appelé NMD (pour *non sense mediated decay*)<sup>194</sup>.

### 2.2.1. RÔLES

---

Le rôle majeur de l'AS est l'augmentation de la diversité protéique. Grâce à l'AS, deux protéines issues d'un même gène peuvent avoir des fonctions différentes, voire opposées. Outre cette fonction générale, de nombreuses fonctions cellulaires sont régulées grâce à ce processus. Il permet aux cellules, entre autres, de répondre à un stimulus ou encore de modifier le protéome, durant la différenciation cellulaire ou suite à un stress par exemple. Puisque l'AS concerne une très large majorité des transcrits humains, il a potentiellement un rôle dans toutes les fonctions cellulaires.

L'AS peut soit modifier le produit du gène, soit mener à une modulation de la demi-vie de l'ARN messager. Soit par l'intermédiaire du NMD (25% des AS y mènent)<sup>194-195</sup>, soit en insérant ou retirant des sites reconnus par des miARN par exemple.

Au niveau protéique, des études à grande échelle ont montré que l'AS ne modifie généralement pas la structure globale de la protéine car les exons alternatifs sont majoritairement situés dans les régions non structurales<sup>196</sup> et extérieures des protéines<sup>197</sup>. Le rôle de l'épissage est donc de moduler la fonction de la protéine plutôt que de la changer radicalement.

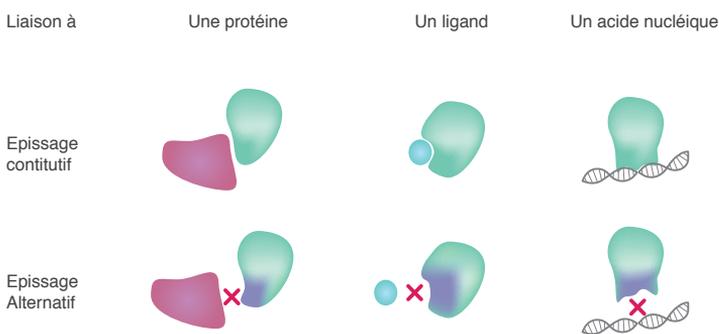
Sur le plan évolutif, le nombre d'exons alternatifs est plus élevé chez les vertébrés que chez les invertébrés<sup>198</sup>. Kelemen et ses collègues suggèrent également que l'AS pourrait être un marqueur spécifique d'une espèce. En effet, la comparaison des exons chez l'humain et la souris montre que 11% des exons constitutifs chez l'un sont alternatifs chez l'autre<sup>199</sup>. Au sein de la même espèce, il existe également des différences d'AS en fonction de l'individu<sup>200</sup>. Aux échelles tissulaires et cellulaires, les exons alternatifs sont mieux conservés dans le système nerveux que dans les autres tissus, alors que des variations

très importantes sont observées dans les cellules cancéreuses et germinales suggérant une utilisation de l'AS pour augmenter la variation d'expression et la sélection naturelle<sup>201</sup>.

Les revues de Kelemen et Stamm reprennent un grand nombre d'épissages alternatifs connus et leurs conséquences sur la protéine produite<sup>199,202</sup>. Quelques mécanismes généraux décrits par ces auteurs sont résumés ici:

### Changement des capacités de liaison de la protéine (Figure 14)

- avec d'autres protéines: la modification par AS d'un domaine de liaison peut entraîner une perte ou une modification des partenaires;
- avec un ligand: la modification d'un site de liaison avec un ligand peut diminuer ou empêcher sa liaison;
- avec les acides nucléiques: la modification ou l'abolition d'un domaine de liaison à l'ARN ou l'ADN aura comme effet la perte ou la modification de l'activité de la protéine. Dans certains cas, celle-ci aura un rôle de dominant négatif;



**Figure 14. Modifications de la capacité de liaison d'une protéine subissant un AS.** Les zones modifiées par l'épissage sont représentées en mauve.

### Changement des modifications post-traductionnelles

L'AS peut avoir comme conséquence l'insertion ou la délétion de sites de modification post-traductionnelles. Il peut également modifier la liaison d'une enzyme (kinase, phosphatase, acétylase,...) ou encore changer la localisation de la protéine, ce qui modifie le répertoire de partenaires avec lesquels elle peut interagir.

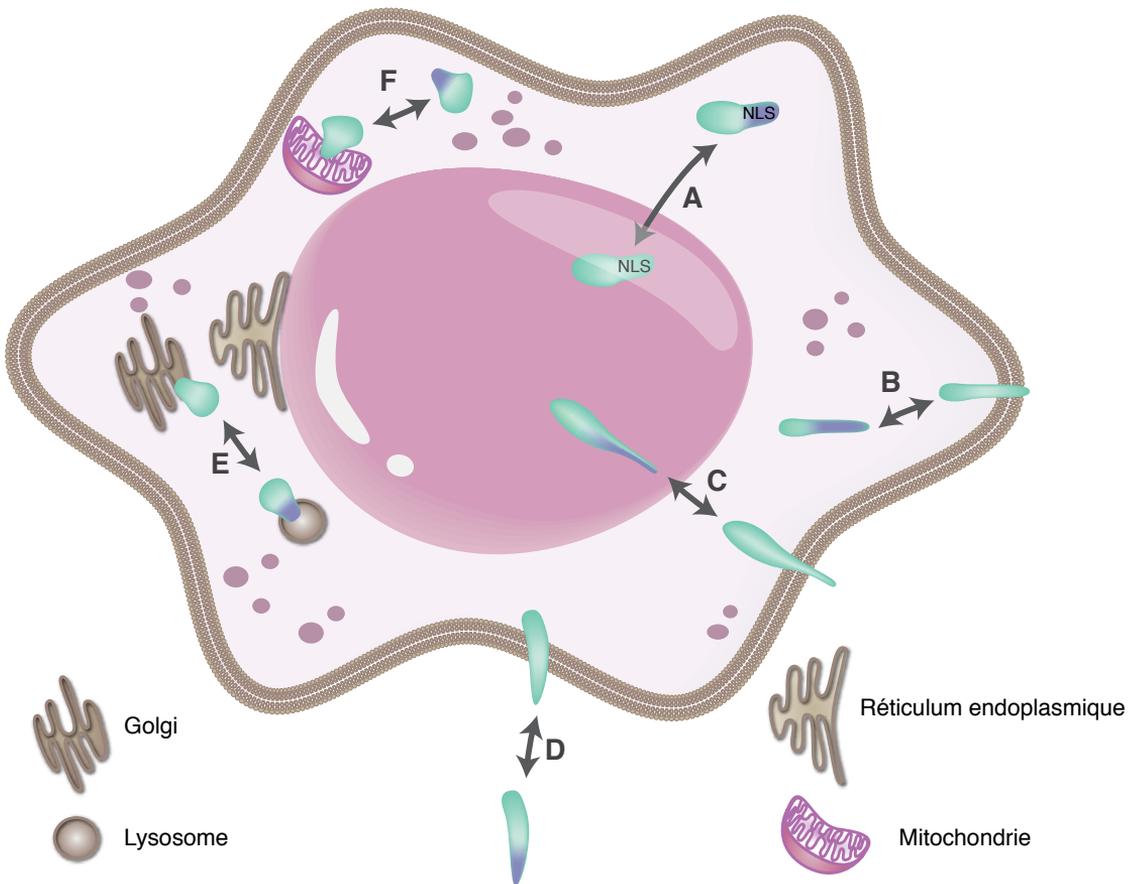
### Changement de la stabilité de la protéine

Une modification dans la partie C-terminale d'une protéine peut la rendre plus sensible à la dégradation.

### Changement de la localisation intra-cellulaire (Figure 15)

L'AS peut modifier la localisation des protéines en changeant le signal de localisation,

ses interactions avec d'autres protéines ou encore les séquences qui subissent des modifications post-traductionnelles. Une protéine pourra alors être séquestrée à un endroit où elle n'aura pas de fonction ou déplacée dans un compartiment où sa fonction sera différente. La perte d'un domaine de type *leucine zipper* peut, par exemple, transformer une protéine nucléaire en protéine cytoplasmique. Dans le cas des protéines trans-membranaires, la perte du domaine intra-membranaire pourra engendrer une protéine qui sera retenue dans le cytoplasme ou, au contraire, sécrétée; une modification de ce domaine peut aussi empêcher une oligomérisation.



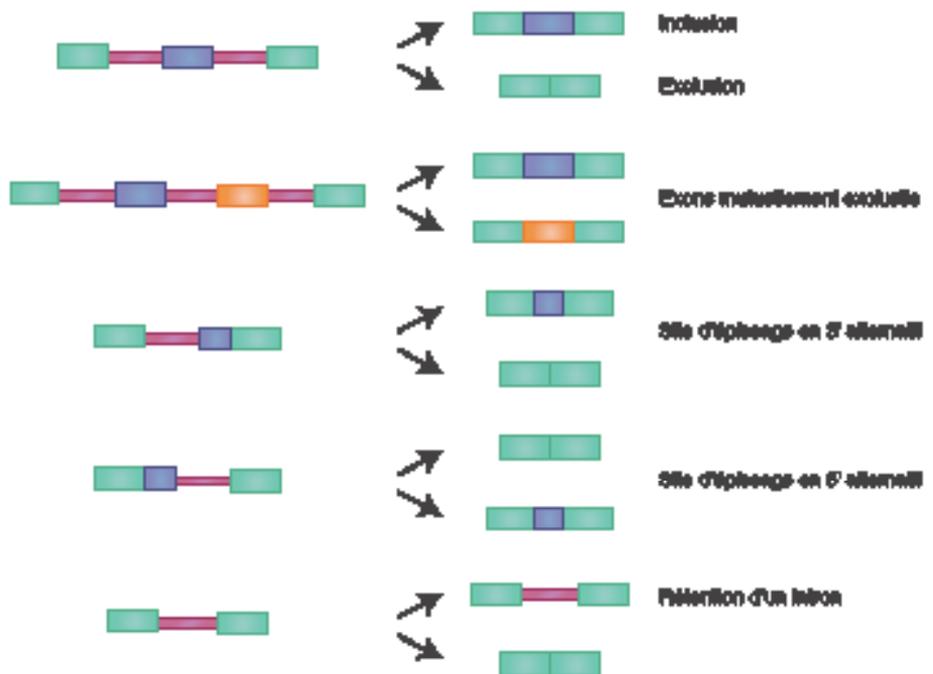
**Figure 15. Modifications de localisations liées à l'AS.** Les zones de la protéine codées par l'exon alternatif sont colorées en mauve. A. Modification entre une localisation cytoplasmique et nucléaire, souvent liée à une modification du signal de localisation nucléaire (NLS). B. Changement entre une localisation membranaire et cytoplasmique souvent dû à une modification du domaine trans-membranaire. C. Modification entre une localisation membranaire et nucléaire. D. Modification entre une localisation membranaire et sécrétée. E. Localisation différente entre des membranes internes. F. Modification de localisation mitochondriale. Figure adaptée de 199

## 2.2.2. TYPES

Il existe différents types d'AS dont les principaux sont (Figure 16):

- l'inclusion ou l'exclusion d'un ou plusieurs exons complets (environ 40% des épissages alternatifs chez l'humain)<sup>198</sup>;
- l'utilisation d'un site donneur ou d'un site accepteur alternatif (environ 20% des événements)<sup>198</sup>;
- l'exclusion mutuelle de deux exons (très rare);
- l'inclusion d'un intron (environ 10% des épissages alternatifs).

Certains auteurs considèrent également l'utilisation de promoteurs ou de terminaisons alternatives comme de l'AS bien que ce ne soit pas la machinerie d'épissage qui soit impliquée.



**Figure 16. Types d'épissage alternatif.** Les exons constitutifs sont représentés en turquoise, les introns en rose, les exons (ou les parties d'exons) alternatifs en mauve ou en orange.

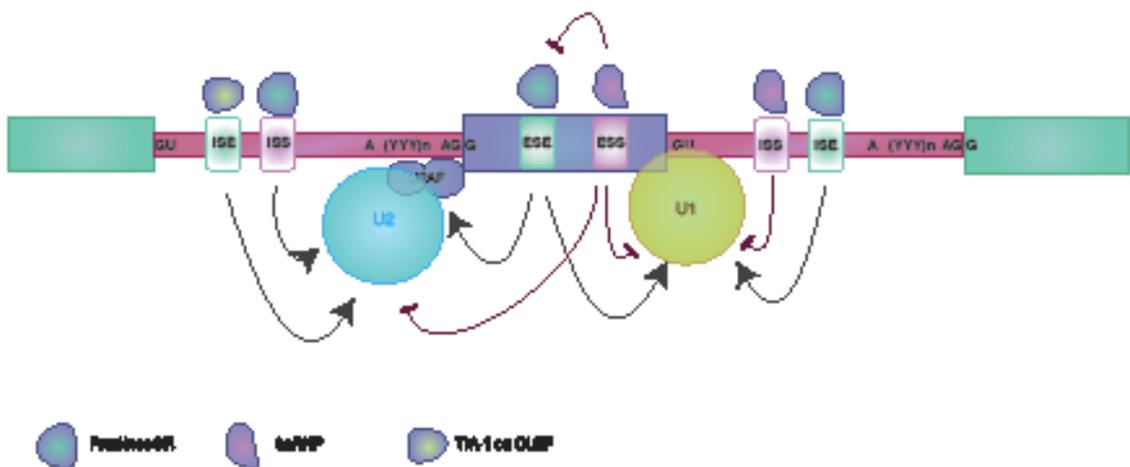
## 2.3. RÉGULATION

L'épissage est finement régulé. Le spliceosome et les nombreuses protéines qui y sont associées forment un complexe très dynamique impliquant des interactions entre protéines, entre les protéines et l'ARN et entre différents ARNs. La régulation peut se faire à différents niveaux: à la reconnaissance du site d'épissage, à la fixation du spliceosome, mais aussi durant chacune des étapes de l'épissage qui nécessitent des réorganisations et des modifications de partenaires d'interactions.

### 2.3.1. AU NIVEAU DES SÉQUENCES

De manière générale, les séquences consensus des sites d'épissage des exons alternatifs sont moins conservées que celles des exons constitutifs<sup>203</sup>, ce qui explique l'implication fréquente de séquences régulatrices additionnelles. Le nombre d'éléments responsables de la régulation de chaque exon est estimé entre 12 et 19<sup>204</sup>. Des facteurs d'épissage sont capables de s'y fixer et de conduire au recrutement du spliceosome. Ces séquences sont également utilisées pour la régulation fine de l'épissage de manière tissu-spécifique mais aussi en réponse à divers stimuli.

Les séquences cis-régulatrices de l'épissage, sont classées et nommées en fonction de deux critères: leur localisation et leur effet sur l'épissage. Les ESE (exonic splicing enhancers) et ESS (exonic splicing silencers) sont des séquences situées dans les exons qui favorisent ou répriment l'épissage, respectivement. Les ISE (intronic splicing enhancers) et ISS (intronic splicing silencers) sont quant à eux situés dans les introns (Figure 17).



**Figure 17. Éléments cis-régulateurs.** Des séquences régulatrices sont présentes dans les introns et les exons. Elles peuvent avoir un effet positif sur le recrutement du spliceosome ou, à l'inverse, l'inhiber.

Les ESEs furent les premières séquences régulatrices de l'épissage découvertes<sup>205</sup>. Elles sont capables de stimuler le recrutement de U2AF, U1 et U2 sur des sites d'épissage dont les séquences sont dégénérées (appelés sites d'épissage faibles)<sup>206</sup>. Elles ont été identifiées grâce à leur capacité à lier des protéines (essentiellement les protéines SR dont nous discuterons dans le paragraphe 2.3.2.1, page 31) mais aussi grâce au fait que la mutation de ces séquences diminue l'efficacité de l'épissage. Il est maintenant démontré que les ESEs sont également nécessaires pour l'épissage d'exons constitutifs<sup>207-209</sup>. Les ESEs les plus étudiés contiennent des séquences riches en purines et notamment la séquence consensus GAR qui permet la liaison de SRSF1 et Tra2<sup>210-211</sup>. Cependant, il a été démontré que d'autres types de séquences sont capables de former de ESE dont des séquences riches en pyrimidines capables de recruter des facteurs d'épissage comme SRSF1<sup>212</sup>. Les sites de reconnaissance de nombreuses protéines SR ont été déterminés par des expériences *in vitro* et la présence de ces sites consensus dans les exons permet, dans une certaine mesure, de prédire la présence d'un ESE<sup>210,213-214</sup>. Il est toutefois démontré que certains ESEs sont indépendants de la présence de protéines SR tels que les ESEs riches en AC qui interagissent avec les facteurs YB-1 et p72<sup>206</sup>.

Les ESSs se retrouvent notamment dans les exons alternatifs. Ceux-ci vont généralement être liés par les hnRNPs (qui seront décrites dans le paragraphe 2.3.2.1, page 31) dont le domaine de reconnaissance à l'ARN est très variable<sup>206</sup>. La hnRNP la plus étudiée dans le cadre de ESSs est hnRNPA1 qui se lie à la séquence consensus UAGGGA/U<sup>215</sup>.

De nombreuses séquences régulatrices sont présentes dans les introns. Les sites de liaison pour les protéines régulatrices peuvent se trouver près du point de branchement, près du site d'épissage en 5', dans la suite de résidus riche en pyrimidines mais également à distance de ces sites, parfois à des centaines de nucléotides de l'exon régulé. Comme les ESEs, ils sont conservés et peuvent être identifiés par alignement de séquences<sup>206</sup>.

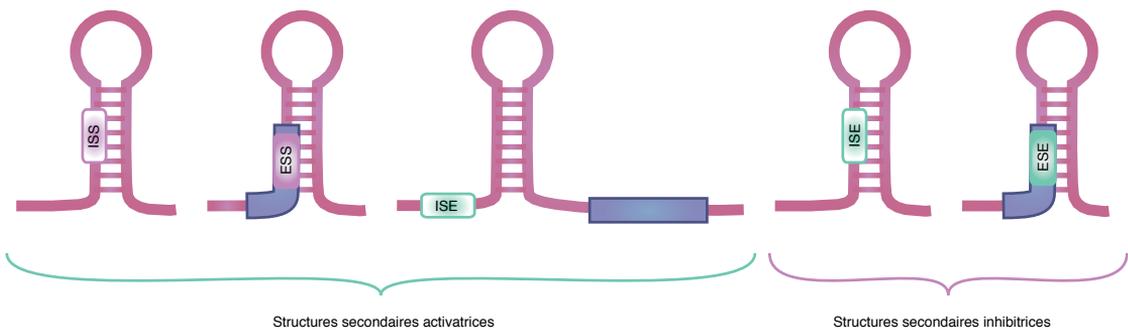
Les ISEs sont moins bien décrits que les ESEs. Certains d'entre eux semblent également dépendants des protéines SR<sup>216-217</sup> alors que d'autres semblent utiliser une mécanistique différente. Les ISEs peuvent être composés de séquences riches en uridines auxquelles TIA-1 peut se fixer<sup>218</sup>. Des séquences riches en UG permettent le recrutement de protéines de la famille CELF<sup>219</sup>. Des répétitions de l'hexanucléotide UGCAUG sont fréquemment retrouvées dans les ISEs, elles sont généralement situées après l'exon régulé, à des distances pouvant être supérieures à 500 nucléotides<sup>220-222</sup>. Le pentanucléotide GGGGG est également connu pour sa capacité à favoriser l'épissage<sup>206</sup>.

L'étude des ISSs a montré qu'ils sont capables de lier des protéines SR qui peuvent donc, en fonction du contexte, avoir un effet activateur ou répresseur de l'épissage<sup>206</sup>. hnRNPA1 (bien connu pour se lier aux séquences ESSs) se lie également aux ISSs.

Contrairement aux protéines SR, il semble que tous les sites de liaison de hnRNPA1 soient inhibiteurs<sup>206</sup>. La protéine PTB se lie aux UUCU présents dans les suites riches en pyrimidines et réprime l'épissage<sup>223-226</sup>, notamment par compétition avec U2AF.

La régulation de l'épissage est complexe. Les séquences peuvent contenir à la fois des zones de répression et d'activation de l'épissage. L'équilibre entre l'expression et/ou la localisation des différents facteurs décidera de la conséquence sur l'épissage de la séquence<sup>206</sup>. Des sites qui se chevauchent peuvent également mener à un encombrement stérique empêchant la liaison de facteurs<sup>220, 227-228</sup>. Par ailleurs, des éléments peuvent réprimer ou favoriser l'épissage. Par exemple la liaison de RBFOX1 et RBFOX2 à UGCAUG a pour conséquence d'empêcher la liaison de U2AF et de réprimer l'épissage<sup>229</sup>. Le triplet GGG peut réprimer ou activer l'épissage selon qu'il se trouve dans un intron ou dans un exon<sup>228</sup>.

En plus des séquences cis régulatrices, la structure secondaire de l'ARN peut également influencer l'épissage. Certaines structures peuvent inhiber l'épissage et d'autres le favoriser (Figure 18). Les structures inhibitrices peuvent bloquer l'accès des snRNPs aux sites d'épissage, et ainsi empêcher la liaison de facteurs d'épissage. Au contraire, certaines structures secondaires permettent de rapprocher des séquences régulatrices mais aussi, dans des introns très longs, les sites en 3' et 5' d'épissage<sup>230</sup>. Il a également été démontré que certains facteurs d'épissage se fixent préférentiellement aux structures en forme d'épingle<sup>231</sup>.



**Figure 18. Structures secondaires de l'ARN influençant l'épissage.** A. Les structures activatrices peuvent masquer des ISSs et/ou des ESSs ou rapprocher des ISEs ou des exons éloignés. B. Les structures inhibitrices peuvent masquer des éléments régulateurs (ISEs ou ESEs par exemple), ou des exons entiers ou non.

### Cas des éléments Alu

Les éléments Alu sont des rétrotransposons d'environ 280 nucléotides. Les estimations démontrent qu'il en existe 1,1 million de copies dans le génome humain<sup>232-234</sup>. La plupart des éléments Alu sont situés dans les introns, où ils sont présents dans les deux sens de lecture et peuvent former des structures secondaires en s'appariant<sup>235-236</sup>.

La présence d'éléments Alu dans les introns peut influencer l'AS, notamment en for-

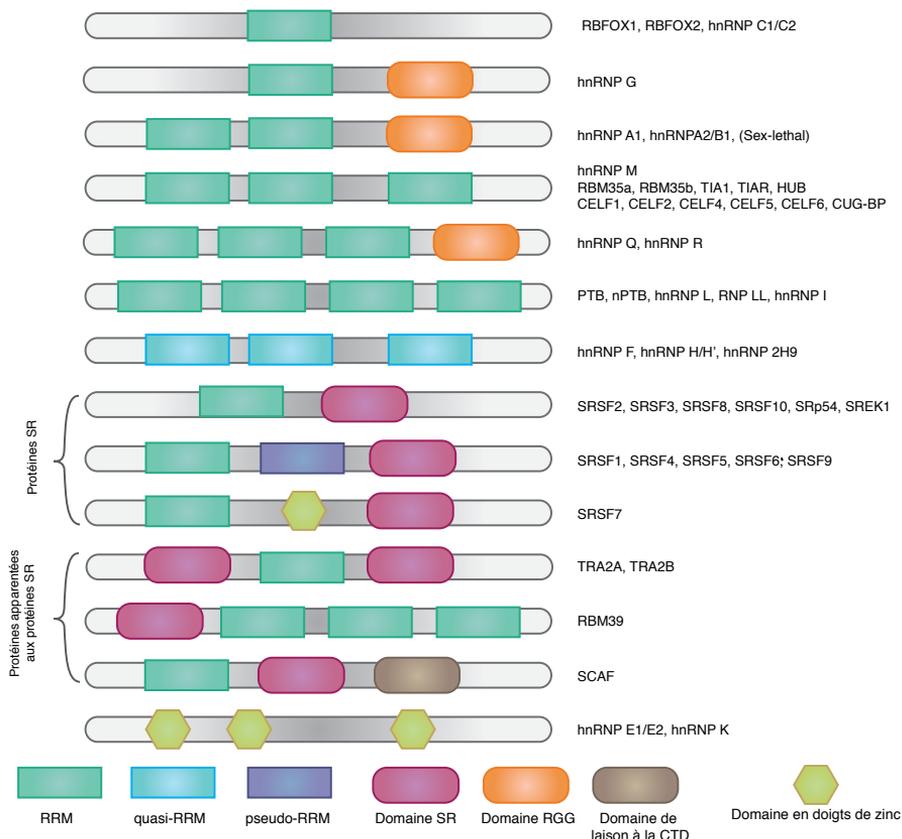
mant des zones double-brin dans l'ARN permettant l'édition<sup>237</sup>. Les éléments Alu peuvent également contenir des sites de recrutement de certains facteurs d'épissage, comme les protéines SR et hnRNPs. Par exemple, les sites cryptiques d'épissage sur les éléments Alu sont capables de recruter U2AF65 et hnRNPC. Suite à la perte de hnRNPC, ils sont inclus comme des exons<sup>238</sup>. Les éléments Alu peuvent également contenir des ISE et des ISS<sup>239-240</sup>.

## 2.3.2. AU NIVEAU DES PROTÉINES RÉGULATRICES

Des analyses par spectrométrie de masse ont montré qu'environ 170 protéines sont associées au splicéosome<sup>241</sup>. Certaines constituent le cœur du splicéosome d'autres, ayant un rôle régulateur, sont appelées facteurs d'épissage.

### 2.3.2.1. PROTÉINES SR ET HNRNP

Les protéines SR et les hnRNPs sont les deux grandes familles de facteurs d'épissage.



**Figure 19. Domaines des facteurs d'épissage.** Les facteurs d'épissage comportent divers domaines. Certains permettent la liaison à l'ARN (RRM (turquoise), quasi RRM (bleu), pseudo RRM (mauve), domaine en doigts de zinc (jaune)). Les domaines SR (rose) et RGG (orange) permettent la liaison à la fois à l'ARN et aux protéines et le domaine de liaison à la CTD (brun) permet l'interaction avec l'ARN Pol II.

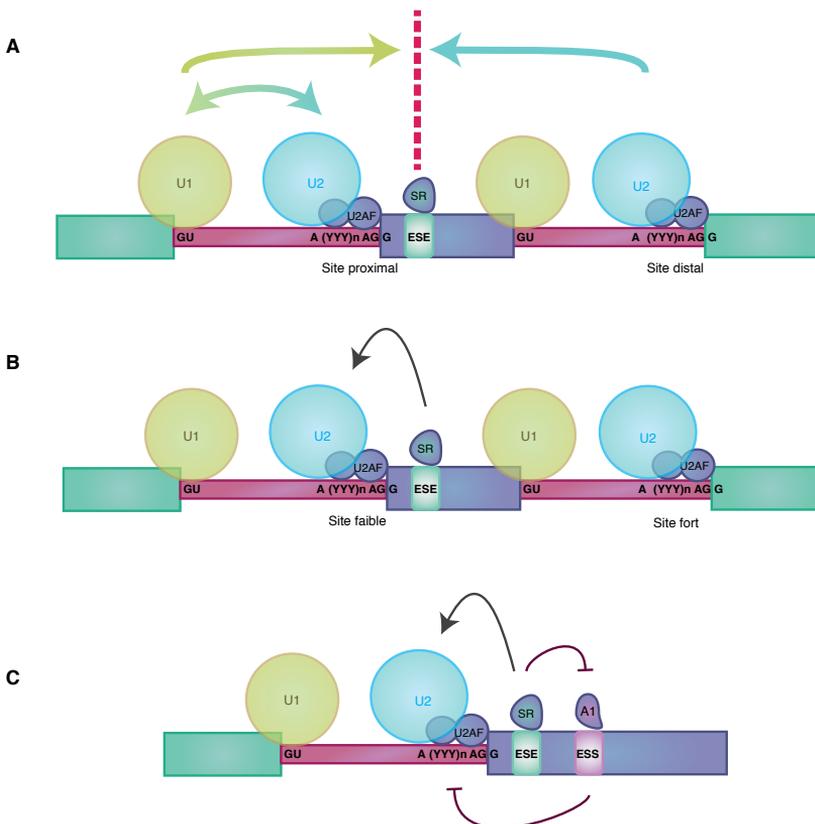
Les premières participent au recrutement du spliceosome au niveau des sites d'épissage<sup>206, 242</sup> alors que les secondes sont, en général, leurs antagonistes. Ces différents facteurs d'épissage possèdent des domaines leur permettant de se lier à l'ARN, dont des RRM (pour *RNA recognition motifs*), des domaines KH (pour *K homology*) ou des domaines en doigts de zinc capables de reconnaître des séquences spécifiques sur l'ARN (Figure 19).

Certains facteurs d'épissage (comme les hnRNPs, Sam68 ou EWS) possèdent un domaine RGG, riche en arginines (Arg) et en glycines (Gly). Ce domaine aurait un rôle dans les interactions avec les protéines et l'ARN. Certaines Arg peuvent y être méthylées. Ces domaines sont également présents dans des protéines qui n'ont pas de rôle connu dans l'épissage comme la fibrillarine ou la nucléoline<sup>243</sup>.

Les protéines SR sont caractérisées par la présence d'un ou deux RRM, et d'un domaine SR riche en résidus Ser et Arg<sup>242,244</sup>. Ce domaine faciliterait l'assemblage du spliceosome en permettant les interactions entre les protéines mais également avec l'ARN<sup>245-247</sup>.

La première protéine SR étudiée, SRSF1 (anciennement appelée SF2/ASF), a un rôle à la fois dans l'épissage constitutif et dans l'AS<sup>248-251</sup>. Cette observation est également valable pour d'autres protéines de la famille SR<sup>252-254</sup>.

De manière générale, les protéines SR favorisent l'inclusion d'exons de trois manières (Figure 20): par la sélection de sites d'épissage proximaux par rapport aux distaux (Figure 20 A)<sup>251, 252, 255, 256</sup>, via le recrutement de la machinerie d'épissage sur des sites d'épissage

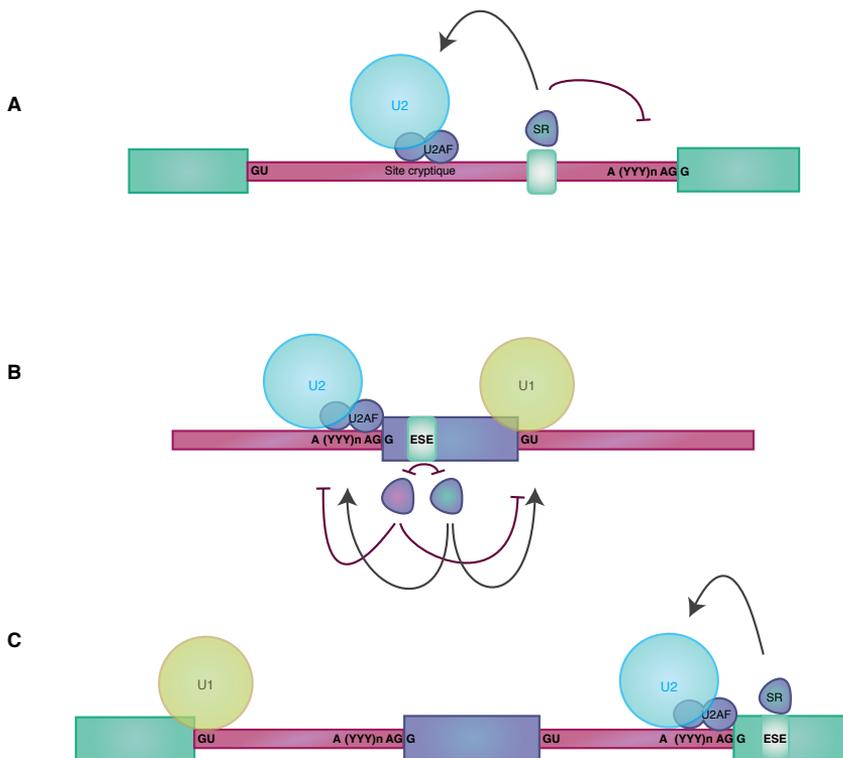


**Figure 20. Les protéines SR (mauve et turquoise) favorisent l'inclusion d'exons.** A. Elles permettent la sélection d'un site d'épissage proximal en favorisant la communication entre les sites d'épissage en 5' et 3'. B. Elles permettent le recrutement du spliceosome sur des sites d'épissage faibles. C. Elles sont en compétition avec des protéines inhibitrices (comme hnRNP A1 (A1, mauve et rose)). Figure adaptée de 258. Les exons constitutifs sont représentés en turquoise et les exons alternatifs en mauve.

faibles<sup>257</sup> (Figure 20 B) ou par l'inhibition de la fixation d'autres facteurs qui répriment l'épissage (hnRNPA1 par exemple)<sup>258</sup> (Figure 20 C).

Cependant, les protéines SR peuvent également entraver la sélection d'un site d'épissage. Trois explications sont proposées (Figure 21):

- elles peuvent reconnaître une séquence qui ressemble à un ESE et activer un site cryptique d'épissage au dépens du site réel (Figure 21 A);
- certaines protéines SR ont un effet plus faible sur le recrutement du splicéosome, elles peuvent même l'empêcher ce qui entraîne l'émergence de compétitions entre les protéines SR<sup>259</sup> d'activités différentes (Figure 21 B);



**Figure 21. Les protéines SR peuvent réprimer l'épissage.** A. En recrutant le splicéosome sur un site cryptique d'épissage. B. Par compétition avec d'autres protéines SR moins fortes ou inhibitrices (mauve et rose). C. En recrutant le splicéosome sur un site distal. Figure adaptée de 258. Les exons constitutifs sont représentés en turquoise et les exons alternatifs en mauve.

- la fixation des protéines SR à un exon situé à côté de l'exon alternatif va favoriser son exclusion<sup>260-261</sup> (Figure 21 C).

D'autres protéines, appelées protéines apparentées aux protéines SR, possèdent également un domaine SR<sup>262</sup>. Certaines sont des composants importants de la machinerie d'épissage comme U2AF35, U2AF65, RBM39 ou encore SNRNP70. Des kinases phosphorylant les protéines SR, comme les Clks font également partie de cette famille<sup>258</sup>.

Dû à la manière dont elles ont été définies (à savoir, des protéines capables de se lier

aux hnRNA<sup>263</sup>) les hnRNPs ont une plus grande diversité structurale et fonctionnelle que les protéines SR.

Comme les protéines SR, elles peuvent avoir des rôles en dehors de l'épissage, notamment dans la réparation de l'ADN, la biogenèse des télomères, la polyadénylation, la traduction, la stabilité et l'édition de l'ARN, ...<sup>264-265</sup>. Seule la moitié des hnRNPs (A1, A2, F, H, H', 2H9, K, E, G, I, L, M, P, Q et R) ont un rôle connu dans l'épissage<sup>266</sup>. Bien qu'il existe des exceptions, elles ont en général un rôle antagoniste à celui des protéines SR, à savoir une répression de l'épissage favorisant l'exclusion d'exons. Elles possèdent différents domaines de liaisons à l'ARN leur permettant de se fixer à des séquences spécifiques (souvent des ISS ou des ESS), le plus fréquent étant le RRM<sup>266-267</sup>. Les hnRNPs A et H reconnaissent les triplets GGG<sup>215,268-269</sup>.

Différents mécanismes permettent aux hnRNPs de réguler négativement l'épissage (Figure 22):

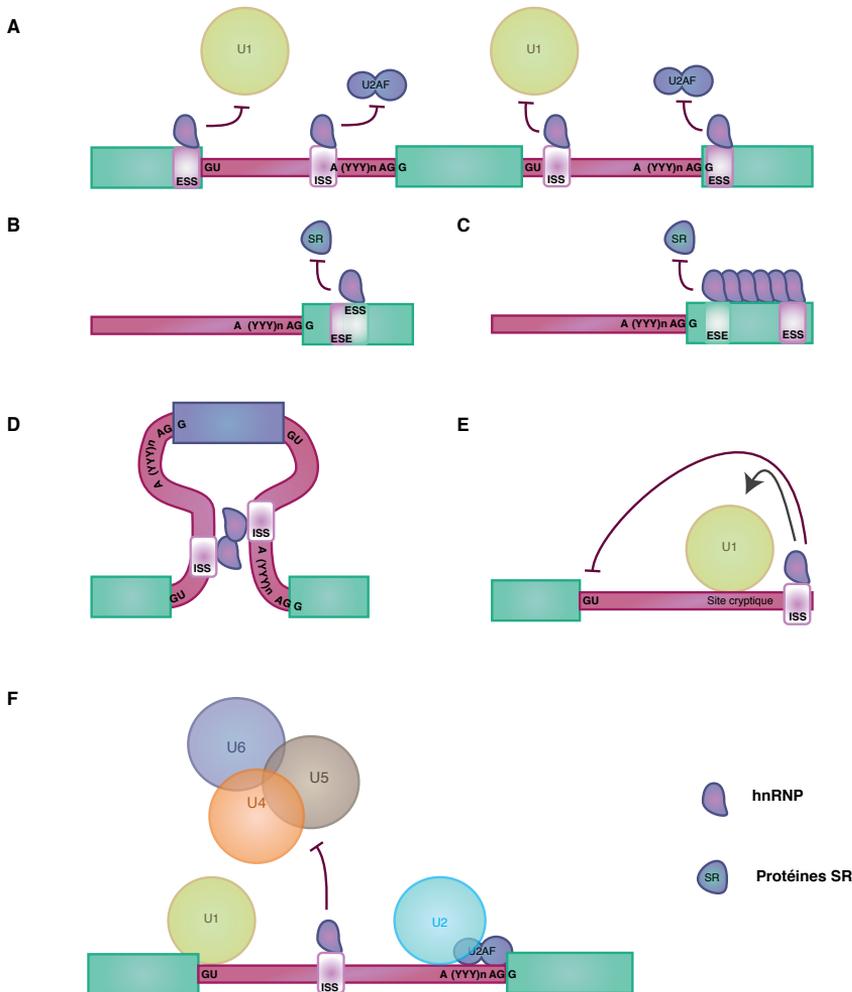
- elles se fixent près du site d'épissage en 3' ou en 5' et empêchent, respectivement, la liaison de U2AF ou de U1<sup>270-272</sup> (Figure 22 A);
- elles peuvent empêcher la fixation de protéines SR:
  - en se fixant sur un site recouvrant celui de la protéine SR<sup>213, 273-276</sup> (Figure 22 B);
  - en se propageant depuis un site plus lointain<sup>256, 273, 277</sup> (Figure 22 C);
- leur capacité à s'oligomériser peut mener à la formation de boucles dans l'ARN, masquant ainsi certains exons<sup>273, 278</sup> (Figure 22 D);
- certaines d'entre elles peuvent se fixer à un site ressemblant à un site d'épissage en 5' et, par leur interaction avec des facteurs d'épissage (notamment les protéines SR)<sup>279-280</sup>, empêcher l'épissage d'un site 5' proche<sup>281</sup> (Figure 22 E);
- elles peuvent aussi permettre la fixation du spliceosome mais empêcher des étapes ultérieures comme la formation du complexe B<sup>282</sup> (Figure 22 F).

Certaines hnRNPs peuvent stimuler l'épissage dont hnRNPH qui favorise le recrutement de U1<sup>283</sup>. Le modèle expliquant cette dualité de fonction postule qu'en permettant la formation d'une boucle, ces hnRNPs pourraient rapprocher les sites d'épissage en 3' et 5'<sup>266</sup>.

### 2.3.2.2. DIFFÉRENTS TYPES DE RÉGULATIONS

La régulation de l'activité des facteurs d'épissage peut avoir lieu à plusieurs niveaux:

- au niveau de l'expression<sup>284-292</sup>. Même s'il existe une certaine redondance fonctionnelle



**Figure 22. Mode de fonctionnement des hnRNPs.**

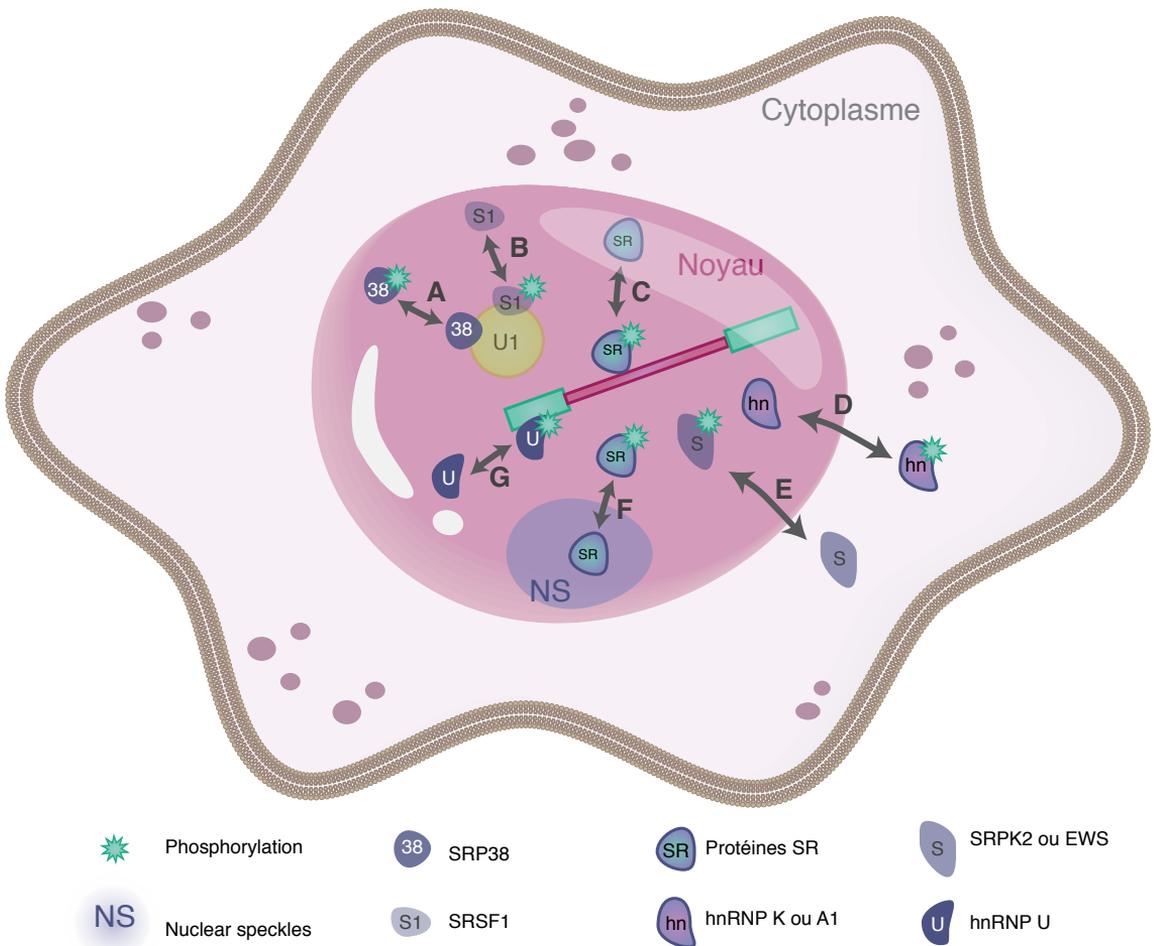
Elles peuvent empêcher la liaison du spliceosome (A) ou des protéines SR, soit parce que leurs sites de liaison se recouvrent (B), soit en s'oligomérisant depuis un site lointain (C). Leur capacité à oligomériser peut également entraîner la formation de structures secondaires dans l'ARN empêchant la reconnaissance d'un exon (D). Elles peuvent recruter le spliceosome sur un site cryptique (E) ou empêcher la formation du complexe B (F).

entre les facteurs d'épissage, des régulations affectant spécifiquement leur expression peuvent entraîner des modifications d'épissage par l'intermédiaire de mécanismes de compétition entre facteurs plus ou moins efficaces;

- au niveau post-traductionnel. Les facteurs d'épissage peuvent être méthylés<sup>293-297</sup>, SUMOylés<sup>298-299</sup>, acétylés<sup>300-301</sup> et phosphorylés<sup>302</sup>. La phosphorylation est la modification la mieux étudiée des facteurs d'épissage. Les mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation sont essentiels pour l'épissage<sup>303</sup>. La phosphorylation des protéines SR est nécessaire au recrutement du spliceosome alors que, la déphosphorylation est essentielle pour la catalyse de l'ARN pendant l'épissage<sup>304-305</sup>. Cette régulation est certainement plus fine. En effet, il existe de nombreux sites pouvant être phosphorylés (notamment sur le domaine SR)<sup>306</sup>, il est donc possible que la régulation soit spécifique au site modifié.

La phosphorylation a trois conséquences majeures (Figure 23):

- **Interactions.** L'interaction de U1 avec SRP38 est diminuée si celle-ci est phosphorylée<sup>307</sup> alors que la phosphorylation de SRSF1 augmente son interaction avec U1<sup>304</sup>. Par ailleurs, la phosphorylation des protéines SR sur leur domaine SR modifie leur interaction avec l'ARN<sup>304, 308</sup>;
- **Localisation.** De nombreux facteurs d'épissage (tant les protéines SR que les hnRNP) font la navette entre le noyau et le cytoplasme d'une manière dépendante de la phosphorylation<sup>309-312</sup>. La phosphorylation de hnRNP K et de hnRNPA1 conduit à leur accumulation dans le cytoplasme<sup>313-315</sup>, alors que la phosphorylation de EWS ou de SRPK2 (une kinase des protéines SR) augmente leur localisation nucléaire<sup>316-317</sup>. La localisation intra-nucléaire peut également être modifiée par la phosphorylation. Par exemple, la phosphorylation des protéines SR leur permet de quitter les *nuclear speckles*<sup>318-319</sup>. La phosphorylation de hnRNP U lui permet



**Figure 23. Influences de la phosphorylation sur les facteurs d'épissage.** La phosphorylation peut augmenter (A) ou diminuer (B) la liaison au spliceosome, à l'ARN (C) ou à un exon (G). Elle peut augmenter (D) ou diminuer (E) la localisation cytoplasmique. F: Les protéines SR phosphorylées quittent les « nuclear speckles » (NS).

de se lier à l'exon 3 de la caspase 9 et de favoriser son épissage alors qu'il est habituellement réprimé par la présence de hnRNPL<sup>320</sup>;

- **Stabilité.** Une modification de phosphorylation peut également avoir un rôle sur la demi-vie d'un facteur d'épissage<sup>321</sup>.

### 2.3.2.3. VOIES SIGNALÉTIQUES IMPLIQUÉES

Les modifications des facteurs d'épissage dépendent de voies signalétiques qui permettent l'adaptation de l'épissage aux stimuli.

Notamment, de nombreuses kinases et phosphatases sont impliquées dans la phosphorylation des facteurs d'épissage. Certaines, comme les SRPK (kinases des protéines SR), les Clk/Sty et les DYRK ont comme principaux substrats les protéines SR. D'autres kinases, moins spécifiques, sont également capables de modifier la phosphorylation des facteurs d'épissage: la Topo I, AKT, PKA, p38 en sont des exemples<sup>258, 313, 322-324</sup>. De la même manière, les phosphatases PP1 et PP2A comptent des facteurs d'épissage parmi leur cibles<sup>305, 325-326</sup>.

Les méthyltransférases de la famille PRMT sont capables de méthyler le domaine RGG présent dans certaines hnRNPs<sup>327</sup>.

Certaines protéines établissent des connections entre les voies signalétiques et l'épissage. HnRNP K et la famille des protéines STAR en sont les principaux représentants<sup>328</sup>.

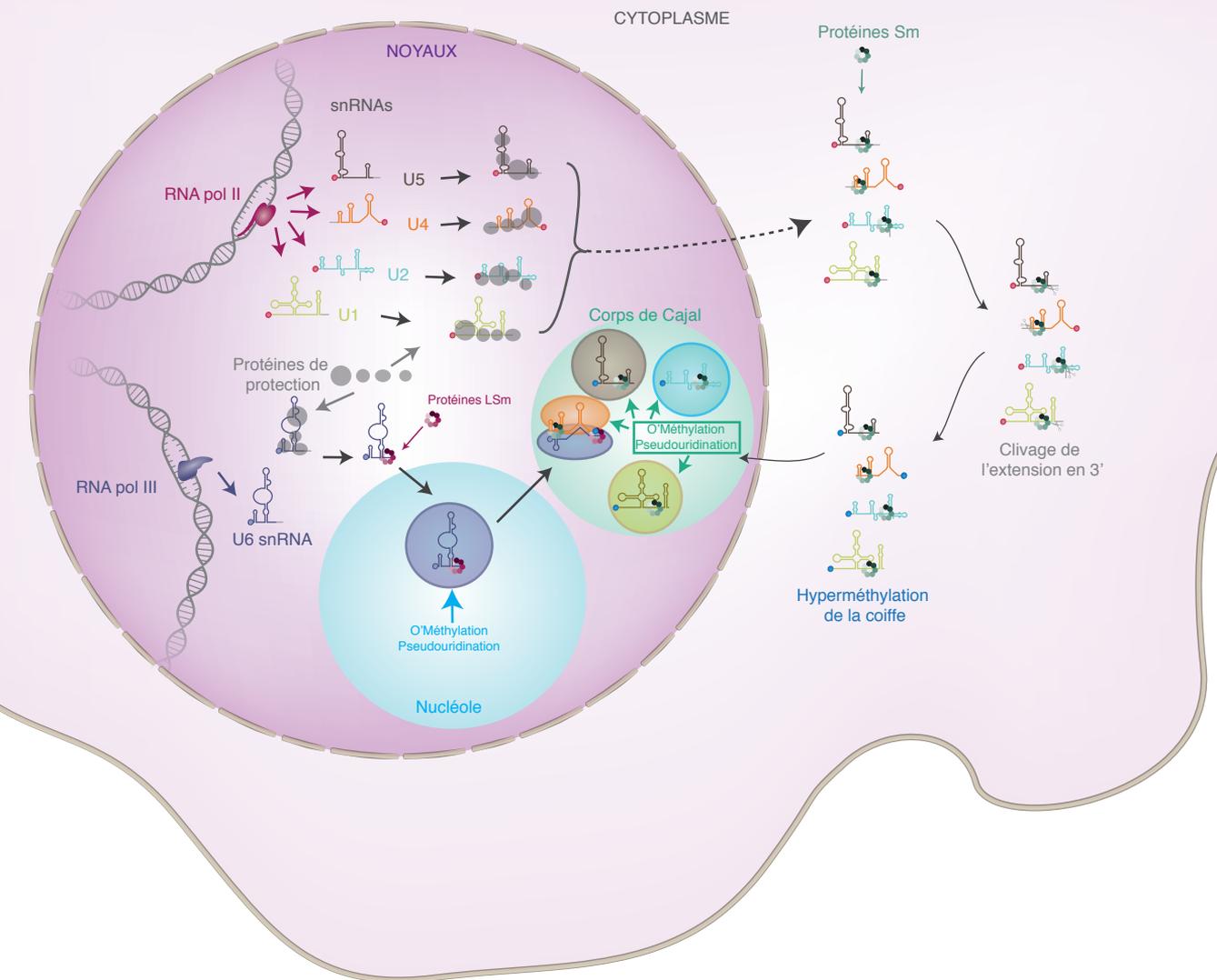
- Sam68 est la protéine STAR la plus étudiée. Elle est capable d'interagir avec de nombreux facteurs d'épissage et la machinerie de transcription<sup>329-331</sup> et peut être phosphorylée par Src<sup>332-334</sup> et par ERK<sup>335</sup>;
- hnRNP K interagit également avec de nombreux facteurs d'épissage<sup>336-337</sup> mais aussi avec des protéines de signalisation comme Vav, Src et PKC. Src, PKC, EKR et JNK sont capables de la phosphoryler<sup>280</sup>, notamment suite à un stimulus par des cytokines ou des hormones<sup>338-339</sup>

Certaines voies signalétiques utilisent l'épissage pour créer des boucles de régulation négatives. Par exemple, CD44, CD45, NMDAR ou PKC vont induire des voies signalétiques qui mènent à leur propre AS<sup>340-344</sup>.

En plus des modifications post-traductionnelles, l'activation de certaines voies signalétiques peut modifier la stabilité de facteurs d'épissage<sup>345-346</sup>.

### 2.3.3. ORGANITES CELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS L'ÉPISSAGE

Le noyau est composé de plusieurs sous-structures qui ont des fonctions particulières.



**Figure 24. Maturation des U snRNPs.** U1, U2, U4 et U5 sont synthétisés par l'ARN Pol II et U6 par l'ARN Pol III. Ils sont alors liés par des protéines de protection. Les protéines LSm se fixent autour de U6 alors que les autres snRNAs sont exportés dans le cytoplasme où les protéines Sm s'y fixent. L'extrémité 3' est clivée et la coiffe de U1, U2, U4 et U5 est hyperméthylée. Ils sont ensuite ré-importés dans le noyau où ils se localisent dans les corps de Cajal pour y être O-méthylés et pseudouridinés puis les protéines nécessaires à leur structure s'y fixent. L'O-méthylation, la pseudouridination et l'association avec des protéines de U6 se font dans le nucléole. U6 et U4 s'associent dans les corps de Cajal.

La localisation des gènes et des protéines n'est pas le fait du hasard. Ainsi, il a été montré que certains gènes se localisent dans des domaines nucléaires distincts en fonction de leur statut de transcription<sup>347-348</sup>. Des études en microscopie électronique ont suggéré que les gènes transcriptionnellement actifs sont regroupés dans des sites où ils sont transcrits, et cela même s'ils sont situés à de grandes distances dans le chromosome ou sur des chromosomes différents<sup>349-353</sup>. L'épissage étant souvent co-transcriptionnel, les zones de transcription active correspondent également aux sites où se trouvent les facteurs d'épissage.

Il est estimé que seuls 10 à 15 % des composants du spliceosome sont liés aux ARN

pré-messagers à un moment donné<sup>354</sup>. Ils sont majoritairement localisés dans trois types de structures nucléaires:

- les corps de Cajal;
- les *nuclear speckles*, également appelés clusters de granules interchromatiniennes (IGC);
- les fibrilles péri-chromatiniennes (PF) qui correspondent aux transcrits en cours de synthèse. Le splicéosome y est actif.

### Les corps de Cajal

Les snRNAs (à l'exception de U6) sont transcrits par l'ARN Pol II. Ils possèdent alors une coiffe en 5' et une courte extension en 3' (Figure 24). Une fois transcrits, ils sont rapidement associés aux protéines qui les protègent de la dégradation et exportés dans le cytoplasme. Ils s'associent alors aux protéines Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F et G) qui sont communes aux snRNPs (sauf U6)<sup>355</sup>. Ces protéines forment des anneaux autour de séquences conservées dans les snRNAs<sup>356-358</sup>. L'extension en 3' est alors retirée et la coiffe hyperméthylée<sup>359-360</sup>. La présence des protéines Sm et de la coiffe modifiée permet le ré-import des snRNPs dans le noyau (Figure 24) où elles s'accumulent alors dans des structures appelées corps de Cajal<sup>361-362</sup> pour y terminer leur maturation. Elles sont notamment pseudouridinées et O-méthylées sur certains résidus spécifiques<sup>363-364</sup>. D'autres protéines s'associent aux snRNPs pendant la maturation, comme par exemple l'association du tri-complexe SF3a à U2<sup>365</sup>.

La synthèse et la maturation de U6 est différente puisqu'il est transcrit par l'ARN Pol III et n'est pas exporté dans le cytoplasme pour sa maturation<sup>366</sup>. Après transcription et association avec les protéines LSm<sup>367</sup>, les réactions de O-méthylation et de pseudouridylation se déroulent alors dans le nucléole<sup>368</sup>. U6 se dirige ensuite vers les corps de Cajal où il s'associe avec U4 puis U5 pour former le triplexe U4/U6/U5. Ce dernier peut être formé de novo ou être recyclé. Après une réaction d'épissage le triplexe doit être reformé pour pouvoir initier une nouvelle réaction<sup>369</sup>.

Les corps de Cajal n'ont pas uniquement un rôle dans la maturation des snRNP formant le splicéosome mais contiennent également des télomérases, des snoRNPs ou encore U7.

### Les *nuclear speckles*

Les *nuclear speckles*, d'une taille variant de 1 à plusieurs microns<sup>370</sup>, sont localisés près des PF<sup>371-375</sup>.

En plus des facteurs d'épissage et de snRNPs, ils contiennent des kinases et phosphatases ayant un rôle dans l'épissage, comme par exemple les Clk ou PP1. On y retrouve

également des facteurs impliqués dans la transcription (notamment l'ARN Pol II) la maturation des ARNs et la traduction<sup>376</sup>. Ils contiennent des ARN polyadénylés<sup>377</sup> mais pas (ou peu) d'ADN<sup>370</sup>. Ils ne possèdent ni membrane ni de structure interne et doivent leur cohésion aux interactions entre les protéines d'épissage<sup>378</sup>.

Le domaine SR est nécessaire et suffisant pour la localisation d'une protéine dans les *nuclear speckles* même si d'autres domaines protéiques semblent également impliqués dans cette localisation<sup>379-384</sup>.

Les *nuclear speckles* sont des structures très dynamiques qui s'élargissent quand la transcription est inactivée<sup>182,385</sup> et rétrécissent lorsque la transcription de gènes contenant des introns est stimulée<sup>385,386</sup>.

Leur fonction est encore controversée entre un simple site de stockage de facteurs d'épissage et un lieu où ces derniers deviendraient fonctionnellement compétents<sup>377</sup>. Une hypothèse serait que les *nuclear speckles* régularaient le réservoir de facteurs accessibles pour l'épissage et la transcription<sup>385</sup>.

### Quel rôle pour le nucléole?

Un grand nombre de protéines (plus de 4500) peuvent être localisées dans le nucléole<sup>387</sup>. Des études protéiques réalisées sur près de 700 protéines nucléolaires ont montré que seul 30% d'entre-elles ont un rôle dans la formation des ribosomes (ribogénèse)<sup>175</sup>. De manière intéressante, on y retrouve 38 qui sont des facteurs d'épissage et 19 hnRNPs (15 des 16 hnRNPs qui ont un rôle dans l'épissage sont nucléolaires)<sup>175</sup>.

Même si le rôle du nucléole dans l'épissage est rarement envisagé dans la littérature, il existe de nombreux arguments qui vont dans ce sens:

- de nombreuses protéines ayant un rôle dans l'épissage peuvent avoir une localisation nucléolaire en absence<sup>175,361,388</sup> ou en présence d'un stress<sup>389-390</sup>, ou encore suite à une modification post-traductionnelle comme la méthylation<sup>391</sup>;
- des protéines nucléolaires participent activement aux mécanismes d'épissage:
  - L'hélicase de l'ARN PRP43, qui est nécessaire pour la dissociation des U snRNPs de l'intron après la réaction d'épissage, a également un rôle dans la synthèse des ARN ribosomiaux (ARNr)<sup>392-393</sup>. Une autre hélicase de l'ARN, DDX21 $\beta$ , se localise dans les *nuclear speckles* et dans le nucléole<sup>394</sup>;
  - SRrp37, une protéine associée aux protéines SR, peut interagir à la fois avec des facteurs d'épissage et des sous-unités des ribosomes. Elle est présente dans le nucléole ainsi qu'au sein des *nuclear speckles*, suggérant un rôle dans les deux processus<sup>395</sup>;

- la nucléoline, en plus d'interagir avec des protéines ayant un rôle dans l'épissage<sup>396</sup>, peut quitter le nucléole et se localiser dans les *nuclear speckles* lorsqu'elle est acétylée<sup>397</sup>. Elle serait responsable du repliement correct des ARNrs pendant leur synthèse<sup>398</sup> et garantirait un bon repliement des ARNs pré-messagers pendant leur transcription et épissage. D'autres facteurs ont une localisation à la fois nucléolaire et au sein des *nuclear speckles*<sup>399-401</sup>;
- la coilin, protéine centrale des corps de Cajal, sert de lien entre ceux-ci et le nucléole<sup>402</sup>. Elle peut interagir avec les ARNrs et les snRNPs<sup>403</sup>. Les corps de Cajal se localisent à la périphérie des nucléoles<sup>404</sup> et, dans certaines conditions, à l'intérieur de celui-ci<sup>405-406</sup>. La mutation de la coilin peut modifier la structure des corps de Cajal et celle du nucléole<sup>407</sup>.
- des snRNP peuvent également se retrouver dans le nucléole dans certaines conditions<sup>408-409</sup>. La dernière étape de maturation des ARNrs et des snRNAs est la O-méthylation et la pseudouridination réalisée par les snoRNAs<sup>180,410</sup>. En plus de leur maturation dans le corps de Cajal, les U1, U4, U5 et U6 peuvent être maturées dans le nucléole<sup>368,410-411</sup>;
- certains ARNs messagers se trouvent dans le nucléole<sup>412-415</sup> par lequel ils pourraient transiter avant leur exportation vers le cytoplasme<sup>416</sup>.

### 2.3.4. COUPLAGE DE L'AS AVEC D'AUTRES MÉCANISMES

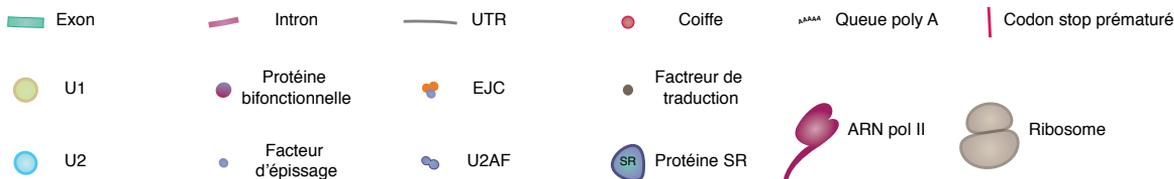
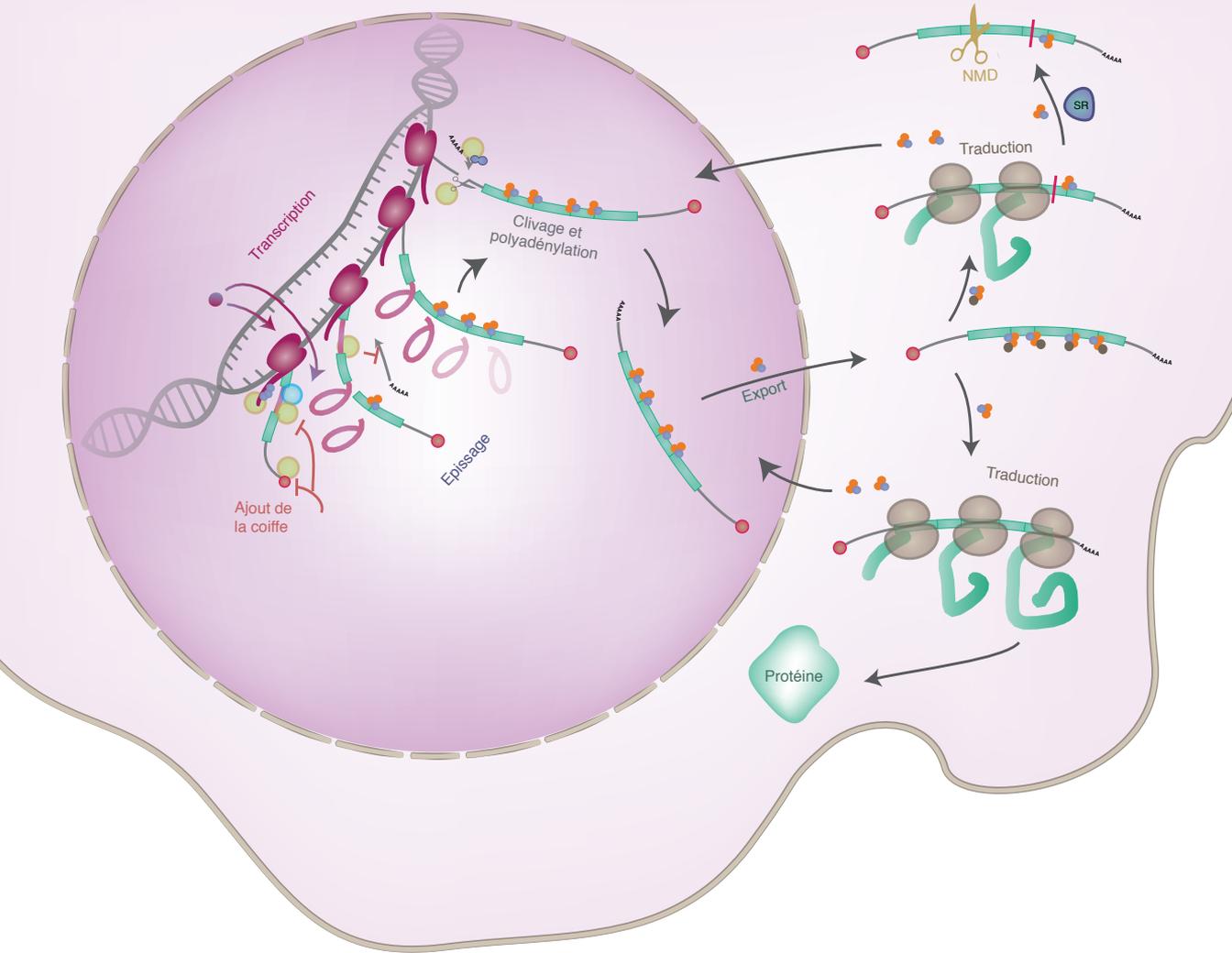
Les fonctions nucléaires sont intimement liées et l'épissage est couplé avec d'autres mécanismes cellulaires (Figure 25):

#### Ajout de la coiffe

La première modification de l'ARN au cours de la transcription est la modification de son extrémité 5' en 7-méthyl guanosine. Cette « coiffe » le protège de la dégradation par les exonucléases mais il a également été montré qu'elle peut influencer l'épissage. En effet, U1 interagit avec la coiffe et une perturbation du complexe de fixation de la coiffe affecte l'assemblage du splicéosome<sup>417-418</sup>.

#### Polyadénylation

L'extrémité 3' de l'ARN messenger mature est générée par clivage du transcrit en cours



**Figure 25. Couplage de l'épissage avec d'autres mécanismes.** Lors de la transcription, des facteurs d'épissage sont recrutés sur le transcrit en cours de synthèse, notamment via la région CTD de l'ARN Pol II. Certains facteurs ont un rôle à la fois dans l'épissage et la transcription. U1 est également recruté au niveau de la coiffe et l'inhibition du complexe de synthèse de la coiffe empêche le recrutement de U1 sur l'ARN. U1 contrecarre également une polyadénylation précoce. U1 et U2AF interagissent avec le complexe de clivage et de poly adénylation. L'EJC (un complexe composé de facteurs d'épissage et de facteurs de traduction) joue un rôle dans l'export de l'ARN messager, dans la traduction et la NMD. Les protéines SR jouent également un rôle dans le NMD.

d'élongation puis par polyadénylation. Les facteurs de clivage et de polyadénylation sont connus pour être modulés par la machinerie d'épissage grâce à leurs interactions avec U2AF65 et U1<sup>419-423</sup>. De plus, U1 empêche un clivage et une polyadénylation précoce<sup>424</sup>.

## Export

L'épissage favorise l'exportation nucléaire<sup>425</sup>. Il a été montré que le complexe de jonction exonique (EJC) inclut des protéines impliquées dans l'épissage et est important pour l'export des ARNs<sup>426-429</sup>.

## Traduction

eIF4A3, un facteur d'initiation de la traduction, est recruté au niveau de l'EJC<sup>430-431</sup>. De plus, la présence et la position des introns sont connues pour influencer la traduction<sup>432-434</sup>. Le fait que certains facteurs d'épissage fassent la navette entre le noyau et le cytoplasme serait lié à leur rôle dans l'export nucléaire et/ou dans la traduction. L'épissage peut également modifier le niveau protéique en modifiant la production de miRNA introniques<sup>487</sup>

## NMD

L'épissage et le NMD sont intimement liés<sup>435-436</sup>, notamment par l'intermédiaire de l'EJC<sup>437-439</sup>. Les protéines SR sont également connues pour guider les transcrits porteurs d'un codon stop prématuré vers le processus de NMD<sup>440</sup>.

## Structure de la chromatine

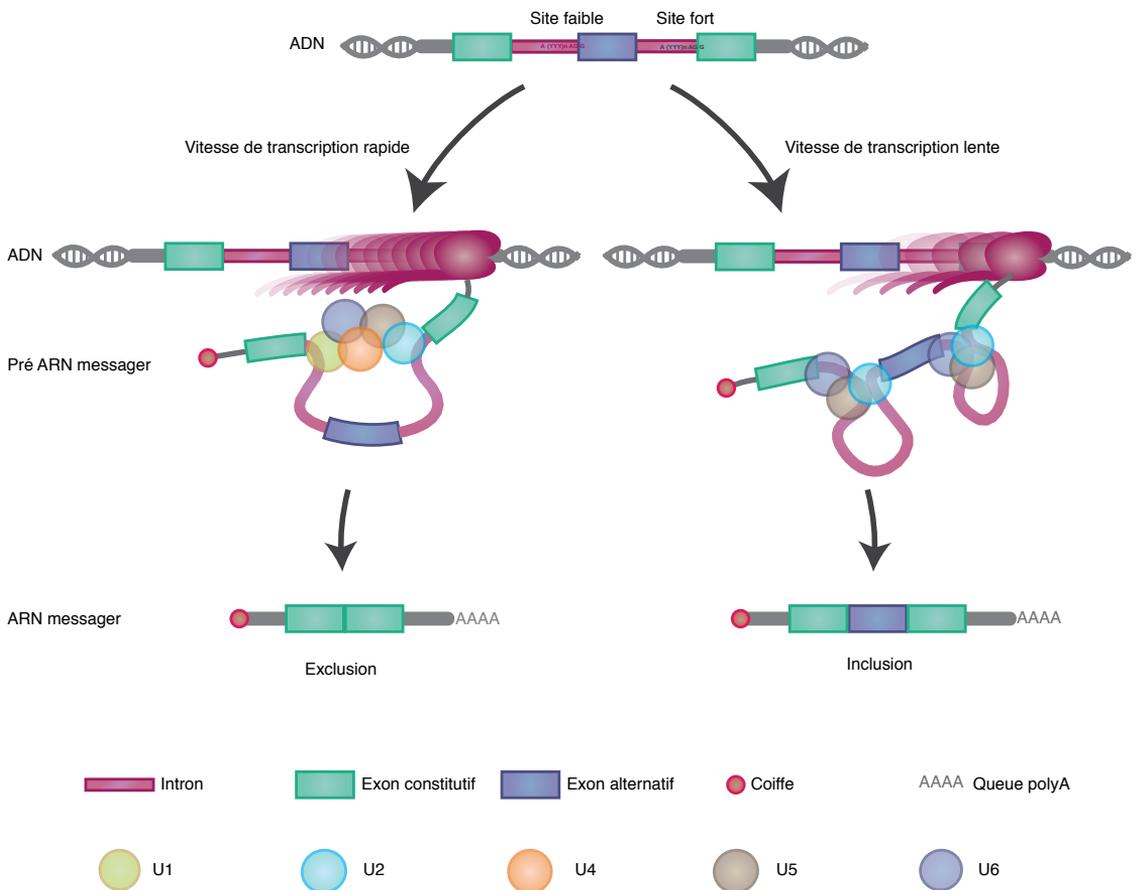
Il est connu que les nucléosomes sont plutôt situés au niveau des exons et que les exons alternatifs sont plus méthylés que les constitutifs<sup>441-444</sup>. Une modification de méthylation d'un gène peut influencer l'épissage du transcrit correspondant<sup>445</sup>. Des modifications des histones sont connues pour modifier l'épissage<sup>446</sup>. La localisation des facteurs d'épissage peut être dépendante de la modification de la structure de chromatine<sup>447</sup>.

## Transcription

Le couplage le plus étudié est celui liant l'AS et la transcription. Même si certains exons sont épissés post-transcriptionnellement, l'épissage est majoritairement co-transcriptionnel. Des analyses biochimiques et par microscopie électronique ont démontré que l'épissage se réalise sur le transcrit en cours de synthèse<sup>448-451</sup> et que les ARNs messagers épissés co-localisent avec l'ADN du gène correspondant<sup>386,452-454</sup>. Les facteurs d'épissage sont recrutés sur le transcrit aussi vite qu'il est synthétisé<sup>455-459</sup>. Un élément important pour le couplage AS-transcription est la partie C-terminale de l'ARN Pol II (CTD) qui permet le recrutement du splicéosome sur le transcrit en cours de synthèse<sup>460-462</sup>. La transcription

influence l'épissage par différents mécanismes:

- **par recrutement.** Les facteurs d'épissage peuvent être recrutés au niveau de la machinerie de transcription par leurs interactions avec l'ARN Pol II, notamment via la CTD<sup>463-468</sup> mais également avec d'autres composants de la machinerie de transcription<sup>469</sup>. L'activation de Sam68 par ERK induit la formation d'un complexe contenant entre autres l'ARN Pol II, par exemple<sup>331</sup>;
- **par la double fonction de certains facteurs.** Certaines protéines sont connues pour avoir un rôle à la fois dans la transcription et dans l'épissage, qu'il soit constitutif ou alternatif<sup>470-4768</sup>. Par exemple, RBM39 module la transcription et l'épissage de gènes sensibles à la progestérone<sup>477</sup>. Les SCAFs, qui forment un groupe de protéines interagissant avec la CTD et possédant un domaine SR et un domaine de liaison à l'ARN, pourraient également assurer cette double fonction<sup>479</sup>;
- **par l'intermédiaire des promoteurs.** La nature du promoteur et son occupation par des facteurs de transcription spécifiques peuvent influencer l'épissage<sup>480-482</sup>. Certains



**Figure 26. Influence de la vitesse de la transcription sur l'épissage.** Lorsque l'ARN Pol II est rapide, le site d'épissage faible d'un exon alternatif, le splicéosome ne se forme pas au niveau de ce site et l'exon est exclu. A l'inverse si la transcription est lente, le site est reconnu et l'exon est inclus. Adapté de **486**.

co-régulateurs des hormones stéroïdiennes peuvent ainsi influencer l'épissage d'une manière dépendante du promoteur<sup>483</sup>;

- **par la vitesse de transcription.** Un mutant lent de l'ARN Pol II peut modifier l'épissage<sup>484-485</sup>. Un exemple bien décrit d'AS modifié par la vitesse de transcription est celui de EDI<sup>486</sup>. Lorsqu'un exon avec un site d'épissage faible est disposé en amont d'un exon possédant un site d'épissage fort, une transcription lente laissera au splicéosome le temps d'être recruté au niveau du site faible et l'exon sera inclus. Par contre, en cas de transcription rapide, le splicéosome se formera au site faible et l'exon sera exclu (Figure 26).

Le couplage avec la transcription est bidirectionnel puisqu'il existe également des facteurs d'épissage qui peuvent directement influencer la transcription. SRSF2 et SAM68, par exemple, favorisent l'élongation la transcription<sup>460, 488-489</sup>.

### 2.3.5. EXISTE-T-IL UN *SPLICING CODE* ?

L'épissage est complexe, stochastique, très régulé et dépendant du contexte<sup>490</sup>. Les avancées techniques récentes permettent de multiplier les analyses à grande échelle, visant à mieux comprendre les mécanismes guidant le choix des exons retenus dans l'ARN messager mature<sup>491-492</sup>. De multiples études se sont concentrées sur les motifs reconnus par les protéines liant l'ARN et leur localisation<sup>493</sup>. Chez la souris, 65 à 90% des AS peuvent être correctement prédits grâce aux motifs de liaison des facteurs d'épissage<sup>204</sup>. Les changements d'épissage en fonction des tissus et du stade de développement ont également été étudiés<sup>494-496</sup>.

Il n'existe toutefois pas encore un programme de prédiction parfait.

Les raisons en sont multiples<sup>493,497-498</sup>:

- équilibre dynamique entre facteurs favorisant ou inhibant l'épissage;
- séquences Cis régulatrices situées à distances variables des exons concernés;
- redondances fonctionnelles entre plusieurs facteurs;
- expressions tissulaires variables des facteurs d'épissage;
- existence d'interaction et de complexes regroupant de nombreuses molécules.

De plus, ces modèles ne prennent pas en compte le couplage de l'épissage avec d'autres mécanismes cellulaires telle que la transcription<sup>490-499</sup>.

### 3. ÉPISSAGE DANS LE CANCER

En raison de son rôle dans de nombreux processus cellulaires, il n'est donc pas étonnant que des altérations d'AS soient en relation étroite avec le cancer. En effet, des variants aberrants d'épissage sont fréquemment trouvés dans les cellules transformées<sup>500-501</sup> et la plupart des gènes impliqués dans la cancérisation sont affectés par l'AS<sup>502</sup>.

Des analyses à large échelle ont montré que des milliers de variants d'épissage seraient spécifiques au cancer<sup>503-507</sup>. Les cellules cancéreuses présentent une extrême hétérogénéité qui se reflète au niveau de la diversité de leurs variants d'épissage<sup>510</sup>. Les transcrits spécifiques des cancers possèdent souvent des codons stop prématurés<sup>508</sup> résultant notamment de la rétention de séquences décrites comme des introns. Les conséquences fonctionnelles de ces inclusions demeurent le plus souvent inconnues<sup>509</sup>.

L'ampleur des modifications d'épissage varie en fonction du type de cancer. Celles-ci sont ainsi plus nombreuses dans les cancers du sein et plus faibles dans les cancers du poumon<sup>509</sup>. De plus, certaines combinaisons de variants d'épissage sont caractéristiques d'un type de cancer. Par exemple, les modifications d'épissage retrouvées dans les cancers hématopoïétiques sont très différentes de celles des autres cancers. Il est d'ailleurs possible de différencier des types<sup>511</sup>, voire des sous-types<sup>512</sup> de cancers en fonction de leurs modifications d'épissage.

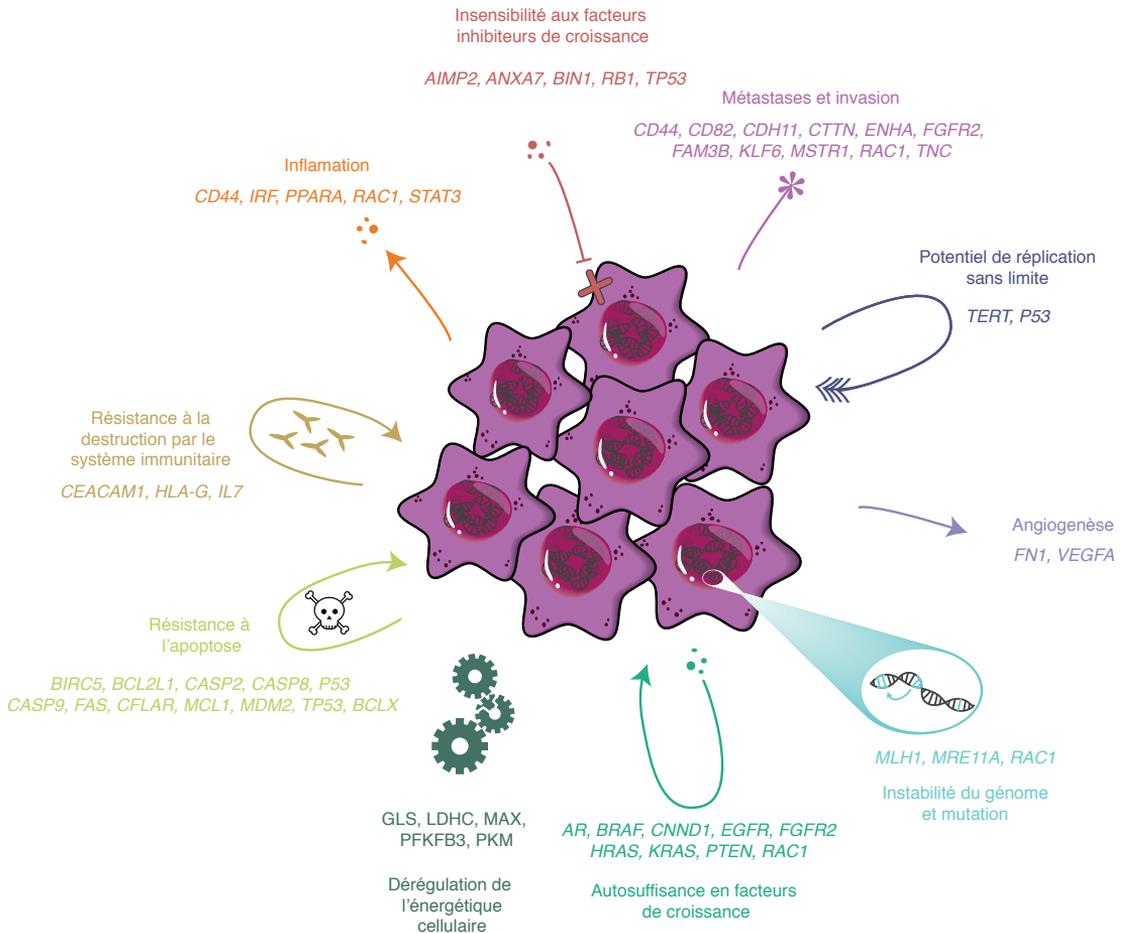
Hanahan et Weinberg ont décrit les 10 caractéristiques des cellules cancéreuses. Des modifications d'épissage sont retrouvées dans des transcrits appartenant à chacune d'entre-elles<sup>513-514</sup> (Figure 27). Il a même été suggéré que l'épissage aberrant serait une autre caractéristique des cancers<sup>199,515</sup>.

Quelques exemples marquants de variants d'épissage pouvant avoir un rôle dans le cancer sont repris ci-dessous:

- *VEGFA*: une forme favorisant l'angiogénèse est exprimée dans les cellules cancéreuses<sup>502</sup>;
- *BCLX*: sa forme anti-apoptotique protège les cellules cancéreuses contre la mort<sup>516-517</sup>;
- *CD44*: deux variants favorisant les métastases sont exprimés dans les cancers<sup>501</sup>. La faible expression du CD44v6 (qui influence le cycle cellulaire par l'intermédiaire de la voie RAS/MAPK<sup>343</sup>) est associée à une meilleure chance de survie pour le patient<sup>518</sup>;
- *P53*: on retrouve dans les cellules cancéreuses plusieurs isoformes anti-apoptotiques et pro-prolifération de p53<sup>519</sup>;
- *MDM2*: ses variants aberrants d'épissage ont un rôle anti-apoptotique et sont liés à

un mauvais pronostic pour les patients atteints du cancer du sein<sup>520</sup>;

- *BRCA1*: l'exclusion de son exon 18 prédispose au cancer du sein et des ovaires<sup>521</sup>.



**Figure 27. Variants d'épissage et le cancer.** Des transcrits codants pour des protéines impliquées dans au moins une des 10 caractéristiques des cellules cancéreuses<sup>4</sup> subissent des variations d'épissage en cours de cancérisation. Figure adaptée de **514**.

## 3.1. ALTÉRATIONS CONNUES DE L'ÉPISSAGE DANS LE CANCER

### 3.1.1. MUTATIONS DES FACTEURS D'ÉPISSAGE

Les facteurs d'épissage sont fréquemment mutés dans différents types de cancers<sup>522-524</sup>. Ces mutations peuvent être des mutations ponctuelles, des translocations, des inversions et des fusions. Ils sont considérés comme des oncogènes pilotes<sup>525-526</sup>. Seul 2% des facteurs d'épissage ne sont mutés dans aucun type de cancer<sup>514</sup>.

Un type de mutation pouvant mener au cancer est la fusion entre des facteurs d'épissage et des facteurs de transcription. Un exemple connu est la fusion du facteur d'épissage EWS dans le sarcome d'Ewing.

Voici quelques exemples de facteurs d'épissage mutés dans les cancers:

- SF3B1 est muté dans 10 à 15% des leucémies lymphoïdes chroniques<sup>527-528</sup> mais il est également fréquemment muté dans d'autres types de cancers. Sa mutation est liée à un mauvais pronostic pour le patient<sup>527</sup>. SF3B1 muté permet l'utilisation de nouveaux sites d'épissage en 3'<sup>529</sup>, notamment au niveau de transcrits impliqués dans la DDR et la réparation des dommages à l'ADN<sup>530</sup>;
- Des mutations de U2AF1 ont été décrites dans les cancers du poumon et dans les leucémies<sup>531</sup>. Ces mutations modifient l'épissage de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et dans le contrôle de l'épissage<sup>532</sup> mais aussi dans la DDR et l'apoptose<sup>533</sup>;
- Dans le syndrome myélodysplasique, qui peut conduire aux leucémies, les mutations de SF3B1, U2AF1, SRSF2, ZRSR2 ont été détectées<sup>534</sup>. Une mutation fréquemment retrouvée dans SRSF2 (P95H) l'empêche de se fixer à certaines de ses cibles<sup>535-537</sup> impliquées notamment dans la régulation des télomères, la réparation de l'ADN et le remodelage de la chromatine<sup>538</sup>.

Les isoformes des facteurs d'épissage, peu ou moins fonctionnelles, peuvent augmenter le nombre de boucles R ce qui peut conduire à une plus grande instabilité du génome<sup>66</sup>.

### 3.1.2. MODIFICATIONS D'EXPRESSION ET POST-TRADUCTIONNELLES DE FACTEURS D'ÉPISSAGE

---

SRSF1 est le premier facteur d'épissage dont il a été démontré que l'expression est augmentée dans les cancers et dont la surexpression artificielle initie le processus de cancérisation<sup>539</sup>. On sait maintenant que la modification d'expression des facteurs d'épissage dans les cancers est générale. La tendance est plutôt à la surexpression de certains facteurs, accompagnée d'une réduction de la variabilité de facteurs d'épissage présents<sup>500</sup>. Comme dans le cas des variants d'épissage, les variations d'expression des facteurs d'épissage sont spécifiques du type de cancer et les plus grandes variations ont été mises en évidence dans le cancer du sein. Il existe donc une corrélation entre la dérégulation des facteurs d'épissage et le niveau de variants aberrants exprimés dans les cancers<sup>514</sup>. Certains facteurs d'épissage sont surexprimés dans un cancer et réprimés dans un autre mais quelques-uns sont surexprimés dans pratiquement tous les types de cancer. Par exemple, l'augmentation de l'expression de SAM68, SNRPB et DDX39A est corrélée à un mauvais pronostic pour le patient<sup>500,540-544</sup>. D'autres facteurs d'épissage, tels

que SRSF6, PRPF6, hnRNPH sont considérés comme oncogéniques<sup>545-548</sup>.

En outre, une augmentation de l'expression de SRPK1 (qui phosphoryle les facteurs d'épissage) a été observée dans les cancers du sein<sup>549</sup>. Elle peut notamment conduire à une modification de l'épissage de *VEGFA*<sup>550</sup>.

La surexpression de certains facteurs d'épissage comme SRSF1 et SPF45 est liée à la résistance à la chimiothérapie<sup>551-552</sup>. SPF45 y parvient notamment en modifiant l'épissage de *FAS*<sup>553</sup>.

A l'inverse, CELF2 et SF1 sont réprimés dans la moitié des types de cancers étudiés<sup>500</sup> et RBM4 agit comme gène suppresseur de tumeur<sup>554</sup>. La répression de SF3A1 induit des modifications d'épissage des transcrits jouant un rôle dans l'apoptose et le cycle cellulaire<sup>534</sup>. Il semble que la diminution de l'expression des facteurs d'épissage soit corrélée aux modifications d'épissage observées dans les cellules cancéreuses<sup>555</sup>.

Des modifications de localisation de facteurs d'épissage comme RBFOX2, les protéines SR et les hnRNPs peuvent survenir dans les cancers<sup>556-558</sup>. Celles-ci pourraient être dues à leur phosphorylation<sup>559</sup> et mèneraient à des modifications d'épissage sur des variants contrôlant l'apoptose, la mobilité, le cycle cellulaire ou l'invasion. Par exemple, Sam68 est hyperphosphorylée chez les patients atteints de cancers, ce qui peut, d'une part, modifier sa localisation<sup>560-561</sup> et, d'autre part, moduler le choix du site d'épissage en 3' par l'intermédiaire de U2AF2<sup>562</sup>. Sam68 modifie notamment l'épissage de *CD44*<sup>563</sup> et de *BCLX*<sup>564</sup>. De plus, SAM68 joue un rôle dans la migration cellulaire via des variations d'épissage<sup>565-566</sup>.

### 3.1.3. MUTATIONS DANS LES SÉQUENCES RÉGULATRICES

Les gènes ayant un rôle dans le cancer sont particulièrement sensibles aux mutations de leurs sites d'épissage<sup>567</sup>. Ce serait le cas pour 13% d'entre eux<sup>568</sup>. De nombreuses mutations dans les sites d'épissage ont été identifiées dans les cancers du sein<sup>569</sup>. Par exemple, la mutation du site d'épissage de *BRCA1* reconnu par SRSF1 conduit à l'exclusion de l'exon 18<sup>521</sup>.

## 3.2. MODIFICATIONS DE L'AS EN COURS DE CANCÉRISATION

L'épissage des cellules cancéreuses dépend du type cellulaire, de l'étape de développement ou du grade de la maladie<sup>500, 570-571</sup>. La progression du cancer mammaire est liée aux modifications de l'expression de certaines protéines SR ayant pour

conséquences les modifications d'épissage de *CD44*<sup>556</sup>. De plus, l'expression de différentes isoformes de *CXCL12* (qui appartient à une voie qui induit la croissance des tumeurs et les métastases) est corrélée avec le stade de la tumeur<sup>572</sup>.

### 3.2.1. VOIES SIGNALÉTIQUES

---

L'épissage peut influencer les voies signalétiques liées à la cancérisation. Par exemple, hnRNPA2 modifie l'épissage de *A-RAF* ce qui favorise la transformation des cellules et la prolifération par l'activation constitutive de la voie RAS/MAPK<sup>573</sup>. De la même manière, l'exclusion de l'exon 4 d'*EGFR* le rend constitutivement actif et conduit à la prolifération cellulaire. Ce variant est détecté dans de nombreux cancers<sup>574</sup>.

### 3.2.2. MÉTABOLISME

---

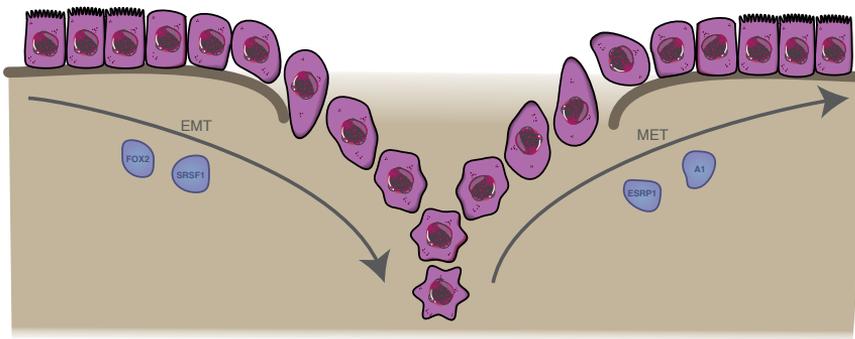
Les cellules cancéreuses sont capables de modifier leur métabolisme en induisant la glycolyse aérobie (effet Warburg). L'épissage est un facteur clé dans cette modification, notamment par l'intermédiaire de la modification de l'épissage des pyruvates kinases. Le variant *PKM2*, qui induit la glycolyse aérobie, est ré-exprimé dans les cellules cancéreuses<sup>575-577</sup> d'une manière dépendante des hnRNPs A1, A2 et I<sup>578-579</sup>.

### 3.2.3. MICROENVIRONNEMENT TUMORAL ET MÉTASTASES

---

Le microenvironnement tumoral, qui joue un rôle crucial dans la progression des tumeurs, pourrait impliquer des changements de hnRNPs<sup>580</sup>. Une des caractéristiques du microenvironnement est l'hypoxie, connue pour influencer l'AS<sup>581</sup> et conduire à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Ce processus est nécessaire à la formation de métastases. L'EMT est contrôlée par l'épissage<sup>582</sup>. Un facteur d'épissage important pour l'EMT est RBFOX2. Sa déplétion diminue le potentiel invasif des cellules mais n'empêche pas les modifications morphologiques<sup>583-584</sup>. Inversement, au cours de l'EMT, ESRP1 (un autre facteur d'épissage) est réprimé alors que sa surexpression cause la transition mésenchymato-épithélio (MET) et diminue l'invasion cellulaire<sup>585</sup>. D'autres facteurs d'épissage importants pour ces transitions sont SRSF1 et hnRNPA1. Ils ont un effet antagoniste: SRSF1 induit l'EMT alors que hnRNPA1 favorise la transition inverse (MET)<sup>586-587</sup> (Figure 28).

Les facteurs d'épissage RBM47, hnRNP47 et Lin 28a sont importants pour l'induction de métastases<sup>588-590</sup>.



**Figure 28. L'EMT et la MET sont contrôlées par l'épissage.** Des facteurs comme RBFOX2 et SRSF1 sont responsables de l'induction de l'EMT. ESRP1 et hnRNPA1 sont quant à eux impliqués dans la MET.

### 3.2.4. MUTATIONS ET INSTABILITÉ GÉNOMIQUE

L'accumulation de dommages à l'ADN et l'instabilité génomique participent au processus de cancérisation. Des études à large échelle ont identifié un grand nombre de facteurs d'épissage impliqués dans la maintenance de l'intégrité du génome et dans la DDR<sup>591-593</sup>. Les facteurs d'épissage y jouent un rôle en modifiant le paysage protéomique pendant la DDR, en protégeant contre l'instabilité génétique et en participant aux mécanismes de réparations<sup>594</sup>.

#### De nombreux acteurs de la DDR et de la réparation subissent de l'AS

Les conséquences de cet épissage ne sont pas toujours connues, mais certains variants ont des fonctions opposées. La production de variants peut sensibiliser les cellules aux stress génotoxiques. Par exemple, le variant de BRCA1 sensibilise les cellules et altère les mécanismes de réparation<sup>595</sup>; l'épissage de *CHK1* est régulé par les facteurs TRA2 qui, s'ils sont affectés, augmentent le niveau de H2AX phosphorylé et réduisent la viabilité des cellules<sup>596</sup>; une modification de l'épissage de *B-RAF* peut conduire à la résistance à la chimiothérapie<sup>597</sup>.

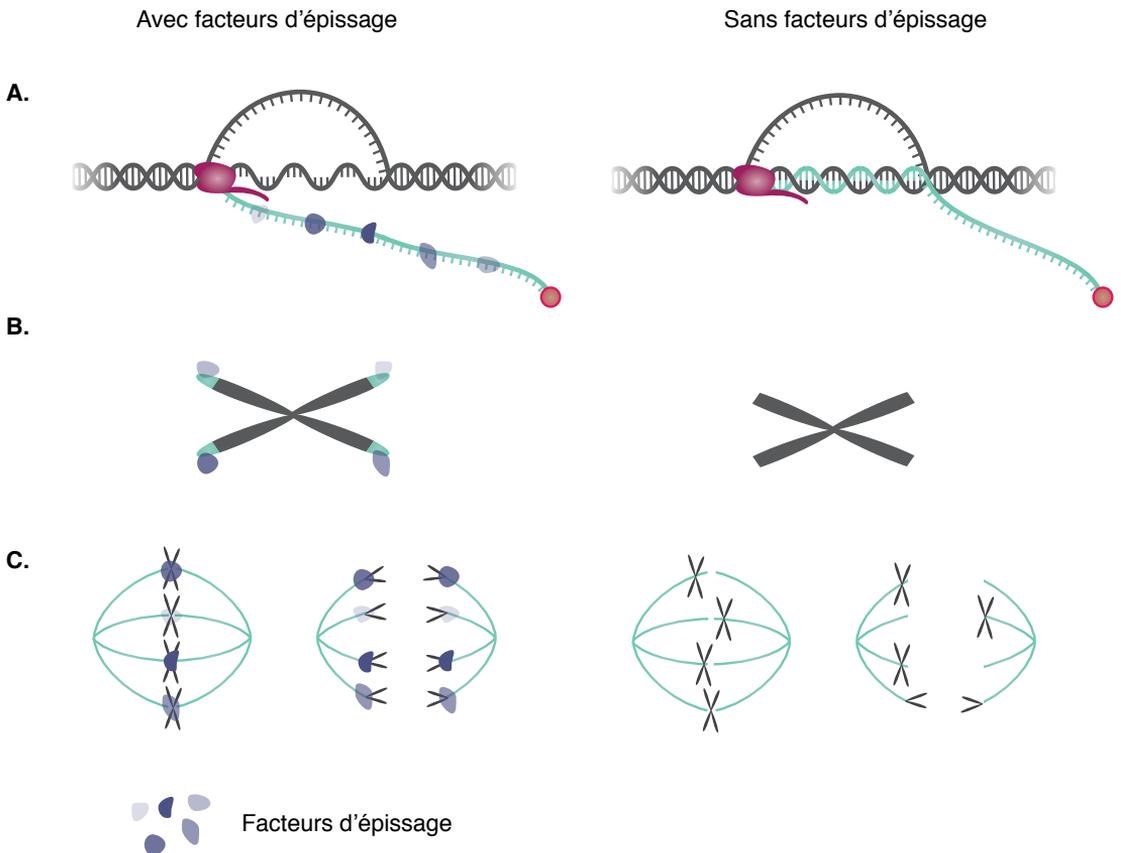
#### Les facteurs d'épissage protègent contre les mutations

La déplétion de nombreux facteurs d'épissage conduit à une augmentation du nombre de dommages à l'ADN<sup>592</sup>. Ils ont différents rôles pour empêcher les mutations<sup>598</sup> (Figure 29):

- protecteurs contre les boucles R. Quand les RBPs (SRSF1 par exemple) ne sont pas liées à l'ARN en cours de synthèse, la formation des boucles R augmente<sup>64,599</sup>. SRSF1, SRSF2 et SRSFF3, entre autres, sont capables de diminuer la formation de celles-ci<sup>56,600</sup> (Figure 29 A);
- protecteurs des télomères. L'intégrité des télomères est assurée par les télomérases.

Des facteurs d'épissage sont nécessaires à la synthèse et à l'intégrité des télomères via leurs interactions avec ceux-ci et/ou en modulant l'activité des télomérases<sup>598</sup> (Figure 29 B);

- gardiens de l'euploïdie. Des facteurs d'épissage sont impliqués dans la régulation de la ségrégation des chromosomes ainsi que dans la cohésion des chromatides sœurs<sup>598</sup> (Figure 29 C).



**Figure 29. Les facteurs d'épissage protègent les cellules contre les mutations.** A: L'absence de facteurs d'épissage conduit à la formation de boucles R qui peuvent induire des dommages à l'ADN. B: Les facteurs d'épissage permettent une synthèse correcte de télomères. C: Les facteurs d'épissage sont importants pour le positionnement correct des chromosomes lors de la mitose et empêchent l'aneuploïdie. Figure adaptée de <sup>598</sup>

### Les facteurs d'épissage participent à la DDRc et à la réparation

La transcription est diminuée au niveau de l'ADN lésé<sup>601</sup>, ce qui conduit à une diminution de la présence de U2, U5 et U6<sup>602</sup>. À l'inverse, de nombreux facteurs d'épissage sont recrutés au niveau des dommages, notamment par la présence de poly-ADP-Riboses<sup>593, 603-609</sup> qui modifie leur fonction dans l'épissage<sup>610-611</sup>. BCLAF1 (qui interagit avec BRCA1) recrute SF3B1, U2AF et PRPF8 au niveau de la chromatine<sup>612</sup>.

Certains facteurs d'épissage sont impliqués dans l'induction de la DDR<sup>606,613</sup> et dans

les mécanismes de réparation<sup>593, 614-624</sup>, notamment dans le recrutement de la machinerie de réparation<sup>619</sup> et alors que d'autres sensibilisent les cellules aux agents génotoxiques<sup>591, 593, 596, 606, 617, 621, 625-629</sup>, en participant au couplage entre la réparation et les modifications d'épissage<sup>630</sup>. Par exemple, certains des facteurs d'épissage recrutés au niveau des cassures sont connus pour modifier l'épissage et/ou l'expression de gènes participant à la DDRcet à la réparation (hnRNP C, RBMX et PSF)<sup>594</sup>.

### 3.3. EFFETS DES TRAITEMENTS ANTICANCÉREUX SUR L'AS

**S**euls les agents causants des dommages à l'ADN seront abordés ici. Au vu du rôle des facteurs d'épissage dans la DDRcet la réparation des lésions, il n'est pas étonnant qu'un stress génotoxique ait un effet sur l'AS. Plus particulièrement, les facteurs d'épissage en sont les cibles et subissent des modifications post-traductionnelles, de localisation, de stabilité et d'activité<sup>630</sup>.

#### 3.3.1. CONSÉQUENCES DE L'INDUCTION D'UN STRESS GÉNOTOXIQUE SUR L'AS

##### 3.3.1.1. *TYPES D'AGENTS UTILISÉS POUR INDUIRE D'AS*

Beaucoup d'études ont utilisé des agents génotoxiques pour induire l'épissage alternatif. Elles ont souvent révélé une vaste modification du profil d'épissage. Si certaines études ont utilisé des techniques permettant d'étudier l'impact à grande échelle de l'épissage alternatif (voir paragraphe 3.3.1.2, page 55), d'autres se sont concentrées sur certains transcrits en particulier. Dans de nombreux cas l'impact fonctionnel n'a pas été étudié. Cependant, les transcrits modifiés ont, la plupart du temps, un rôle dans la réparation des dommages, le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose<sup>630</sup>.

Les agents qui ont le plus été étudiés sont la CPT, les inhibiteurs de Topo 2 (DOX et Epirubicines), le cisplatine, les radiations ionisantes et ultra-violettes. La [table 1](#) classe les différents agents utilisés pour induire des modifications d'épissage ainsi que les lignées cellulaires dans lesquelles ils ont été utilisés.

Types d'agents (effet principal)	Agents	Lignées étudiées
Liaisons inter- et intra-chaine	MC	PC3, U2OS, HTC116, U2OS, MCF-7, OVCAR3, SKOV3
	Carboplatine	RTC
	Chlorambucil	EcR293
	Cis	SH-SY5Y, Hep3B, EcR293, MCF-7, HeLa S3, PC3, PA-1, SKOV-3, HT1080, H358, AT5BIVA, MO59J, HeLa S3, BT549, HDF1, MDA-MB-231, MG-63, MSU, RD, U2OS, H1299, Ishikawa, HCT116, IMR90
	Cyclophosphamide	SKOV3, H358
	Dacarbazine	EcR293
	Oxaliplatine	EcR293, MCF-7, HeLa S3, PC3, PA-1, SKOV-3
Incorporations d'analogues de Y	5-Aza dC	MCF7
	Capecitabine	MCF7, HeLa S3, PA-1
	Cytarabine	PC3
	Fluorouracile	EcR293
	Gemcitabine	A549, EcR293, MCF-7, PA-1, SKOV3, MiaPaCa2, PT45P1
	MTX	EcR293, MCF-7, HeLa S3
Cassures simple ou double-brin, bases oxydées	Radiations ionisantes	MCF-7, SH-SY5Y, LCL lymphoblastoid, fibroblastes primaires, PBMCs, NF AG1519
Cassures simple ou double-brin	Paclitaxel	U937
	Bleomycine	HLE, HLF
	L-mimosine	MCF7
Dimères de Y	UV	HeLa, HT1080, peau humaine, H1299, MCF-7, MRC-5V1, HaCat, MDA-MB-231, Hep3B
Inhibiteurs de Topos	CPT	HCT116, HeLa, U-937, MCF7, A431, Jurkat, HaCat, MDA-MB-231,
	Diflomotecan	U-937
	DOX	EU-3, U-937, HCT116, MDA-MB-231, MCF7, NIH3T3, EB-1, RKO, T47D
	Epirubicin	EcR293, MCF-7, HeLa S3, PC3, HeLa, HL-60, U937, U2OS
	NB-506 (dérivé d'Indolocarbazole)	P388
	Irinotecan	U-937
	Mitoxantrone	U-937
	TAS-103	U-937
	Topotecan	EcR293, PC3
	BN80927	U-937

Types d'agents (effet principal)	Agents	Lignées étudiées
Intercalants	Aclarubicine	Fibroblastes SMA
	Amsacride	U-937
	ACT	EcR293, MCF-7, HeLa S3, PC3, NIH3T3
	Daunorubicine	MCF-7, PC3, PA1
Stress oxydant	Arsenic (III) chloride	BEAS-2B
	Arsenite	AGS
	Cadmium dichloride	RKO, EB-1
	H2O2	Saos2, HCT116
	Paraquat	SH-SY5Y
	Sodium arsenite	HeLa, HCT116

**Table 1.** Agents génotoxiques utilisés pour induire l'AS et lignées cellulaires dans lesquelles ils ont été utilisés. Table adaptée de 630.

Ces nombreuses études montrent que l'induction de l'épissage alternatif par un stress génotoxique est un phénomène général observé dans de nombreuses lignées et induit via de nombreux agents. Cependant, l'étude approfondie de l'épissage du transcrite *BCL-X* a montré que son épissage peut varier en fonction de l'agent utilisé et de la lignée cellulaire choisie<sup>722</sup>. Il est donc difficile de généraliser l'induction de l'AS en fonction des types de dommages causés, essentiellement à cause du fait que les différentes équipes ont choisi des lignées cellulaires et des événements rapporteurs d'épissage différents.

### 3.3.1.2. ÉTUDES À GRANDE ÉCHELLE

Depuis la fin des années 2000, les avancées techniques ont permis d'étudier les variations d'épissage de centaines de transcrits simultanément. D'abord, des micro-puces permettant de détecter des centaines de variations d'épissages ont été développées. Leur utilisation a permis de montrer que les variations d'épissages suite à un stress génotoxique sont globales et ne se limitent pas à certains transcrits, en voici quelques exemples:

- L'utilisation de CPT sur les cellules HCT116 conduit à 998 variations d'épissage dont 240 inclusions d'exon et 416 exclusions d'exon<sup>682</sup>.
- Lorsque les cellules Jurkat sont traitées à la CPT, ce sont à l'inverse les inclusions qui sont majoritaires avec 419 événements contre 123 événements d'exclusions<sup>631</sup>.
- La CPT a également été utilisée sur les cellules MCF7. Dans ce cas, 354 inclusions d'exons ont été observées<sup>686</sup>.
- L'arsenic inorganique, utilisé sur les cellules HeLa, conduit à 104 événements d'épissage alternatif<sup>632</sup>.
- Les radiations ionisantes ont été utilisées sur des cellules LCL et des fibroblastes

primaires menant à l'apparition de 3515 et 3079 événements d'AS, respectivement<sup>633</sup>.

- Les variations d'épissage suite à un traitement aux UVs ont été étudiées sur les cellules Hep3B. Près de 200 événements d'AS ont été observés dont la majorité (138) sont des inclusions ou des exclusions d'exons<sup>485</sup>.

Plus récemment, l'accessibilité aux techniques de séquence à haut débit a permis et permettra une étude non biaisée des événements d'épissage alternatif. Même si cette technique n'a été utilisée que deux fois dans le cadre des dommages à l'ADN, elle devrait l'être de plus en plus à l'avenir. Une de ces études sera décrite dans la partie Résultat. Dans l'autre, des fibroblastes ont été traités par les UV. Au total, 546 événements d'épissages ont été observés dont 144 inclusions et 321 exclusions d'exons<sup>602</sup>.

Ces études, en plus de montrer que l'épissage alternatif est un phénomène global d'adaptation à un stress, indiquent également que l'épissage varie en fonction de la lignée et de la drogue utilisée pour induire l'épissage.

### 3.3.1.3. EXEMPLES DE TRANSCRITS MODIFIÉS

Comme discuté précédemment, les transcrits ayant un rôle dans l'apoptose, la réparation des dommages à l'ADN, le cycle cellulaire et le métabolisme de l'ARN sont préférentiellement modifiés suite à un stress génotoxique. La [Table 2](#), reprend certains d'entre eux, ainsi que les conséquences cellulaires de leur modifications d'épissage.

Nous avons décidé de décrire ici certains variants, induits par un stress génotoxique, qui peuvent influencer l'induction, la progression ou le traitement d'un cancer:

Evènement d'AS	Agents génotoxiques utilisés	Conséquences
<i>MDM2</i> - exclusion des exons 4-11	UV, IR, Cis	Stabilisation de p53
<i>MDM2</i> - exclusion de différents exons	CPT, DOX, Cis	Stabilisation de p53
<i>MDM2</i> - rétention de l'intron 10	DOX, ACT	Variant tronqué inactif. Stabilisation de p53
<i>MDM4</i> - exclusion de différents exons	UV	Stabilisation de p53
<i>FASR</i> - exclusion de l'exon 6	MC	Augmentation de la forme soluble de Fas
<i>CASP2</i> - inclusion de l'exon 9	ETO, CPT, DOX, Mitoxantrone	Augmentation de la forme anti-apoptotique
<i>CASP8</i> - inclusion de l'exon 8	Cis	Diminution de la forme anti-apoptotique

Evènement d'AS	Agents génotoxiques utilisés	Conséquences
<i>CASP9</i> - inclusion des exons 3 à 6	UV, cyclophosphamide, de nombreux autres agents	Augmentation de la forme pro-apoptotique
<i>BCLX</i> - site d'épissage alternatif en 5' de l'exon 2	UV, CIS, Oxaliplatine, cyclophosphamides	Augmentation de la forme pro-apoptotique
<i>PIG3</i> - exclusion de l'exon 4	UV, CIS	Augmentation de sa dégradation
<i>SMAC/DIABLO</i> - exclusion de l'exon 4	UV, CIS	Augmentation de la forme pro-apoptotique
<i>MCL-1</i> - Augmentation de la forme L	IR	Augmentation de la forme anti-apoptotique
<i>DHX9</i> - Inclusion de l'exon 6	UV	Dégradation du variant par NMD

**Table 2.** Liste non exhaustive d'événements d'AS induits par un stress génotoxique et leurs conséquences cellulaires. Table adaptée de 634.

- la MC, le mitoxantone et le NB506 (entre autres) induisent une isoforme alternative de *CD44* qui est impliquée dans la migration des cellules cancéreuses et la formation de métastases<sup>544, 635, 704, 721</sup>;
- l'équilibre entre les variants d'épissage pro- et anti-apoptotiques des membres de la famille des caspases et de *BCL2* est modifié en réponse aux agents génotoxiques. Le cisplatine stimule l'apparition d'un variant pro-apoptotique de la caspase 8 via la régulation du site d'épissage alternatif en 5' de l'exon 8<sup>301, 641</sup>.
- l'équilibre pro/anti-apoptotique peut être modifié par le cis, l'oxaliplatine et le cyclophosphamide notamment en favorisant la synthèse de l'isoforme pro-apoptotique *BCL-Xs* via la régulation du site d'épissage alternatif en 5' de l'exon 2<sup>485, 641, 685</sup>;
- des inhibiteurs de Topo I (CPT) et II (DOX) induisent l'inclusion de l'exon 9 du transcrit de la caspase 2, ce qui se traduit par une augmentation de la production du variant anti-apoptotique<sup>636, 637</sup>;
- l'exclusion de l'exon 6 du transcrit du récepteur Fas par la MC favorise la synthèse d'une protéine sécrétée qui a un effet antagoniste du variant classique. Il empêche la transduction du signal apoptotique<sup>637</sup>;
- la régulation de l'épissage du transcrit de *MDM2* par des agents génotoxiques a été beaucoup étudiée. *MDM2* est une phosphoprotéine impliquée dans la régulation négative de *p53*. Comme le promoteur du gène de *MDM2* est stimulé par *p53*, il s'établit une boucle d'autorégulation maintenant un niveau bas de *p53* dans les cellules en condition basale. Divers agents génotoxiques, dont le cisplatine, la camptothécine, la doxorubicine et les UV, induisent l'exclusion de plusieurs exons du pré-ARNm de *MDM2*. La production de ces variants plus courts (dont le variant

majoritaire *MDM2-alt1*<sup>678</sup>) diminue la proportion du variant classique de *MDM2-FL*. *MDM2-alt1* ne possède pas le domaine de liaison à p53 et n'a donc pas la possibilité d'induire sa dégradation, ce qui a pour conséquence l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 d'une manière dépendante de p53;

- un épissage alternatif peut modifier la stabilité du transcrit en y introduisant un codon stop prématuré qui va mener à sa dégradation par NMD. C'est ainsi que la camptothécine, en favorisant l'inclusion de l'exon 5 dans le transcrit du proto-oncogène H-ras cause l'apparition d'un codon stop prématuré et la dégradation du transcrit, réprimant de cette manière l'expression de la protéine pro-mitotique (P21H-RAS)<sup>716</sup>.

### 3.3.2. MÉCANISMES PAR LESQUELS LES AGENTS GÉNOTOXIQUES MODIFIENT L'AS

---

#### 3.3.2.1. MODIFICATIONS DE L'EXPRESSION DES FACTEURS D'ÉPISSAGE

Si les dommages à l'ADN induisent une répression globale de la transcription, certains facteurs d'épissage, dont les hnRNPs et les protéines SR, sont surexprimés après un traitement génotoxique<sup>638-640</sup>. Par exemple, SRSF2 est surexprimé après un traitement au Cis<sup>641</sup>. A l'inverse, la bléomycine diminue l'expression de SF3B1<sup>642</sup>. La diminution de l'expression des facteurs d'épissage suite à un stress génotoxique peut être due à la production de variants d'épissage subissant la NDM<sup>643</sup>.

#### 3.3.2.2. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES FACTEURS D'ÉPISSAGE

- **PARylation.** De nombreux facteurs d'épissage sont PARylés après un traitement génotoxique<sup>644</sup>.
- **Acétylation.** L'étoposide modifie l'acétylation de nombreux facteurs d'épissage<sup>645</sup>. Le Cis, quant à lui, est capable de diminuer l'acétylation de SRSF2<sup>301</sup>.
- **Ubiquitination.** hnRNP K est un substrat de MDM2 et est dé-ubiquitiné suite aux dommages à l'ADN<sup>646</sup>.
- **Phosphorylation.** La phosphorylation de nombreux facteurs d'épissage est modifiée lors de stress génotoxiques<sup>645,647-650</sup>. Certains sont des substrats d'ATM et ATR<sup>648</sup> et d'autres de CHK1<sup>651</sup>. De plus, la phosphorylation des SRPK est également modifiée par un stress génotoxique<sup>301, 316</sup>.

### 3.3.2.3. MODIFICATION DE LA VITESSE DE TRANSCRIPTION

Le ralentissement de la transcription, liée notamment à la modification de phosphorylation de la ARN Pol II par le stress génotoxique, diminue la vitesse de transcription et affecte l'épissage<sup>345,485</sup>.

### 3.3.2.4. MODIFICATION DE LOCALISATION DES FACTEURS D'ÉPISSAGE

Outre leur recrutement au niveau des dommages, de nombreux facteurs d'épissage sont délocalisés après un stress génotoxique, ce qui a pour conséquence de modifier l'épissage de leurs cibles (Figure 30):

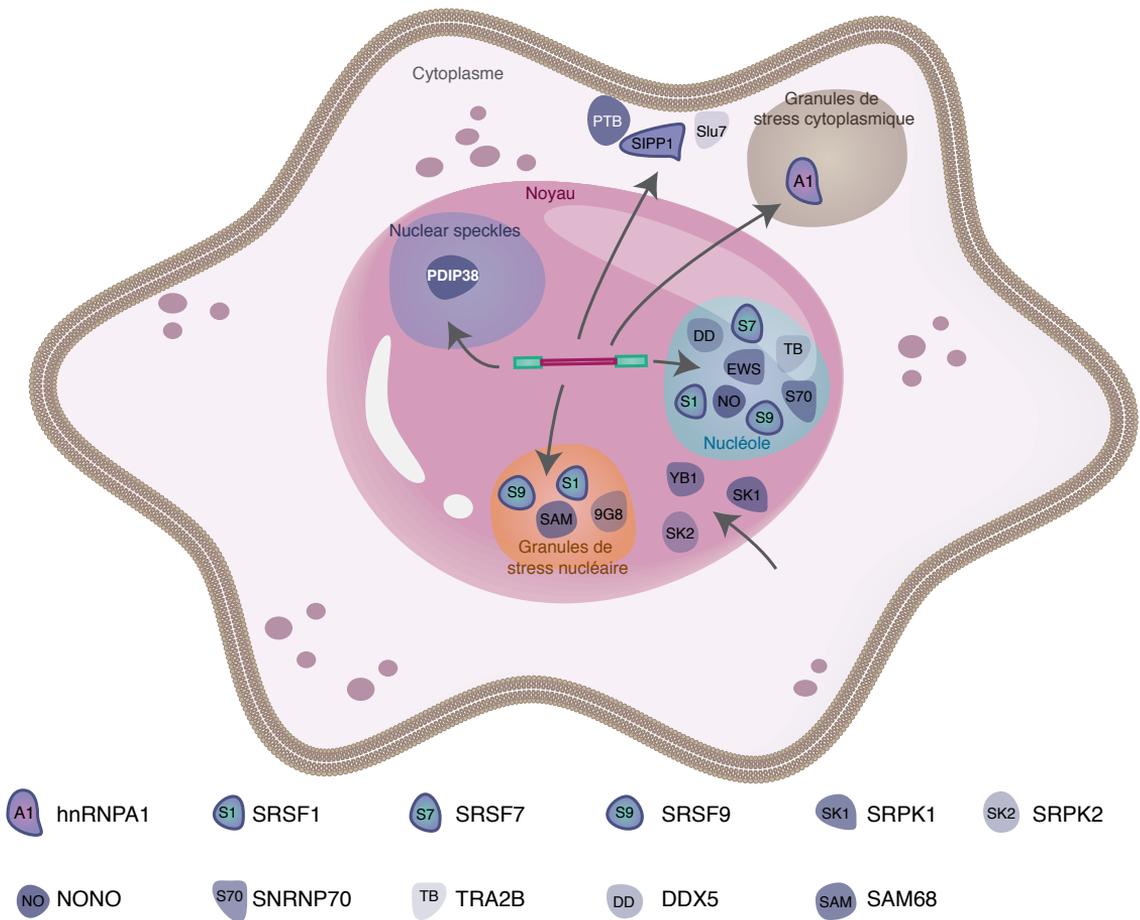
- **dans le cytoplasme.** PTB<sup>652</sup>, SIPP1<sup>653</sup>, Slu7<sup>654</sup> et hnRNPA1<sup>313, 655</sup> se localisent dans le cytoplasme suite à un stress génotoxique. HnRNPA1 se retrouve plus particulièrement dans les granules de stress cytoplasmiques où il pourrait jouer un rôle dans la traduction et la stabilité des ARNs messagers<sup>656-657</sup>;
- **dans le nucléole.** EWS<sup>389</sup>, DDX5<sup>658</sup>, SRSF1, SRSF9, SRSF7, SNRNP70, TRA2B et NONO<sup>399</sup> s'y localisent après l'induction de dommages à l'ADN;
- **dans le noyau.** après un stress génotoxique, YB1<sup>594</sup> se localise dans le noyau. Un traitement au Cis conduit à la translocation nucléaire de SRPK1 et SRPK2. Ceux-ci vont alors phosphoryler SRSF2<sup>301</sup>;
- **dans les granules de stress nucléaires.** SAM68<sup>659</sup>, SRSF1, 9G8, SRSF9<sup>660</sup> s'y localisent;
- **dans les « nuclear speckles ».** PDIP38 s'y localise après une induction par les UV<sup>661</sup>.

## 3.4. POSSIBILITÉS D'AMÉLIORATION DES TRAITEMENTS ANTICAN-CÉREUX PAR MODULATION DE L'ÉPISSAGE

Les variations de l'épissage pourraient être utilisées comme biomarqueurs des cancers mais également comme cible pour de nouveaux traitements anticancéreux<sup>571,662-663</sup>.

La détection de variants d'épissage spécifiques pourrait servir pour le diagnostic des tumeurs<sup>664</sup>, des exemples sont repris ci-dessous:

- la présence du variant AR-V7 dans le sang de patients atteints du cancer de la prostate est corrélée avec une résistance aux traitements par les androgènes<sup>665</sup>;
- des variants d'épissage de CD44 sont retrouvés dans le sang de patients cancéreux



**Figure 30. Modifications de localisation des facteurs d'épissage après un stress génotoxique.** Les dommages à l'ADN induisent une relocalisation de facteurs d'épissage du noyau vers le cytoplasme (parfois dans les granules de stress cytoplasmiques), les nucléoles, les granules de stress nucléaires ou les « nuclear speckles ». A l'inverse, d'autres facteurs sont délocalisés du cytoplasme vers le noyau.

et pourraient dès lors servir de marqueurs diagnostics<sup>570</sup>;

- certains événements d'épissage spécifiques au cancer sont responsables de la formation de nouveaux antigènes qui pourraient être des cibles de l'immunothérapie<sup>666</sup>.

Les mécanismes d'épissage peuvent également constituer des cibles thérapeutiques. Différentes approches sont possibles (Figure 31):

### Oligonucléotides

Il est possible de moduler l'épissage à l'aide d'oligonucléotides qui se fixent au niveau du site d'épissage et empêchent sa reconnaissance par le spliceosome (Figure 31 A). L'un d'entre-eux a été utilisé pour restaurer l'épissage de *BCLX-S* (pro-apoptotique) et ainsi diminuer la taille des tumeurs<sup>516</sup>.

## siRNAs

Il est possible de créer des siRNAs spécifiques d'un variant d'épissage et de conduire ainsi à sa dégradation spécifique (Figure 31 B)

## Anticorps

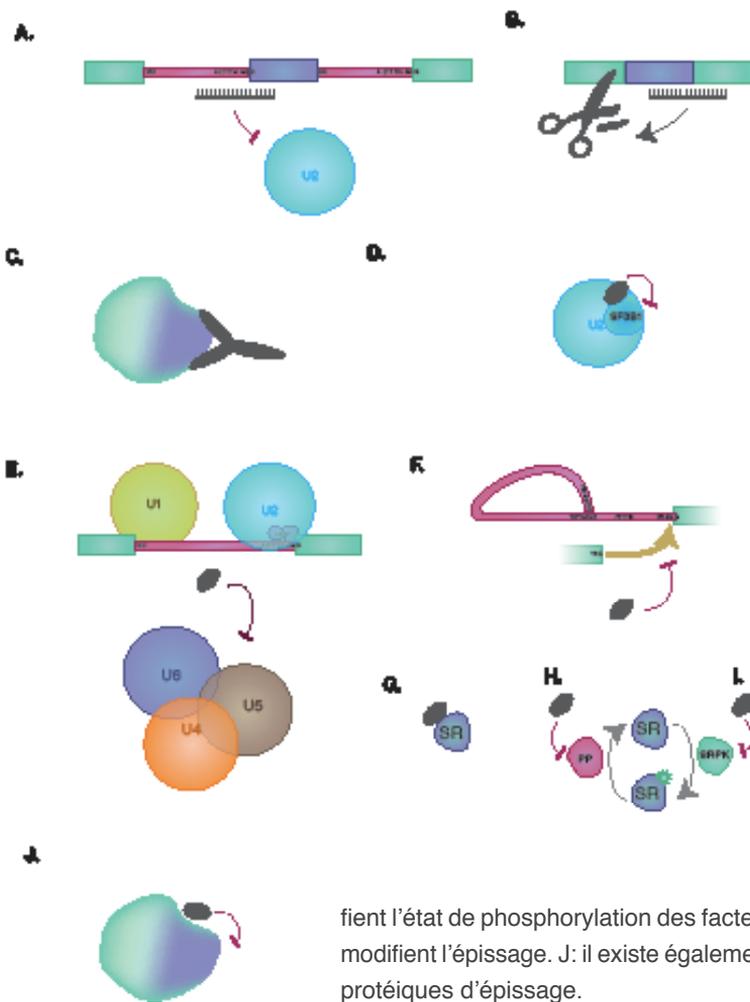
Dans le même ordre d'idée, il serait possible d'utiliser des anticorps spécifiques d'un épitope, présent uniquement sur le produit du variant d'épissage (Figure 31 C). Un tel anticorps ciblant le variant *CD44V6* et est en cours d'essais cliniques<sup>667</sup>.

## Inhibiteurs

Certains sont en cours d'études pour le traitement du cancer ou déjà utilisés dans le traitement d'autres pathologies liées à l'épissage.

- Inhibiteurs de facteurs d'épissage (Figure 31 D). Ils ont un effet sur de nombreuses cibles et pourraient donc causer des effets secondaires importants. Certains composés ayant démontré des propriétés antitumorales sont toutefois en cours de développement (par exemple les GEX1, les pladienolides ou la spliceostatine A). Ils agissent sur les cellules résistant aux chimiothérapies conventionnelles<sup>668-671</sup>. Les inhibiteurs du splicéosome ont un effet plus fort sur les cellules cancéreuses. Cela pourrait être le résultat d'une perméabilité supérieure de cellules cancéreuses ou de besoins spécifiques (qualitatif et quantitatif) en matière d'épissage dans ces cellules. Il est également possible que les inhibiteurs aient une certaine spécificité pour les variants pro-cancer<sup>672</sup>. Les inhibiteurs utilisés actuellement sont des inhibiteurs de SF3B. Ils interagissent avec SF3B1 et SF3B3 mais leur action semble liée à l'inhibition de SF3B1<sup>673</sup>. La splicostatine et les dérivés de pladienomide (E7107) interfèrent avec les changements conformationnels de U2. Ceux-ci sont nécessaires aux interactions ARN-ARN qui permettent la liaison de U2 au site d'épissage en 3'<sup>672</sup>. Des effets sur certains variants ont été étudiés. La production du variant de *BRAF* qui cause la résistance aux traitements chimiothérapeutiques et induit la prolifération des cellules cancéreuses, est diminuée par ces inhibiteurs<sup>597,674</sup>. Ils causent aussi l'inclusion d'un intron dans *VEGF* ce qui diminue son expression par l'intermédiaire du NMD<sup>675-676</sup>.
- D'autres inhibiteurs sont également en cours d'étude<sup>672</sup>:
  - L'isoginkgetin (Figure 31 E) empêche la transition du complexe A au complexe B et entrave l'invasion tumorale;
  - Des dérivés de quinones ont montré des activités anticancéreuses en empêchant les modifications conformationnelles nécessaires à la deuxième réaction de transestérification (Figure 31 F);

- L'indole se lie aux protéines SR et diminue l'expression de variants d'épissage pro-métastatiques (Figure 31 G);
- Inhibiteurs de kinases: un inhibiteur de SRPK1 (SRPIN340) est en cours de développement (Figure 31 H). Le NB-506 empêche la phosphorylation des protéines SR par la Topo1. Le TG003 inhibe les Clk. L'amiloride diminue la phosphorylation de SRSF1 et affecte l'épissage de gènes importants pour le cancer;



**Figure 31. Thérapies anticancéreuses visant les modifications d'épissage.**

A: En se fixant aux sites d'épissage, des oligonucléotides empêchent le recrutement du spliceosome. B: un siRNA spécifique d'un variant d'épissage induit sa dégradation. C: il est possible de synthétiser des anticorps contre un épitope spécifique d'un variant protéique d'épissage (représentés en mauve). D: il existe des inhibiteurs de facteurs d'épissage importants pour U2 et les premières étapes d'épissage. E: certains inhibiteurs empêchent la formation du complexe B. F: il est possible d'empêcher les réarrangements conformationnels nécessaire à la seconde réaction de transestérification à l'aide d'un inhibiteur. G: des inhibiteurs des protéines SR peuvent modifier l'épissage. H-I: des inhibiteurs de phosphatases (PP rose) (H) et des SRPK (I) modifient l'état de phosphorylation des facteurs d'épissage, et, de cette manière, modifier l'épissage. J: il existe également des inhibiteurs de certains variants protéiques d'épissage.

- Des inhibiteurs de phosphatases PP1 et PP2A modifient la sélection du site d'épissage (Figure 31 I);
- Des inhibiteurs de variants spécifiques (Figure 31 J) . Par exemple, l'etoricoxib est un inhibiteur spécifique du variant 2 de COX et est utilisé pour diminuer l'inflammation.

Ces nouvelles thérapies représentent un espoir notamment pour le traitement de cancers multi-résistants. C'est pourquoi une meilleure compréhension de l'AS et de son implication

sur le traitement du cancer est nécessaire. Dans ce travail, nous nous sommes concentrés sur les mécanismes conduisant à l'AS après un stress génotoxique.



# OBJECTIFS



## BUT DU TRAVAIL

L'épissage alternatif est un mécanisme qui touche la majorité des transcrits humains et permet la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Il semble également avoir un rôle important dans le cancer. Les traitements utilisés actuellement en thérapie anticancéreuse sont loin d'être idéaux notamment parce qu'ils sont responsables d'effets secondaires sévères et que l'apparition de résistances est assez fréquente. Les agents génotoxiques sont parmi les plus utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Plusieurs études ont montré que ce type de médicament est capable d'induire de larges modifications d'épissage. Certaines ont été réalisées sur un faible nombre de transcrits et d'autres ont réalisé des études à grande échelle. Certains mécanismes moléculaires reliant le stress génotoxique et l'AS ont été identifiés (par exemple la relocalisation de facteurs d'épissage, des modifications d'interactions entre les machineries d'épissage et de transcription ou encore des modifications de la vitesse de transcription). Cependant, les voies signalétiques conduisant à ces changements sont peu connues. Le but de cette thèse était donc d'apporter une pierre à l'édifice de la compréhension de l'induction de l'épissage alternatif par les dommages à l'ADN.

Pour ce faire, nous nous sommes concentrés sur les questions suivantes:

- quels transcrits subissent un AS après l'induction de dommages à l'ADN?
- quelle(s) voie(s) signalétique(s) est (sont) impliquée(s) dans l'induction de l'AS par un stress génotoxique?
- quels facteurs d'épissage sont modifiés et de quelle manière suite à un stress génotoxique?
- différents agents génotoxiques ont-ils le même effet sur l'AS?

Afin de répondre à ces questions, nous avons décidé d'entreprendre une étude transcriptomique de cellules de cancer mammaire traitées ou non avec le Cis.

Après confirmation des événements d'AS par RT-PCR, un petit nombre d'entre eux a été sélectionné pour servir d'événements rapporteurs. Nous avons alors investigué les voies de signalisation responsables de l'induction de ces événements à l'aide de diverses techniques de biologie moléculaire.

Nous avons également réalisé un criblage pour déterminer quel(s) facteur(s) d'épissage régule(nt) les événements que nous étudions. Nous avons alors tenté de déterminer comment d'une part, le stress génotoxique, et d'autre part les voies signalétiques activées les affectaient.

Enfin, certaines expériences ont été répétées avec d'autres agents génotoxiques afin de déterminer si les voies d'activation étaient similaires à celles empruntées par le Cis.

# MATÉRIELS & MÉTHODES



## 1. CULTURE CELLULAIRE

---

Les cellules de carcinome mammaire MCF7 (authentifiées par DSMZ), HuH7, MDA-MB-231, HT1080, BT549, RD, HDF1 and HDF2, MG-63, MSU et AT5BIVA ont été cultivées dans du DMEM (Lonza). Les cellules Ishikawa ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Lonza). Les cellules GM09607 ont été cultivées dans du milieu EMEM (Lonza) et les cellules MO59J dans du milieu DMEM/F12. Des acides aminés non essentiels (1%) et 10% de sérum foetal bovin (FBS) (Lonza) ont été ajoutés.

Pour l'expérience de criblage des protéines de liaison à l'ARN, les cellules MCF7 ont été cultivées dans du  $\alpha$ MEM (Wisent Bioproducts) auquel sont ajoutés 10% de FBS (Wisent Bioproducts), 0,1 mM d'acides aminés non essentiels et 10  $\mu$ g/ml d'insuline bovine (Wisent Bioproducts).

## 2. TRANSFECTIONS DE siRNAs

---

Tous les siRNAs ont été synthétisés par Eurogentec à l'exception du siJUN qui a été commandé chez Santa Cruz. Les siRNAs ont été transfectés à une concentration finale de 20nM à l'aide de phosphate calcique. Après 16h d'incubation, les cellules ont été lavées au PBS (Lonza) puis trypsinisées et ensemencées dans de nouvelles boîtes de cultures. Après 48h de transfection, les cellules ont été traitées ou non avec les composés génotoxiques et récoltées après 72h de transfection. Le siRNA contrôle (siCTL) ne reconnaît aucun transcrit humain et a été publié dans [677](#).

Pour l'expérience de criblage des protéines de liaison à l'ARN, les siRNA ont été achetés chez IDT. Les siRNA ont été transfectés à une concentration de 100 nM à l'aide de Lipofectamine2000 (Invitrogen). Les cellules ont été récoltées 96h après transfection.

Les séquences des siRNA sont reprises dans la [Table 1](#).

Gene	siRNA sequence	Knock down (%)
<i>BRCA1</i>	ACCCGAAAUAUCCUCCUUG	53,8
<b><i>BRCA1</i></b>	<b>CAGCUUGACACAGGUUUGG</b>	57,4
<i>CCNH</i>	GGUACGGCUUGUAUGUAUU	79,1
<i>CCNH</i>	UACGGCUUGUAUGUAUUUC	0
<i>CDC5L</i>	GCACAUUACCUAUCUGGAA	82,1
<b><i>CDC5L</i></b>	<b>GUUUGGUACCAUAAUUCA</b>	88,7
<i>CDK12;CRK7</i>	CACCGAAGUGUUGUUAACA	88
<i>CDK12;CRK7</i>	CCAUUCGUGAAAUCAAAAU	87,4
<i>CLASRP;SFRS16</i>	GUACCAGAUCUACAUUGAU	58,4
<i>CLASRP;SFRS16</i>	UGUACCAGAUCUACAUUGA	52,4
<i>CLK1</i>	UAAUAAAUCCAGAUUUAA	41,7
<i>CLK1</i>	UGAUGAACGCACCUUAAUA	85,4
<i>CLP1;HEAB</i>	CAACCACUAAAUUUGAACU	46,4
<i>CLP1;HEAB</i>	GGGAGGACCUUCUGAGUUU	76,3
<i>CTNNB1</i>	GUUAUCAGAGGACUAAAUA	74,3
<b><i>CTNNB1</i></b>	<b>GUACCGGAGCCCUUCACAU</b>	72,9
<i>DDX39</i>	CGAUCUUUUGGAUUACGAU	73,5
<i>DDX39</i>	GGCUCCUCAAGAGAGCACA	69,1
<i>DDX6</i>	CUCUACUGACUUUCAAAAG	63,2
<i>DDX6</i>	ACGUGAGUGAAUUCAGUA	88,7
<i>DEK</i>	AAAGGAAGUGUCCAAUAUA	83,6
<i>DEK</i>	GAAUGUGGGUCAGUUCAGU	88,6
<i>ECH1;HNRPL;HNRNPL</i>	GCACUCUGAAGAUCGAAUA	97
<i>ECH1;HNRPL;HNRNPL</i>	UAUGGCUUGGAUCAUUCUA	94,3
<i>FMR1</i>	CACUGCUAUUGAUCUAGAU	66,7
<i>FMR1</i>	CCUCGAGAUUUCAGUACA	80,3
<i>FUS</i>	GGACAGCCCAUGAUUAAUU	76,6
<i>FUS</i>	GGCAACGGUCUCUUUUGAU	60,4
<i>FXR1</i>	GUACGAAGUUGAUGCUUUAU	75,6
<i>FXR1</i>	UUGCGAAGUAUUCGUACGA	82,1
<i>HMGA1</i>	CCACAACUCCAGGAAGGAA	73,9
<i>HMGA1</i>	CACAACUCCAGGAAGGAAA	89,2
<i>HMGA1</i>	UGAGUGAGUCGAGCUCGAA	74
<i>HMGA1</i>	GUGAGUCGAGCUCGAAGUC	75
<i>HNRNPA1;HNRPA1</i>	CCACUUAACUGUGAAAAAGAU	66,4
<i>HNRNPA1;HNRPA1</i>	AACUUUGGUGGUGGUCGUGCA	84
<i>HNRNPD;HNRPD</i>	AGACUGCACUCUGAAGUUA	85,4
<i>HNRNPD;HNRPD</i>	GAAGGUGAUUGAUCCUAAA	91,1
<i>KHDRBS1</i>	CGAGUGCUGAUACCUUGUCA	14,7
<i>KHDRBS1</i>	UGAUGGAUGAUUUCUGUCA	83,8
<i>KHDRBS3</i>	CUCCAGGAGUUAACAUAUU	80,9

<i>KHDRBS3</i>	GCGUACAAGAGGUGUACCA	69,6
<i>KHSRP</i>	GCACCGUGCAGGAGAUCAU	81,7
<i>KHSRP</i>	GCGGGGAGACCAUUAAGCA	84,5
<i>MBNL1</i>	GACGCAAUAACUUGAUUCA	85,1
<i>MBNL1</i>	AAACGCAGUUGGAGAUAAA	81,9
<i>MSI2</i>	GCAAGUGUAGAUAAAGUAU	51,5
<i>MSI2</i>	UUAGAGAAUGUAUGGUCAU	53,8
<i>NONO</i>	CCUGCAAUUGGGCAACAGG	58,6
<i>NONO</i>	GACUAUUGACCUGAAGAAU	69,1
<i>NPM1</i>	CACUUUAAGGUGGAUAAUG	76,6
<i>NPM1</i>	AAUGAGCACCAGUUAUCUU	67,1
<i>PRPF4B</i>	CCUAUAGUCAGCAGUUGUU	77,3
<i>PRPF4B</i>	CUUACGAGAGGUGUUAAAA	63,3
<i>PRPF8</i>	GAGAUAGGAGGCAUUUCAA	79,4
<i>PRPF8</i>	CGCCGAGAAAAAAGAGUAU	69
<i>RALY</i>	GCAAGCAAUGUAACCAACA	78,6
<i>RALY</i>	CUCUCGAGUCUUCUUGGA	81,4
<i>RBM3</i>	GGAUCAUGCAGGCAAGUCU	68,9
<i>RBM3</i>	UCAGAUCCGUGUGGAUCAU	0
<i>RBM3</i>	UCUGGAUGGUCGUCAGAUC	76,4
<i>RBM9;RBFOX2</i>	CACCUCGCGAGAAUGGAAU	75,9
<i>RBM9;RBFOX2</i>	CAGACACAAAGUAGUGAAA	74,9
<i>RNPC2;RBM39</i>	GCGGCAAGAAUUCGACCAA	39,7
<b><i>RNPC2;RBM39</i></b>	<b>GAUGCAAGGACAGUCUUCU</b>	<b>75,2 (72)</b>
<i>RNPS1</i>	UCUCGGUCCAGCUCGACUU	87,5
<i>RNPS1</i>	GCAUCCAGCCGCUCAGGAA	83,7
<i>RPL22andCHD5;RPL22ANDCHD5</i>	GCAAGUUCUGAAGUUCACU	89,1
<i>RPL22andCHD5;RPL22ANDCHD5</i>	UGGUGAAGGGGGGCAAAAA	78,6
<i>RPN1</i>	GUCUCUCACUGGGGUAAUA	83,8
<i>RPN1</i>	GAGGUUUGUGGACCAUGUG	70,5
<i>SAFB</i>	CCGAACGGACUGUAGUAAU	72,7
<i>SAFB</i>	AGGGGUGCCUGUGAUUAGU	87,8
<b><i>SF3A1</i></b>	<b>CUGACAUCUUCGGUGUAGA</b>	<b>60,1 (74,9)</b>
<i>SF3A1</i>	CUGAGCGGCGUACUGACAU	64,4
<i>SF3A2</i>	GACCCGUACUUCAUGAAGA	65,4
<i>SF3A2</i>	AUGCAAACUCUGCCUGACA	49,9
<i>SF3A3</i>	CCAAGAUCAGAAUGAACUU	78,9
<i>SF3A3</i>	UCAGGAUUACACAGAUAGA	76,8
<i>SF3B4;SF3B4andMTMR11</i>	GUAGCUCCUUGGGGCAAAG	83,6
<i>SF3B4;SF3B4andMTMR11</i>	GGCAAAGGUACUAAUCCCU	87,5
<i>SFPQ</i>	ACAGCCGAAUGGGCUACAU	70,5
<i>SFPQ</i>	UUCGUCAACGUGAGAUGGA	49,1

<i>SFRS3;SRSF3</i>	GCAUCGUGAUUCCUGUCCA	80,8
<i>SFRS3;SRSF3</i>	AUUGGACUGUAAGGUUUUUAU	58,3
<i>SFRS3;SRSF3</i>	UUGCAAGAGAAGUGGUGUA	38,2
<i>SFRS4;SRSF4</i>	AGAAGUGGCCGAGAUAAAU	36,7
<i>SFRS4;SRSF4</i>	UUGUGGUGAGCGAGUAAUU	71,3
<i>SFRS8;SFSWAP</i>	GAGCACAGUUUGAGAUCAU	53,7
<i>SFRS8;SFSWAP</i>	UCAACCCCUACUUAUAGUU	37
<i>SNRP70;SNRP70</i>	CACCACAAUCAACCUUUAUU	82,4
<b><i>SNRP70;SNRP70</i></b>	<b>GGUGUACGGACCUAUCAAA</b>	<b>84,1 (80,1)</b>
<i>SRA1;SCAF1;SR</i>	CCACAGUCGAACUCCUCUA	34
<i>SRA1;SCAF1;SR</i>	CCACGUCUGACAAGAGAGA	0
<i>SRPK1</i>	AGGUUAUCAUCUUGUGAAA	76,9
<i>SRPK1</i>	ACCAUGUGAUCCGAAAGUU	65
<i>SYNCRIP</i>	AGUUGCACAUAUGAUUUUA	72,5
<i>SYNCRIP</i>	GUGGAGUCAUGAAGACUUA	91,5
<i>TARBP1</i>	UUCGACUGUAUGCUUUAGU	35,7
<i>TARBP1</i>	GUUCGACUGUAUGCUUUAG	65,9
<i>THOC1</i>	GUCGACACAUCCUGUUGCA	90,8
<i>THOC1</i>	GGCAGGUCAAAUUCAAAAG	65,1
<i>TRA2B;SFRS10</i>	UCACGUAGCAGGUCUUACA	86,7
<i>TRA2B;SFRS10</i>	GUCUUACAGUCGAGAUUUAU	84,3
<b><i>U2AF1</i></b>	<b>GCUCUCGGUUGCACAAUAA</b>	<b>83,3 (97,5)</b>
<i>U2AF1</i>	GAAUAACCGUUGGUUUAAU	70,2
<i>ZNF638</i>	AGCAUUAGAAGAUGUAGUA	69,4
<i>ZNF638</i>	CGCUACAAAGAGUGAUUCA	85,2
<b><i>FOS</i></b>	<b>GAATCCGAAGGGAAAGGAA</b>	<b>53</b>
<b><i>JUN</i></b>	<b>Santa Cruz (SC29223)</b>	<b>60,7</b>
<b><i>CTL</i></b>	<b>UUGCAUACAGGACUCGUUA</b>	<b>/</b>
<b><i>SRSF4</i></b>	<b>Dharmacon (M-005151-00-0005)</b>	
<b><i>SRSF6</i></b>	<b>Dharmacon (E-016067-00-0005)</b>	
<b><i>ATR</i></b>	<b>CCUCCGUGAUGUUGCUUGA</b>	

**Table 1. Séquences et extinctions obtenues par les siRNAs.** Les séquences en gras sont celles qui ont été utilisées pour les confirmations du criblage. Les chiffres entre parenthèses représentent les extinctions obtenues lors des confirmations du criblage.

### 3. CONSTRUCTIONS DE VECTEURS D'EXPRESSION

---

Nous avons utilisé des vecteurs pDONR233 contenant les séquences codant soit pour RBM39 soit pour c-Jun provenant de l'ORFeome v5.1 (CCSB, Dana-Farber Cancer Institute). La séquence de ces deux transcrits a été insérée dans un vecteur d'expression par réaction de recombinaison à l'aide du kit « GATEWAY LR clonase enzyme kit » selon les instructions du fournisseur. La séquence codant pour RBM39 a été insérée dans le vecteur pDEST1899 permettant l'addition d'une séquence FLAG en N-terminal et celle de c-Jun a été insérée dans le pDEST475 permettant l'addition d'une séquence HA en N-terminal. L'exactitude des séquences codant pour RBM39 et c-Jun a été évaluée par séquençage à l'aide de la plateforme Génomique du GIGA (Université de Liège, Belgique).

### 4. TRANSFECTIONS DE PROTÉINES RECOMBINANTES

---

Les cellules MCF7 à 70% de confluence ont été transfectées avec l'agent de transfection JetPEI (Polyplus) selon les instructions du fournisseur. Après 16h d'incubation, les cellules ont été lavées au PBS (Lonza) puis trypsinisées et ensemencées dans des nouvelles boîtes de culture. Après 24h de transfection les cellules ont été traitées ou non avec les composés génotoxiques pendant 24 heures puis récoltées.

### 5. MESURE DE LA MORTALITÉ CELLULAIRE

---

Les cellules MCF7 ont été traitées par les agents génotoxiques pendant 48h ou transfectées par siRNA pendant 96h. Le marquage est effectué à l'aide du kit « Annexin-V FLUOS staining kit » (Roche) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules ont été récoltées par trypsinisation, centrifugées à 250 g pendant 5 min. Le culot de cellules a été resuspendu dans le tampon contenant l'Annexin V et/ou l'iodeure de propidium pour une incubation de 10 min. Les cellules ont ensuite été analysées par le BD FACSCallibur (plateforme imagerie du GIGA). 10.000 événements ont été pris en compte.

Certaines expériences ont été effectuées en parallèle par comptage de cellules ayant incorporé du bleu de trypan.

## 6. PURIFICATION D'ARN ET RT-PCR

Les ARN totaux ont été isolés à l'aide du kit « High Pure RNA isolation kit » (Roche) selon les instructions du fournisseur. Ils ont ensuite été dosés par spectrométrie (Nanodrop ND-1000, Isogene Lifesciences). Les RT-PCR sont effectuées à l'aide d'oligonucléotides spécifiques des exons situés de part et d'autre des exons subissant un AS. Quatre  $\mu\text{g}$  d'ARN ont été utilisés pour faire la réaction de reverse transcription 15 min à 70°C avec l'oligonucléotide situé en réverse et l'enzyme Tth (Roche). Une PCR en présence des deux oligonucléotides a alors été réalisée avec la même enzyme. Les séquences des oligonucléotides et les températures d'hybridation et d'élongation, le temps et le nombre de cycle des PCR sont repris dans la [Table 2](#) et la composition des tampons en [Table 3](#). Les variants d'épissage sont discriminés par électrophorèse sur gel d'acrylamide (10%) coloré à l'aide de Gelstar (FCM Bioproducts). Le signal est obtenu et quantifié avec la caméra Versadoc et le programme QuantityOne 4.6 (Bio-Rad).

Transcrit	Séquences des oligonucléotides		Cycles			
<i>AUP1</i>	Fw	CGCTGCCAGACAGCGTCCTT	94°C	65°C	72°C	28x
	Re	CAACTCCCCCGCCATTCA	20s	20s	1min 30s	
<i>CCNK</i>	Fw	CCAGTTCCTACTAAAATATGCAAAGCA	94°C	65°C	72°C	35x
	Re	CGACCGGGACATCTTGAACA	20s	20s	1min 30s	
<i>COASY</i>	Fw	TTCCGCCAGCGAATGTTGGG	94°C	65°C	72°C	35x
	Re	CTCGGGCCAGCTTTGCGATA	20s	20s	1min 30s	
<i>EED</i>	Fw	CGCCGGCGGGAACAGACATG	94°C	65°C	72°C	35x
	Re	CTGGCTGTAATCAAATCGCCCAAGAA	20s	20s	1min 30s	
<i>HNRNPA2B1</i>	Fw	CCATAGTTTCCTCCACCATATGGTCC	94°C	65°C	72°C	28x
	Re	CACGTGGTGGCGGTGGAAT	20s	20s	1min 30s	
<i>MRSP28B</i>	Fw	TGGTTCTCGCCCCGTCTGGG	94°C	65°C	72°C	28x
	Re	GGAGTAGCACTCACAGCCCCATG	20s	20s	1min 30s	
<i>MYLIP</i>	Fw	GGCGACTGGGAATCATAGAAGTTGACTAT	94°C	65°C	72°C	35x
	Re	ACAGAGCCCTCCTGGCATGGT	20s	20s	1min 30s	
<i>PPP6C</i>	Fw	AGGAGCGGCTATGTGACTACGTT	94°C	65°C	72°C	28x
	Re	ACCACCATGGACACACAAAATCTGC	20s	20s	1min 30s	

<i>RINT1</i>	Fw	CGCGGAGGCGAGATGCTACC	94°C	65°C	72°C	30x
	Re	TCCAAGGTTGCGCAGTCAGCA	20s	20s	1min 30s	
<i>RINT1(b)</i>	Fw	TCAGAAGCTGCCTGGGTATCGCA	94°C	65°C	72°C	28x
	Re	GCAAACACCTCCAGTGCAGCC	20s	20s	1min 30s	
<i>SMC1A</i>	Fw	CTGCAGATGCGGCTCAAGTACTCCC	94°C	65°C	72°C	35x
	Re	TGTTGGCGCCCCGAGTTTC	20s	20s	1min 30s	
<i>TFAM</i>	Fw	GCTTATAGGGCGGAGTGGCAGG	94°C	65°C	72°C	35x
	Re	GTGCGACGTAGAAGATCCTTTCTGTC	20s	20s	1min 30s	
<i>VEGF</i>	Fw	CCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTA	94°C	60°C	72°C	35x
	Re	CTCACCGCCTCGGCTTGTGACA	15s	30s	1min	
<i>MDM2</i>	Fw	ACCTCACAGATTCCAGCTTCGGAA	94°C	60°C	72°C	34x
	Re	GCTACTAGAAGTTGATGGCTGAGAA	15s	20s	1min	
<i>MTA1</i>	Fw	GATCCGGAGAATCGAGGAGCTCA	94°C	66°C	72°C	27x
	Re	AGGAACAGCTCCCGATGCCGCA	15s	20s	30s	
<i>SRSF3</i>	Fw	GATTATCGTAGGAGGAGTCTCCA	94°C	66°C	72°C	31x
	Re	CATTTGACCTAGATCGACTACGAGA	15s	20s	30s	
<i>CSDE1</i>	Fw	AGCCCGCAACTCTCGCGAGAGA	94°C	60°C	72°C	35x
	Re	CCAGCTGAACGTTCCCTTCGACA	15s	20s	1min	
<i>EIF4A2</i>	Fw	ATCGAGAGCAACTGGAATGAGATTG	94°C	66°C	72°C	31x
	Re	AACATTTGTTCCACCAATGCAGGCA	15s	20s	30s	
<i>TMPO</i>	Fw	CACTCAAGCAAAGAAGAGTTGAGCA	94°C	60°C	72°C	35x
	Re	TGAGTTCTAATGGCCGGCCTGCA	15s	20s	1min	
<i>HNRPD E6</i>	Fw	AGATACCATCAAATTGGTTCTGGGAA	94°C	66°C	72°C	35x
	Re	GATGCCTTGCCATAAGTGCTCTGT	15s	20s	30s	
<i>HNRPD E8</i>	Fw	TCACCAAAAACAATTACCAGCCATACT	94°C	66°C	72°C	31x
	Re	TGAGACATAACACAGATAGCAAAGGA	15s	20s	30s	
<i>AMZ2</i>	Fw	GCCAGTGATCTCTTTGGACCCATT	94°C	60°C	72°C	30x
	Re	GTCAAAGAGGCCTGTCCAAAGACA	15s	20s	1min	
<i>MAGO H</i>	Fw	AAGTTCGGCCACGAGTTCCTGGA	94°C	66°C	72°C	27x
	Re	ACCAAACACTTCAGGTCCTGGACA	15s	20s	30s	
<i>NFE2L1</i>	Fw	GCAGGACACCTGGGCAGGCGA	94°C	66°C	72°C	27x
	Re	CCCGGTCAGAAGAGGAGACAAGA	15s	20s	30s	
<i>STRAP E2</i>	Fw	AGCCCGAGGCACTGCAGCAGAA	94°C	66°C	72°C	27x
	Re	CATCAATTCATCTCCTGAGACAGC	15s	20s	30s	
<i>SRSF4</i>	Fw	CATTCTAAGAGTAGATCTCGGTCCA	94°C	66°C	72°C	28x
	Re	CTCTTTTCTTGCTGGGGCTCCT	15s	20s	10s	
<i>SRSF6</i>	Fw	GCGAGCGCGTGATCGTAGAGCA	94°C	66°C	72°C	25x
	Re	ATTCTGTACGAACAGGTGGTCCGT	15s	20s	10s	

Table 2. Séquences des oligonucléotides et conditions de PCR.

Réactif	RT-PCR	PCR
Tampon RT (10 x)	1 x	0,20 x
MnCl <sub>2</sub>	0,9 mM	0,18 mM
dNTP	800 $\mu$ M	160 $\mu$ M
Oligonucléotide Rev	750 nM	150 nM
Tth	4 U	0,8 U
Tampon PCR (10 x)	-	1 x
EGTA	-	0,75 nM
Oligonucléotide Fw	-	150 nM

*Table 3. Composition des tampons de PCR et RT-PCR*

## 7. IMMUNOFLUORESCENCES

Les cellules MCF7 ont été cultivées sur des lamelles. Après lavage au PBS, elles ont été fixées 10 min dans de la paraformaldéhyde 4% à température ambiante. Puis elles ont été perméabilisées dans du PBS contenant 0,1% de Triton X100 et bloquées 30 min avec du PBS contenant 10% de FBS. Les cellules ont alors été incubées 1h à 37°C dans l'anticorps primaire, lavées 3 fois au PBS-FBS puis incubées 1h à 37°C dans l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Alexa FLUOR, Thermo Fisher Scientific). Après 3 lavages, les noyaux ont été marqués pendant 15 min à température ambiante par du Hoechst 33342 dilué à 1/50.000 (Acros Organic). Après 3 lavages à l'eau, les lamelles ont été fixées sur des lames avec du Mowiol (Sigma). Les images ont été acquises avec un microscope confocal inversé SP5 A0B5 (Leica) et le programme LAS AF. Nous avons utilisé un objectif 63x immergé dans du glycérol. Toutes les images sont des coupes optiques obtenues en utilisant le réglage Airy 1 (0,853  $\mu$ m pour l'objectif 63x) qui correspond à une image confocale. Lors de chacune des expériences une marquage avec l'anticorps secondaire seul à été réalisée. Nous nous sommes assuré que le signal obtenu avec l'anticorps primaire était plus élevé.

## 8. EXTRACTION DE PROTÉINES ET WESTERN BLOT

Les extraits totaux ont été obtenus en incubant les cellules dans du tampon Laemmlı contenant 50 mM de DTT. Les lysats sont alors soniqués 10 s et chauffés 15 min à 65°C.

Les extraits nucléaires sont obtenus par une lyse en deux étapes. Les cellules sont récoltées dans le tampon de lyse cytoplasmique (Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NP-40 0,3 % (V/V) pH 7,4) et incubées 12 min sur glace. Après centrifugation 5 min à 3300 g les protéines cytoplasmiques contenues dans le surnageant sont récupérées et

le culot de protéines nucléaires et membranaires est lavé deux fois avec le tampon de lavage (HEPES 10 mM, KCl 20mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM EDTA 0,1 mM, pH 7,9) puis incubé 20 min sur glace dans le tampon de lyse nucléaire (Tris-HCl 50 mM, NaCl 280 mM, NP-40 0,5%, EGTA 2 mM, EDTA 10mM, Glycérol 10% (V/V)). Après centrifugation, les protéines nucléaires contenues dans le surnageant sont récoltées.

Les protéines ont été déposées sur SDS-PAGE puis transférées sur des membranes de PVDF (GE Healthcare Life Sciences). Après 1 h de blocage dans du TBS-Tween contenant 5% de lait, la membrane a été incubée 2 h à température ambiante ou une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (Table 4). Ensuite, elle a été lavée au TBS-tween puis incubée dans un anticorps secondaire couplé à la HRP (Dako ou Cell Signalling). La chemoluminescence produite par l'ECL (GE Healthcare Life Sciences) a été visualisée à l'aide du LAS4000 Biomolecular Imager (GE Healthcare Life Sciences).

Protéine reconnue	Référence	Firme
ATR	2790	Cell signaling
c-Jun	9163	Cell signaling
FIB	AB4566	Abcam
FOS	sc52	Santa Cruz
GAPDH	4300	Ambion
HSP90	sc7947	Santa Cruz
NBS1	611870	BD
Nucléoline	sc55486	Santa Cruz
P-c-Jun (Ser63)	2361	Cell signaling
P-c-Jun (Ser73)	3270	Cell signaling
P-c-Jun (Thr91)	2303	Cell signaling
P-c-Jun (Thr93)	2993	Cell signaling
RBM39	HPA001591	Sigma Aldrich
SC35	AB11826	Abcam
SF3A1	HPA00690	Sigma Aldrich
SNSRNP70	sc9571	Santa Cruz
U2AF1	AB172614	Abcam

*Table 4. Anticorps utilisés en western blot, en immunofluorescence et en immunoprécipitation.*

## 9. CO-IMMUNOPRÉCIPITATIONS

Les cellules MCF7 (transfectées ou non et traitées ou non) ont été récoltées par grattage. Le culot de cellules récolté après centrifugation a été incubé 20 min à 4°C dans le tampon de lyse pour IP (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% triton, 10% glycérol, 25 mM β-glycérophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1.5 mM NaF, Compete™ (1:50, v:v)) puis centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. RBM39, c-Jun ou SF3A1 ont été immunoprécipités

pendant 2 h à 4°C à partir d'1 mg (pour les IP exogènes réalisées avec un anticorps anti-FLAG ou anti-HA) ou 5 mg (pour les IP endogènes réalisées avec un anticorps anti-c-Jun ou anti-SF3A1) d'extraits protéiques totaux. Sept  $\mu\text{l}$  de billes A/G magnétiques (Pierce, Thermo Scientific) ont alors été ajoutées à la solution contenant les protéines et l'anticorps pour une incubation d'une heure à 4°C. Les immunoprécipitats ont été lavés 3 fois avec le tampon de lyse pour IP. Enfin, les protéines ont été éluées des billes à l'aide du tampon d'éluion pour IP (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 3%  $\beta$ -mercaptoéthanol, 10% glycérol) incubé 10 min sur glace.

## 10. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION MOLÉCULAIRE

---

Les cellules MCF7 prétraitées ou non pendant 3h avec du SR11302 (5  $\mu\text{M}$ ) puis traitées ou non avec du Cis (50  $\mu\text{M}$ ) ont été récoltées par grattage. Le culot de cellules récolté après centrifugation a été incubé 20 min à 4°C dans le tampon de lyse pour IP (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% triton, 10% glycérol, 25 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1.5 mM NaF, Compete™ (1:50, v:v)) puis centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. Après dosage protéique à l'aide du Bio Rad protein assay (Bio Rad), 5 mg de protéines ont été déposés sur colonne (Superose 6-Prep Grade (GE Health Care)) et élués en 115 fractions de 300  $\mu\text{l}$  grâce au AKTAPRIME plus (GE Health Care). Du bleu de chargement est alors ajouté aux fractions qui sont ensuite dénaturées 3 min à 100°C puis déposées sur SDS-PAGE. Les protéines d'intérêts sont révélées par western blot.

## 11. ESSAIS LUCIFÉRISE

---

Des cellules MCF7 ont été transfectées avec un plasmide contenant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle d'un promoteur contenant 7 répétitions d'une séquence de liaison de c-Jun/c-Fos (TGACTAA) (Stratagene). Après 24 h de transfection, les cellules ont été traitées ou non avec du Cis (50  $\mu\text{M}$ ) ou du PMA (600 nM). Après 48h de transfection (24 h de traitement), les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée à l'aide du kit « Luciferase Reporter Gene Assay » (Roche) en suivant les recommandations du fournisseur. L'activité luciférase a été normalisée à la concentration protéique totale de l'échantillon mesurée par le Bio Rad protein assay (Bio Rad).

## 12. SÉQUENÇAGE DE L'ARN

---

Les bibliothèques d'ARN et le séquençage ont été faits sur des extraits d'ARN totaux à la

plateforme Géno-transcriptomique du GIGA (Université de Liège). La qualité de l'ARN a été vérifiée à l'aide du BioAnalyser 2100 (Agilent technologies). Les librairies ont été préparées avec le kit «Truseq® mRNA Sample Prep kit » (Illumina) à partir d'1  $\mu$ g d'ARN total en suivant les instructions du fournisseur. Les ARN messagers ont été sélectionnés par complémentarité aux poly-A et ont été fragmentés (8 min à 94°C). Les ARN fragmentés en morceaux de 170 nucléotides en moyenne ont été rétro-transcrits en présence de Superscrip II (Invitrogen) et des oligonucléotides de séquences aléatoires. Après transcription réverse, réparation des extrémités et synthèse d'une queue A et purification, les ADN complémentaires double brins ont été liés à des adaptateurs Truseq contenant les séquences indexes. Quinze cycles de PCR en présence d'oligonucléotides adéquats ont servis à générer les librairies finales. Les librairies ont été séquencées par le séquenceur Illumina GAIIx avec le protocole 2 x 76 bases en multiplex. Les données brutes ont été générées à l'aide de la suite CASAVA 1.6 (Illumina). Les lectures du séquençage de l'ARN ont été alignées au génome de référence (hg19, UCSA) à l'aide du programme TopHat. La quantification du niveau d'expression des transcrits alignés a été réalisée à l'aide du programme Cufflinks. Le programme SpliceSeq (1.2) quant à lui, a été utilisé pour déterminer les variations d'épissage.

## 13. STATISTIQUES

---

Les moyennes et écart types ont été mesurés à partir de 2 à 10 expériences indépendantes. La signification des différences entre les conditions a été déterminée en utilisant un test de Student pairé à partir des rapport entre les conditions. Les modifications statistiquement significatives ont été indiquées par \*( $p < 0,05$ ) \*\*( $p < 0,01$ ) \*\*\*( $p < 0,001$ ).



# BIBLIOGRAPHIE



- 1 Kinzler, K.W., and B. Vogelstein. 1996. Life (and death) in a malignant tumour. *Nature*. 379:19-20.
- 2 Foulds, L. 1954. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer research*. 14:327-339.
- 3 Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 194:23-28.
- 4 Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646-674.
- 5 Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70.
- 6 Walsh, D. 2009. Palliative medicine. In Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA.
- 7 Wang, J.C. 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 3:430-440.
- 8 Champoux, J.J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry*. 70:369-413.
- 9 Leppard, J.B., and J.J. Champoux. 2005. Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma*. 114:75-85.
- 10 Tomicic, M.T., and B. Kaina. 2013. Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochimica et biophysica acta*. 1835:11-27.
- 11 Wozniak, K., and J. Blasiak. 2002. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta biochimica Polonica*. 49:583-596.
- 12 Siddik, Z.H. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 22:7265-7279.
- 13 National Cancer Institute. 2007. Cisplatin. Vol. 2016.
- 14 Ishida, S., J. Lee, D.J. Thiele, and I. Herskowitz. 2002. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:14298-14302.
- 15 Holzer, A.K., G.H. Manorek, and S.B. Howell. 2006. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Molecular pharmacology*. 70:1390-1394.
- 16 Andrews, P.A., S. Velury, S.C. Mann, and S.B. Howell. 1988. cis-Diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer research*. 48:68-73.
- 17 Gately, D.P., and S.B. Howell. 1993. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British journal of cancer*. 67:1171-1176.
- 18 Perez, C., M. Leng, and J.M. Malinge. 1997. Rearrangement of interstrand cross-links into intrastrand cross-links in cis-diamminedichloroplatinum(II)-modified DNA. *Nucleic acids research*. 25:896-903.
- 19 el-Khateeb, M., T.G. Appleton, L.R. Gahan, B.G. Charles, S.J. Berners-Price, and A.M. Bolton. 1999. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. *Journal of inorganic biochemistry*. 77:13-21.
- 20 Kelland, L.R. 2000. Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*. 59 Suppl 4:1-8; discussion 37-38.
- 21 Roberts, J.J. and Pera, Jr J.J. 1983. Platinum, Gold, and other Metal Chemotherapeutic Agents: Chemistry and Biochemistry. Lippard SJ (ed). American Chemical Society: Washington, DC, 3-25.
- 22 Pinto, A.L., and S.J. Lippard. 1985. Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochimica et biophysica acta*. 780:167-180.
- 23 Fraval, H.N., and J.J. Roberts. 1979. Excision repair of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced damage to DNA of Chinese hamster cells. *Cancer research*. 39:1793-1797.
- 24 Kelland, L.R. 1993. New platinum antitumor complexes. *Critical reviews in oncology/hematology*. 15:191-219.
- 25 Eastman, A. 1987. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology & therapeutics*. 34:155-166.
- 26 Bellon, S.F., J.H. Coleman, and S.J. Lippard. 1991. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*. 30:8026-8035.
- 27 Sorenson, C.M., and A. Eastman. 1988. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer research*. 48:4484-4488.
- 28 Jordan, P., and M. Carmo-Fonseca. 2000. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS. 57:1229-1235.
- 29 Galluzzi, L., I. Vitale, J. Michels, C. Brenner, G. Szabadkai, A. Harel-Bellan, M. Castedo, and G. Kroemer. 2014. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future.

- Cell death & disease. 5:e1257.
- 30 Donahue, B.A., M. Augot, S.F. Bellon, D.K. Treiber, J.H. Toney, S.J. Lippard, and J.M. Essigmann. 1990. Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry*. 29:5872-5880.
  - 31 Fink, D., S. Aebi, and S.B. Howell. 1998. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 4:1-6.
  - 32 Chaney, S.G., and A. Vaisman. 1999. Specificity of platinum-DNA adduct repair. *Journal of inorganic biochemistry*. 77:71-81.
  - 33 Kartalou, M., and J.M. Essigmann. 2001. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation research*. 478:1-21.
  - 34 Basu, A., and S. Krishnamurthy. 2010. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *Journal of nucleic acids*. 2010.
  - 35 Ravi, R., S.M. Somani, and L.P. Rybak. 1995. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacology & toxicology*. 76:386-394.
  - 36 Muscella, A., C. Vetrugno, G. Antonaci, L.G. Cossa, and S. Marsigliante. 2015. PKC-delta/PKC-alpha activity balance regulates the lethal effects of cisplatin. *Biochemical pharmacology*. 98:29-40.
  - 37 Hsiang, Y.H., R. Hertzberg, S. Hecht, and L.F. Liu. 1985. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *The Journal of biological chemistry*. 260:14873-14878.
  - 38 Stivers, J.T., T.K. Harris, and A.S. Mildvan. 1997. Vaccinia DNA topoisomerase I: evidence supporting a free rotation mechanism for DNA supercoil relaxation. *Biochemistry*. 36:5212-5222.
  - 39 Stewart, L., M.R. Redinbo, X. Qiu, W.G. Hol, and J.J. Champoux. 1998. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*. 279:1534-1541.
  - 40 Koster, D.A., V. Croquette, C. Dekker, S. Shuman, and N.H. Dekker. 2005. Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature*. 434:671-674.
  - 41 Champoux, J.J. 2001. DNA topoisomerase I-mediated nicking of circular duplex DNA. *Methods in molecular biology*. 95:81-87.
  - 42 Horwitz, M.S., and S.B. Horwitz. 1971. Intracellular degradation of HeLa and adenovirus type 2 DNA induced by camptothecin. *Biochemical and biophysical research communications*. 45:723-727.
  - 43 Kessel, D. 1971. Effects of camptothecin on RNA synthesis in leukemia L1210 cells. *Biochimica et biophysica acta*. 246:225-232.
  - 44 Kessel, D., H.B. Bosmann, and K. Lohr. 1972. Camptothecin effects on DNA synthesis in murine leukemia cells. *Biochimica et biophysica acta*. 269:210-216.
  - 45 Spataro, A., and D. Kessel. 1972. Studies on camptothecin-induced degradation and apparent reaggregation of DNA from L1210 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 48:643-648.
  - 46 Covey, J.M., C. Jaxel, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1989. Protein-linked DNA strand breaks induced in mammalian cells by camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. *Cancer research*. 49:5016-5022.
  - 47 Pommier, Y. 2009. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chemical reviews*. 109:2894-2902.
  - 48 Pommier, Y. 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews. Cancer*. 6:789-802.
  - 49 Jaxel, C., G. Capranico, D. Kerrigan, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1991. Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin. *The Journal of biological chemistry*. 266:20418-20423.
  - 50 Leteurtre, F., M. Fesen, G. Kohlhagen, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1993. Specific interaction of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, with guanine residues of DNA detected by photoactivation at 365 nm. *Biochemistry*. 32:8955-8962.
  - 51 Tanizawa, A., K.W. Kohn, G. Kohlhagen, F. Leteurtre, and Y. Pommier. 1995. Differential stabilization of eukaryotic DNA topoisomerase I cleavable complexes by camptothecin derivatives. *Biochemistry*. 34:7200-7206.
  - 52 Tourriere, H., and P. Pasero. 2007. Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites. *DNA repair*. 6:900-913.
  - 53 Aguilera, A., and B. Gomez-Gonzalez. 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature reviews. Genetics*. 9:204-217.
  - 54 Khobta, A., F. Ferri, L. Lotito, A. Montecucco, R. Rossi, and G. Capranico. 2006. Early effects of topoisomerase I inhibition on RNA polymerase II along transcribed genes in human cells. *Journal of molecular biology*. 357:127-138.

- 55 Sordet, O., S. Larochelle, E. Nicolas, E.V. Stevens, C. Zhang, K.M. Shokat, R.P. Fisher, and Y. Pommier. 2008. Hyperphosphorylation of RNA polymerase II in response to topoisomerase I cleavage complexes and its association with transcription- and BRCA1-dependent degradation of topoisomerase I. *Journal of molecular biology*. 381:540-549.
- 56 Hamperl, S., and K.A. Cimprich. 2014. The contribution of co-transcriptional RNA:DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability. *DNA repair*. 19:84-94.
- 57 Drolet, M., X. Bi, and L.F. Liu. 1994. Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 269:2068-2074.
- 58 Chan, Y.A., P. Hieter, and P.C. Stirling. 2014. Mechanisms of genome instability induced by RNA-processing defects. *Trends in genetics : TIG*. 30:245-253.
- 59 El Hage, A., S. Webb, A. Kerr, and D. Tollervy. 2014. Genome-wide distribution of RNA-DNA hybrids identifies RNase H targets in tRNA genes, retrotransposons and mitochondria. *PLoS genetics*. 10:e1004716.
- 60 Ginno, P.A., P.L. Lott, H.C. Christensen, I. Korf, and F. Chedin. 2012. R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. *Molecular cell*. 45:814-825.
- 61 Skourti-Stathaki, K., K. Kamieniarz-Gdula, and N.J. Proudfoot. 2014. R-loops induce repressive chromatin marks over mammalian gene terminators. *Nature*. 516:436-439.
- 62 Skourti-Stathaki, K., N.J. Proudfoot, and N. Gromak. 2011. Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination. *Molecular cell*. 42:794-805.
- 63 Sun, Q., T. Csorba, K. Skourti-Stathaki, N.J. Proudfoot, and C. Dean. 2013. R-loop stabilization represses antisense transcription at the Arabidopsis FLC locus. *Science*. 340:619-621.
- 64 Aguilera, A., and T. Garcia-Muse. 2012. R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Molecular cell*. 46:115-124.
- 65 Skourti-Stathaki, K., and N.J. Proudfoot. 2014. A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes & development*. 28:1384-1396.
- 66 Sollier, J., and K.A. Cimprich. 2015. Breaking bad: R-loops and genome integrity. *Trends in cell biology*. 25:514-522.
- 67 Iwamoto, T., Y. Hiraku, S. Oikawa, H. Mizutani, M. Kojima, and S. Kawanishi. 2004. DNA intrastrand cross-link at the 5'-GA-3' sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. *Cancer science*. 95:454-458.
- 68 Tomasz, M. 1995. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry & biology*. 2:575-579.
- 69 Pommier, Y., E. Leo, H. Zhang, and C. Marchand. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & biology*. 17:421-433.
- 70 Appella, E., and C.W. Anderson. 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European journal of biochemistry / FEBS*. 268:2764-2772.
- 71 Alarcon-Vargas, D., and Z. Ronai. 2002. p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis*. 23:541-547.
- 72 Nigg, E.A. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 17:471-480.
- 73 Wang, X., J.L. Martindale, and N.J. Holbrook. 2000. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 275:39435-39443.
- 74 Makin, G.W., B.M. Corfe, G.J. Griffiths, A. Thistlethwaite, J.A. Hickman, and C. Dive. 2001. Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *The EMBO journal*. 20:6306-6315.
- 75 D'Amours, D., S. Desnoyers, I. D'Silva, and G.G. Poirier. 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical journal*. 342 ( Pt 2):249-268.
- 76 Basu, A., S. Broyde, S. Iwai, and C. Kisker. 2010. DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. *Journal of nucleic acids*. 2010:182894.
- 77 Cargnello, M., and P.P. Roux. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 75:50-83.
- 78 Plotnikov, A., E. Zehorai, S. Procaccia, and R. Seger. 2011. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et biophysica acta*. 1813:1619-1633.
- 79 Fan, M., and T.C. Chambers. 2001. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 4:253-267.

- 80 Brozovic, A., and M. Osmak. 2007. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer letters*. 251:1-16.
- 81 Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 26:3100-3112.
- 82 Shaul, Y.D., and R. Seger. 2007. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et biophysica acta*. 1773:1213-1226.
- 83 Zehorai, E., Z. Yao, A. Plotnikov, and R. Seger. 2010. The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Molecular and cellular endocrinology*. 314:213-220.
- 84 Persons, D.L., E.M. Yazlovitskaya, and J.C. Pelling. 2000. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *The Journal of biological chemistry*. 275:35778-35785.
- 85 Kyriakis, J.M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E.A. Rubie, M.F. Ahmad, J. Avruch, and J.R. Woodgett. 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 369:156-160.
- 86 Johnson, G.L., and K. Nakamura. 2007. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1773:1341-1348.
- 87 Cui, G.M., Y.X. Zhao, N.N. Zhang, Z.S. Liu, W.C. Sun, and Q.S. Peng. 2013. Amiloride attenuates lipopolysaccharide-accelerated atherosclerosis via inhibition of NHE1-dependent endothelial cell apoptosis. *Acta pharmacologica Sinica*. 34:231-238.
- 88 Sabapathy, K. 2012. Role of the JNK pathway in human diseases. *Progress in molecular biology and translational science*. 106:145-169.
- 89 Sui, X., N. Kong, L. Ye, W. Han, J. Zhou, Q. Zhang, C. He, and H. Pan. 2014. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer letters*. 344:174-179.
- 90 Han, J., J.D. Lee, L. Bibbs, and R.J. Ulevitch. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 265:808-811.
- 91 Loesch, M., and G. Chen. 2008. The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 13:3581-3593.
- 92 Brancho, D., N. Tanaka, A. Jaeschke, J.J. Ventura, N. Kelkar, Y. Tanaka, M. Kyuuma, T. Takeshita, R.A. Flavell, and R.J. Davis. 2003. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes & development*. 17:1969-1978.
- 93 Deacon, K., P. Mistry, J. Chernoff, J.L. Blank, and R. Patel. 2003. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. *Molecular biology of the cell*. 14:2071-2087.
- 94 Cuadrado, M., P. Gutierrez-Martinez, A. Swat, A.R. Nebreda, and O. Fernandez-Capetillo. 2009. p27Kip1 stabilization is essential for the maintenance of cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cancer research*. 69:8726-8732.
- 95 Salim, H., N.S. Akbar, D. Zong, A.H. Vaculova, R. Lewensohn, A. Moshfegh, K. Viktorsson, and B. Zhivotovsky. 2012. miRNA-214 modulates radiotherapy response of non-small cell lung cancer cells through regulation of p38MAPK, apoptosis and senescence. *British journal of cancer*. 107:1361-1373.
- 96 Limami, Y., A. Pinon, D.Y. Leger, E. Pinault, C. Delage, J.L. Benezout, A. Simon, and B. Liagre. 2012. The P2Y2/Src/p38/COX-2 pathway is involved in the resistance to ursolic acid-induced apoptosis in colorectal and prostate cancer cells. *Biochimie*. 94:1754-1763.
- 97 Chen, S.F., S. Nieh, S.W. Jao, C.L. Liu, C.H. Wu, Y.C. Chang, C.Y. Yang, and Y.S. Lin. 2012. Quercetin suppresses drug-resistant spheres via the p38 MAPK-Hsp27 apoptotic pathway in oral cancer cells. *PloS one*. 7:e49275.
- 98 Gan, L., J. Wang, H. Xu, and X. Yang. 2011. Resistance to docetaxel-induced apoptosis in prostate cancer cells by p38/p53/p21 signaling. *The Prostate*. 71:1158-1166.
- 99 Cui, Q., S. Tashiro, S. Onodera, M. Minami, and T. Ikejima. 2007. Oridonin induced autophagy in human cervical carcinoma HeLa cells through Ras, JNK, and P38 regulation. *Journal of pharmacological sciences*. 105:317-325.
- 100 Dent, P., and S. Grant. 2001. Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 7:775-783.
- 101 Yang, S.H., A.D. Sharrocks, and A.J. Whitmarsh. 2013. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*. 513:1-13.
- 102 Olsen, B.B., T.H. Svenstrup, and B. Guerra. 2012. Downregulation of protein kinase CK2 induces autophagic cell death through modulation of the mTOR and MAPK signaling

- pathways in human glioblastoma cells. *International journal of oncology*. 41:1967-1976.
- 103 Yang, S.H., A.D. Sharrocks, and A.J. Whitmarsh. 2013. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*. 513:1-13.
- 104 Fang, J.Y., and B.C. Richardson. 2005. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The Lancet. Oncology*. 6:322-327.
- 105 Dempke, W., W. Voigt, A. Grothey, B.T. Hill, and H.J. Schmoll. 2000. Cisplatin resistance and oncogenes--a review. *Anti-cancer drugs*. 11:225-236.
- 106 Pan, S.L., Y.W. Huang, J.H. Guh, Y.L. Chang, C.Y. Peng, and C.M. Teng. 2003. Esculetin inhibits Ras-mediated cell proliferation and attenuates vascular restenosis following angioplasty in rats. *Biochemical pharmacology*. 65:1897-1905.
- 107 Shaulian, E., and M. Karin. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*. 20:2390-2400.
- 108 Pulverer, B.J., J.M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J.R. Woodgett. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*. 353:670-674.
- 109 Smeal, T., B. Binetruy, D.A. Mercola, M. Birrer, and M. Karin. 1991. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*. 354:494-496.
- 110 Davis, R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 103:239-252.
- 111 Morton, S., R.J. Davis, A. McLaren, and P. Cohen. 2003. A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *The EMBO journal*. 22:3876-3886.
- 112 Papavassiliou, A.G., M. Treier, and D. Bohmann. 1995. Intramolecular signal transduction in c-Jun. *The EMBO journal*. 14:2014-2019.
- 113 Yogev, O., K. Saadon, S. Anzi, K. Inoue, and E. Shaulian. 2008. DNA damage-dependent translocation of B23 and p19 ARF is regulated by the Jun N-terminal kinase pathway. *Cancer research*. 68:1398-1406.
- 114 Thorpe, L.M., H. Yuzugullu, and J.J. Zhao. 2015. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature reviews. Cancer*. 15:7-24.
- 115 Xu, Y., N. Li, R. Xiang, and P. Sun. 2014. Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends in biochemical sciences*. 39:268-276.
- 116 Damia, G., L. Filiberti, F. Vikhanskaya, L. Carassa, Y. Taya, M. D'Incalci, and M. Broggin. 2001. Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia*. 3:10-16.
- 117 Zhao, H., and H. Piwnica-Worms. 2001. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and cellular biology*. 21:4129-4139.
- 118 Micheau, O., E. Solary, A. Hammann, F. Martin, and M.T. Dimanche-Boitrel. 1997. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *Journal of the National Cancer Institute*. 89:783-789.
- 119 Muller, M., S. Wilder, D. Bannasch, D. Israeli, K. Lehlbach, M. Li-Weber, S.L. Friedman, P.R. Galle, W. Stremmel, M. Oren, and P.H. Kramer. 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *The Journal of experimental medicine*. 188:2033-2045.
- 120 Eischen, C.M., T.J. Kottke, L.M. Martins, G.S. Basi, J.S. Tung, W.C. Earnshaw, P.J. Leibson, and S.H. Kaufmann. 1997. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood*. 90:935-943.
- 121 Ferreira, C.G., C. Tolis, S.W. Span, G.J. Peters, T. van Lopik, A.J. Kummer, H.M. Pinedo, and G. Giaccone. 2000. Drug-induced apoptosis in lung cancer cells is not mediated by the Fas/FasL (CD95/APO1) signaling pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 6:203-212.
- 122 Hayakawa, J., M. Ohmichi, H. Kurachi, H. Ikegami, A. Kimura, T. Matsuoka, H. Jikihara, D. Mercola, and Y. Murata. 1999. Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line. *The Journal of biological chemistry*. 274:31648-31654.
- 123 Lee, S., S. Yoon, and D.H. Kim. 2007. A high nuclear basal level of ERK2 phosphorylation contributes to the resistance of cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology*. 104:338-344.
- 124 Yeh, P.Y., K.H. Yeh, S.E. Chuang, Y.C. Song, and A.L. Cheng. 2004. Suppression of MEK/ERK signaling pathway enhances cisplatin-induced NF-kappaB activation by protein phosphatase 4-mediated NF-kappaB p65 Thr dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 279:26143-26148.

- 125 Mandic, A., K. Viktorsson, T. Heiden, J. Hansson, and M.C. Shoshan. 2001. The MEK1 inhibitor PD98059 sensitizes C8161 melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Melanoma research*. 11:11-19.
- 126 Amran, D., P. Sancho, C. Fernandez, D. Esteban, A.M. Ramos, E. de Blas, M. Gomez, M.A. Palacios, and P. Aller. 2005. Pharmacological inhibitors of extracellular signal-regulated protein kinases attenuate the apoptotic action of cisplatin in human myeloid leukemia cells via glutathione-independent reduction in intracellular drug accumulation. *Biochimica et biophysica acta*. 1743:269-279.
- 127 Zhang, Y., X. Qu, W. Jing, X. Hu, X. Yang, K. Hou, Y. Teng, J. Zhang, and Y. Liu. 2009. GSTP1 determines cis-platinum cytotoxicity in gastric adenocarcinoma MGC803 cells: regulation by promoter methylation and extracellular regulated kinase signaling. *Anti-cancer drugs*. 20:208-214.
- 128 Basu, A., and H. Tu. 2005. Activation of ERK during DNA damage-induced apoptosis involves protein kinase Cdelta. *Biochemical and biophysical research communications*. 334:1068-1073.
- 129 Woessmann, W., X. Chen, and A. Borkhardt. 2002. Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 50:397-404.
- 130 Dhar, R., and A. Basu. 2008. Constitutive activation of p70 S6 kinase is associated with intrinsic resistance to cisplatin. *International journal of oncology*. 32:1133-1137.
- 131 Sheu, L.F., Z.H. Young, W.C. Lee, Y.F. Chen, W.Y. Kao, and A. Chen. 2007. ST1571 sensitizes nasopharyngeal carcinoma cells to cisplatin: sustained activation of ERK with improved growth inhibition. *International journal of oncology*. 30:403-411.
- 132 Park, S.A., H.J. Park, B.I. Lee, Y.H. Ahn, S.U. Kim, and K.S. Choi. 2001. Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis by suppression of ERK-mediated p53 accumulation in B104 cells. *Brain research*. 93:18-26.
- 133 Lou, X., Q. Zhou, Y. Yin, C. Zhou, and Y. Shen. 2009. Inhibition of the met receptor tyrosine kinase signaling enhances the chemosensitivity of glioma cell lines to CDDP through activation of p38 MAPK pathway. *Molecular cancer therapeutics*. 8:1126-1136.
- 134 Hayakawa, J., M. Ohmichi, H. Kurachi, Y. Kanda, K. Hisamoto, Y. Nishio, K. Adachi, K. Tasaka, T. Kanzaki, and Y. Murata. 2000. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer research*. 60:5988-5994.
- 135 Hung, M.C., and Y.K. Lau. 1999. Basic science of HER-2/neu: a review. *Seminars in oncology*. 26:51-59.
- 136 Fekete, M., C. Santiskulvong, C. Eng, and O. Dorigo. 2012. Effect of PI3K/Akt pathway inhibition-mediated G1 arrest on chemosensitization in ovarian cancer cells. *Anticancer research*. 32:445-452.
- 137 Ohta, T., M. Ohmichi, T. Hayasaka, S. Mabuchi, M. Saitoh, J. Kawagoe, K. Takahashi, H. Igarashi, B. Du, M. Doshida, I.G. Mirei, T. Motoyama, K. Tasaka, and H. Kurachi. 2006. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in in vivo ovarian cancer models. *Endocrinology*. 147:1761-1769.
- 138 Sinnberg, T., K. Lasithiotakis, H. Niessner, B. Schitteck, K.T. Flaherty, D. Kulms, E. Maczey, M. Campos, J. Gogel, C. Garbe, and F. Meier. 2009. Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide. *The Journal of investigative dermatology*. 129:1500-1515.
- 139 Peng, D.J., J. Wang, J.Y. Zhou, and G.S. Wu. 2010. Role of the Akt/mTOR survival pathway in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 394:600-605.
- 140 Lee, S., E.J. Choi, C. Jin, and D.H. Kim. 2005. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecologic oncology*. 97:26-34.
- 141 Shi, L., W.K. Nishioka, J. Th'ng, E.M. Bradbury, D.W. Litchfield, and A.H. Greenberg. 1994. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science*. 263:1143-1145.
- 142 Shapiro, G.I., and J.W. Harper. 1999. Anti-cancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *The Journal of clinical investigation*. 104:1645-1653.
- 143 Demarcq, C., R.T. Bunch, D. Creswell, and A. Eastman. 1994. The role of cell cycle progression in cisplatin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 5:983-993.
- 144 O'Connor, P.M., and S. Fan. 1996. DNA

- damage checkpoints: implications for cancer therapy. *Progress in cell cycle research*. 2:165-173.
- 145 Fan, S., J.K. Chang, M.L. Smith, D. Duba, A.J. Fornace, Jr., and P.M. O'Connor. 1997. Cells lacking CIP1/WAF1 genes exhibit preferential sensitivity to cisplatin and nitrogen mustard. *Oncogene*. 14:2127-2136.
- 146 Strumberg, D., A.A. Pilon, M. Smith, R. Hickley, L. Malkas, and Y. Pommier. 2000. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Molecular and cellular biology*. 20:3977-3987.
- 147 Pommier, Y., J.M. Barcelo, V.A. Rao, O. Sordet, A.G. Jobson, L. Thibaut, Z.H. Miao, J.A. Seiler, H. Zhang, C. Marchand, K. Agama, J.L. Nitiss, and C. Redon. 2006. Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 81:179-229.
- 148 Furuta, T., H. Takemura, Z.Y. Liao, G.J. Aune, C. Redon, O.A. Sedelnikova, D.R. Pilch, E.P. Rogakou, A. Celeste, H.T. Chen, A. Nussenzweig, M.I. Aladjem, W.M. Bonner, and Y. Pommier. 2003. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *The Journal of biological chemistry*. 278:20303-20312.
- 149 Sordet, O., Q.A. Khan, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 2003. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*. 3:271-290.
- 150 Huang, T.H., H.C. Chen, S.M. Chou, Y.C. Yang, J.R. Fan, and T.K. Li. 2010. Cellular processing determinants for the activation of damage signals in response to topoisomerase I-linked DNA breakage. *Cell research*. 20:1060-1075.
- 151 Lin, C.P., Y. Ban, Y.L. Lyu, S.D. Desai, and L.F. Liu. 2008. A ubiquitin-proteasome pathway for the repair of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *The Journal of biological chemistry*. 283:21074-21083.
- 152 Sordet, O., C.E. Redon, J. Guirouilh-Barbat, S. Smith, S. Solier, C. Douarre, C. Conti, A.J. Nakamura, B.B. Das, E. Nicolas, K.W. Kohn, W.M. Bonner, and Y. Pommier. 2009. Ataxia telangiectasia mutated activation by transcription- and topoisomerase I-induced DNA double-strand breaks. *EMBO reports*. 10:887-893.
- 153 Flatten, K., N.T. Dai, B.T. Vroman, D. Loefering, C. Erlichman, L.M. Karnitz, and S.H. Kaufmann. 2005. The role of checkpoint kinase 1 in sensitivity to topoisomerase I poisons. *The Journal of biological chemistry*. 280:14349-14355.
- 154 Lee, M., S. Young Kim, J. Kim, H.S. Kim, S.M. Kim, and E.J. Kim. 2013. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibition and sustained extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in camptothecin-induced human colon cancer cell death. *Cancer biology & therapy*. 14:1007-1015.
- 155 Lee, S., H.S. Lee, M. Baek, D.Y. Lee, Y.J. Bang, H.N. Cho, Y.S. Lee, J.H. Ha, H.Y. Kim, and D.I. Jeoung. 2002. MAPK signaling is involved in camptothecin-induced cell death. *Molecules and cells*. 14:348-354.
- 156 Galan, A., L. Garcia-Bermejo, N.E. Vilaboa, E. de Blas, and P. Aller. 2000. Uncoupling of apoptosis and Jun/AP-1 activity in human promonocytic cells treated with DNA-damaging and stress-inducing agents. *European journal of cell biology*. 79:1-9.
- 157 Ray, R.M., S. Jin, M.N. Bavaria, and L.R. Johnson. 2011. Regulation of JNK activity in the apoptotic response of intestinal epithelial cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 300:G761-770.
- 158 Bhattacharya, S., R.M. Ray, and L.R. Johnson. 2009. Role of polyamines in p53-dependent apoptosis of intestinal epithelial cells. *Cellular signalling*. 21:509-522.
- 159 Zhang, C., S. Chen, J. Bao, Y. Zhang, B. Huang, X. Jia, M. Chen, J.B. Wan, H. Su, Y. Wang, and C. He. 2015. Low Doses of Camptothecin Induced Hormetic and Neuroprotective Effects in PC12 Cells. Dose-response : a publication of International Hormesis Society. 13:1559325815592606.
- 160 Jayasooriya, R.G., S.R. Park, Y.H. Choi, J.W. Hyun, W.Y. Chang, and G.Y. Kim. 2015. Camptothecin suppresses expression of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in DU145 cells through PI3K/Akt-mediated inhibition of NF-kappaB activity and Nrf2-dependent induction of HO-1 expression. *Environmental toxicology and pharmacology*. 39:1189-1198.
- 161 Zhou, Y., F.G. Gwadry, W.C. Reinhold, L.D. Miller, L.H. Smith, U. Scherf, E.T. Liu, K.W. Kohn, Y. Pommier, and J.N. Weinstein. 2002. Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects. *Cancer research*. 62:1688-1695.

- 162 Xiao, Z., Z. Chen, A.H. Gunasekera, T.J. Sowin, S.H. Rosenberg, S. Fesik, and H. Zhang. 2003. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *The Journal of biological chemistry*. 278:21767-21773.
- 163 Yin, M.B., G. Hapke, J. Wu, R.G. Azrak, C. Frank, C. Wrzosek, and Y.M. Rustum. 2002. Chk1 signaling pathways that mediated G(2)M checkpoint in relation to the cellular resistance to the novel topoisomerase I poison BNP1350. *Biochemical and biophysical research communications*. 295:435-444.
- 164 Hapke, G., M.B. Yin, J. Wu, C. Frank, and Y.M. Rustum. 2002. Phosphorylation of chk1 at serine-345 affected by topoisomerase I poison SN-38. *International journal of oncology*. 21:1059-1066.
- 165 Cliby, W.A., K.A. Lewis, K.K. Lilly, and S.H. Kaufmann. 2002. S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function. *The Journal of biological chemistry*. 277:1599-1606.
- 166 Visintin, R., and A. Amon. 2000. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Current opinion in cell biology*. 12:752.
- 167 Guarente, L. 1997. Link between aging and the nucleolus. *Genes & development*. 11:2449-2455.
- 168 Kriehoff, E., K. Milovic-Holm, and T.G. Hofmann. 2007. FLASH meets nuclear bodies: CD95 receptor signals via a nuclear pathway. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 6:771-775.
- 169 Olson, M.O. 2004. Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2004:pe10.
- 170 Mayer, C., and I. Grummt. 2005. Cellular stress and nucleolar function. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 4:1036-1038.
- 171 Larsen, D.H., and M. Stucki. 2016. Nucleolar responses to DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*. 44:538-544.
- 172 Shav-Tal, Y., J. Blechman, X. Darzacq, C. Montagna, B.T. Dye, J.G. Patton, R.H. Singer, and D. Zipori. 2005. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Molecular biology of the cell*. 16:2395-2413.
- 173 David-Pfeuty, T. 1999. Potent inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 induce nuclear accumulation of wild-type p53 and nucleolar fragmentation in human untransformed and tumor-derived cells. *Oncogene*. 18:7409-7422.
- 174 Haaf, T., and D.C. Ward. 1996. Inhibition of RNA polymerase II transcription causes chromatin decondensation, loss of nucleolar structure, and dispersion of chromosomal domains. *Experimental cell research*. 224:163-173.
- 175 Andersen, J.S., Y.W. Lam, A.K. Leung, S.E. Ong, C.E. Lyon, A.I. Lamond, and M. Mann. 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature*. 433:77-83.
- 176 Bertwistle, D., M. Sugimoto, and C.J. Sherr. 2004. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Molecular and cellular biology*. 24:985-996.
- 177 Wsierska-Gadek, J., and M. Horvay. 2003. How the nucleolar sequestration of p53 protein or its interplayers contributes to its (re)-activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1010:266-272.
- 178 Rubbi, C.P., and J. Milner. 2003. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *The EMBO journal*. 22:6068-6077.
- 179 Larsen, D.H., F. Hari, J.A. Clapperton, M. Gwerder, K. Gutsche, M. Altmeyer, S. Jungmichel, L.I. Toledo, D. Fink, M.B. Rask, M. Grofte, C. Lukas, M.L. Nielsen, S.J. Smerdon, J. Lukas, and M. Stucki. 2014. The NBS1-Treacle complex controls ribosomal RNA transcription in response to DNA damage. *Nature cell biology*. 16:792-803.
- 180 Boisvert, F.M., S. van Koningsbruggen, J. Navascues, and A.I. Lamond. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:574-585.
- 181 Misteli, T., J.F. Caceres, and D.L. Spector. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*. 387:523-527.
- 182 O'Keefe, R.T., A. Mayeda, C.L. Sadowski, A.R. Krainer, and D.L. Spector. 1994. Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors. *The Journal of cell biology*. 124:249-260.
- 183 Cioce, M., S. Boulon, A.G. Matera, and A.I. Lamond. 2006. UV-induced fragmentation of Cajal bodies. *The Journal of cell biology*. 175:401-413.
- 184 Anderson, P., N. Kedersha, and P. Ivanov. 2015. Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 1849:861-870.
- 185 Biamonti, G., and C. Vourc'h. 2010. Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a000695.
- 186 Berget, S.M., C. Moore, and P.A. Sharp. 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74:3171-3175.

- 187 Chow, L.T., R.E. Gelinas, T.R. Broker, and R.J. Roberts. 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*. 12:1-8.
- 188 Kramer, A. 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annual review of biochemistry*. 65:367-409.
- 189 Yeo, G., S. Hoon, B. Venkatesh, and C.B. Burge. 2004. Variation in sequence and organization of splicing regulatory elements in vertebrate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:15700-15705.
- 190 Valadkhan, S., and J.L. Manley. 2001. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature*. 413:701-707.
- 191 Fabrizio, P., and R. Luhrmann. 2012. The Spliceosome in Constitutive Splicing. In *Alternative pre-mRNA Splicing: Theory and Protocols*. S. Stamm, C. Smith, and R. Luhrmann, editors. Wiley-Blackwell.
- 192 Gilbert, W. 1978. Why genes in pieces? *Nature*. 271:501.
- 193 Resch, A., Y. Xing, B. Modrek, M. Gorlick, R. Riley, and C. Lee. 2004. Assessing the impact of alternative splicing on domain interactions in the human proteome. *Journal of proteome research*. 3:76-83.
- 194 Lewis, B.P., R.E. Green, and S.E. Brenner. 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:189-192.
- 195 Stamm, S., J. Zhu, K. Nakai, P. Stoilov, O. Stoss, and M.Q. Zhang. 2000. An alternative-exon database and its statistical analysis. *DNA and cell biology*. 19:739-756.
- 196 Romero, P.R., S. Zaidi, Y.Y. Fang, V.N. Uversky, P. Radivojac, C.J. Oldfield, M.S. Cortese, M. Sickmeier, T. LeGall, Z. Obradovic, and A.K. Dunker. 2006. Alternative splicing in concert with protein intrinsic disorder enables increased functional diversity in multicellular organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:8390-8395.
- 197 Wang, P., B. Yan, J.T. Guo, C. Hicks, and Y. Xu. 2005. Structural genomics analysis of alternative splicing and application to isoform structure modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:18920-18925.
- 198 Kim, E., A. Magen, and G. Ast. 2007. Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic acids research*. 35:125-131.
- 199 Kelemen, O., P. Convertini, Z. Zhang, Y. Wen, M. Shen, M. Falaleeva, and S. Stamm. 2013. Function of alternative splicing. *Gene*. 514:1-30.
- 200 Hull, J., S. Campino, K. Rowlands, M.S. Chan, R.R. Copley, M.S. Taylor, K. Rockett, G. Elvidge, B. Keating, J. Knight, and D. Kwiatkowski. 2007. Identification of common genetic variation that modulates alternative splicing. *PLoS genetics*. 3:e99.
- 201 Kan, Z., P.W. Garrett-Engele, J.M. Johnson, and J.C. Castle. 2005. Evolutionarily conserved and diverged alternative splicing events show different expression and functional profiles. *Nucleic acids research*. 33:5659-5666.
- 202 Stamm, S., S. Ben-Ari, I. Rafalska, Y. Tang, Z. Zhang, D. Toiber, T.A. Thanaraj, and H. Soreq. 2005. Function of alternative splicing. *Gene*. 344:1-20.
- 203 Garg, K., and P. Green. 2007. Differing patterns of selection in alternative and constitutive splice sites. *Genome research*. 17:1015-1022.
- 204 Barash, Y., J.A. Calarco, W. Gao, Q. Pan, X. Wang, O. Shai, B.J. Blencowe, and B.J. Frey. 2010. Deciphering the splicing code. *Nature*. 465:53-59.
- 205 Watakabe, A., K. Tanaka, and Y. Shimura. 1993. The role of exon sequences in splice site selection. *Genes & development*. 7:407-418.
- 206 Black, D.L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry*. 72:291-336.
- 207 Schaal, T.D., and T. Maniatis. 1999. Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA. *Molecular and cellular biology*. 19:261-273.
- 208 Schaal, T.D., and T. Maniatis. 1999. Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Molecular and cellular biology*. 19:1705-1719.
- 209 Zhang, X.H., T. Kangsamaksin, M.S. Chao, J.K. Banerjee, and L.A. Chasin. 2005. Exon inclusion is dependent on predictable exonic splicing enhancers. *Molecular and cellular biology*. 25:7323-7332.
- 210 Liu, H.X., M. Zhang, and A.R. Krainer. 1998. Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes & development*. 12:1998-2012.

- 211 Tacke, R., and J.L. Manley. 1999. Determinants of SR protein specificity. *Current opinion in cell biology*. 11:358-362.
- 212 Caceres, E.F., and L.D. Hurst. 2013. The evolution, impact and properties of exonic splice enhancers. *Genome biology*. 14:R143.
- 213 Cartegni, L., and A.R. Krainer. 2002. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nature genetics*. 30:377-384.
- 214 Cartegni, L., S.L. Chew, and A.R. Krainer. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature reviews. Genetics*. 3:285-298.
- 215 Burd, C.G., and G. Dreyfuss. 1994. RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *The EMBO journal*. 13:1197-1204.
- 216 Hastings, M.L., C.M. Wilson, and S.H. Munroe. 2001. A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA. *Rna*. 7:859-874.
- 217 Gallego, M.E., R. Gattoni, J. Stevenin, J. Marie, and A. Expert-Bezancon. 1997. The SR splicing factors ASF/SF2 and SC35 have antagonistic effects on intronic enhancer-dependent splicing of the beta-tropomyosin alternative exon 6A. *The EMBO journal*. 16:1772-1784.
- 218 Forch, P., O. Puig, N. Kedersha, C. Martinez, S. Granneman, B. Seraphin, P. Anderson, and J. Valcarcel. 2000. The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing. *Molecular cell*. 6:1089-1098.
- 219 Ladd, A.N., N. Charlet, and T.A. Cooper. 2001. The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Molecular and cellular biology*. 21:1285-1296.
- 220 Huh, G.S., and R.O. Hynes. 1994. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by a novel repeated hexanucleotide element. *Genes & development*. 8:1561-1574.
- 221 Modafferi, E.F., and D.L. Black. 1997. A complex intronic splicing enhancer from the c-src pre-mRNA activates inclusion of a heterologous exon. *Molecular and cellular biology*. 17:6537-6545.
- 222 Lim, L.P., and P.A. Sharp. 1998. Alternative splicing of the fibronectin EIIIB exon depends on specific TGCATG repeats. *Molecular and cellular biology*. 18:3900-3906.
- 223 Patton, J.G., S.A. Mayer, P. Tempst, and B. Nadal-Ginard. 1991. Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. *Genes & development*. 5:1237-1251.
- 224 Garcia-Blanco, M.A., S.F. Jamison, and P.A. Sharp. 1989. Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes & development*. 3:1874-1886.
- 225 Gil, A., P.A. Sharp, S.F. Jamison, and M.A. Garcia-Blanco. 1991. Characterization of cDNAs encoding the polypyrimidine tract-binding protein. *Genes & development*. 5:1224-1236.
- 226 Ghetti, A., S. Pinol-Roma, W.M. Michael, C. Morandi, and G. Dreyfuss. 1992. hnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. *Nucleic acids research*. 20:3671-3678.
- 227 McCullough, A.J., and S.M. Berget. 1997. G triplets located throughout a class of small vertebrate introns enforce intron borders and regulate splice site selection. *Molecular and cellular biology*. 17:4562-4571.
- 228 Dominguez, C., and F.H. Allain. 2006. NMR structure of the three quasi RNA recognition motifs (qRRMs) of human hnRNP F and interaction studies with Bcl-x G-tract RNA: a novel mode of RNA recognition. *Nucleic acids research*. 34:3634-3645.
- 229 Zhou, H.L., A.P. Baraniak, and H. Lou. 2007. Role for Fox-1/Fox-2 in mediating the neuronal pathway of calcitonin/calcitonin gene-related peptide alternative RNA processing. *Molecular and cellular biology*. 27:830-841.
- 230 Warf, M.B., and J.A. Berglund. 2010. Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends in biochemical sciences*. 35:169-178.
- 231 Ray, D., H. Kazan, K.B. Cook, M.T. Weirauch, H.S. Najafabadi, X. Li, S. Gueroussov, M. Albu, H. Zheng, A. Yang, H. Na, M. Irimia, L.H. Matzat, R.K. Dale, S.A. Smith, C.A. Yarosh, S.M. Kelly, B. Nabet, D. Mecnas, W. Li, R.S. Laishram, M. Qiao, H.D. Lipshitz, F. Piano, A.H. Corbett, R.P. Carstens, B.J. Frey, R.A. Anderson, K.W. Lynch, L.O. Penalva, E.P. Lei, A.G. Fraser, B.J. Blencowe, Q.D. Morris, and T.R. Hughes. 2013. A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature*. 499:172-177.
- 232 Sela, N., B. Mersch, N. Gal-Mark, G. Lev-Maor, A. Hotz-Wagenblatt, and G. Ast. 2007. Comparative analysis of transposed element insertion within human and mouse genomes reveals Alu's unique role in shaping the human

- transcriptome. *Genome biology*. 8:R127.
- 233 Batzer, M.A., and P.L. Deininger. 2002. Alu repeats and human genomic diversity. *Nature reviews. Genetics*. 3:370-379.
- 234 Xing, J., D.J. Witherspoon, D.A. Ray, M.A. Batzer, and L.B. Jorde. 2007. Mobile DNA elements in primate and human evolution. *American journal of physical anthropology. Suppl* 45:2-19.
- 235 Athanasiadis, A., A. Rich, and S. Maas. 2004. Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome. *PLoS biology*. 2:e391.
- 236 Morse, D.P., P.J. Aruscavage, and B.L. Bass. 2002. RNA hairpins in noncoding regions of human brain and *Caenorhabditis elegans* mRNA are edited by adenosine deaminases that act on RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:7906-7911.
- 237 Lev-Maor, G., O. Ram, E. Kim, N. Sela, A. Goren, E.Y. Levanon, and G. Ast. 2008. Intronic Alus influence alternative splicing. *PLoS genetics*. 4:e1000204.
- 238 Zarnack, K., J. Konig, M. Tajnik, I. Martincorena, S. Eustermann, I. Stevant, A. Reyes, S. Anders, N.M. Luscombe, and J. Ule. 2013. Direct competition between hnRNP C and U2AF65 protects the transcriptome from the exonization of Alu elements. *Cell*. 152:453-466.
- 239 Lei, H., and I. Vorechovsky. 2005. Identification of splicing silencers and enhancers in sense Alus: a role for pseudoacceptors in splice site repression. *Molecular and cellular biology*. 25:6912-6920.
- 240 Pastor, T., G. Talotti, M.A. Lewandowska, and F. Pagani. 2009. An Alu-derived intronic splicing enhancer facilitates intronic processing and modulates aberrant splicing in ATM. *Nucleic acids research*. 37:7258-7267.
- 241 Wahl, M.C., C.L. Will, and R. Luhrmann. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 136:701-718.
- 242 Graveley, B.R. 2000. Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna*. 6:1197-1211.
- 243 Thandapani, P., T.R. O'Connor, T.L. Bailey, and S. Richard. 2013. Defining the RGG/RG motif. *Molecular cell*. 50:613-623.
- 244 Fu, X.D. 1995. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *Rna*. 1:663-680.
- 245 Wu, J.Y., and T. Maniatis. 1993. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell*. 75:1061-1070.
- 246 Shen, H., J.L. Kan, and M.R. Green. 2004. Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Molecular cell*. 13:367-376.
- 247 Shen, H., and M.R. Green. 2004. A pathway of sequential arginine-serine-rich domain-splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly. *Molecular cell*. 16:363-373.
- 248 Ge, H., P. Zuo, and J.L. Manley. 1991. Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators. *Cell*. 66:373-382.
- 249 Ge, H., and J.L. Manley. 1990. A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell*. 62:25-34.
- 250 Krainer, A.R., A. Mayeda, D. Kozak, and G. Binns. 1991. Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and *Drosophila* splicing regulators. *Cell*. 66:383-394.
- 251 Krainer, A.R., G.C. Conway, and D. Kozak. 1990. The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell*. 62:35-42.
- 252 Fu, X.D., and T. Maniatis. 1992. The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:1725-1729.
- 253 Zahler, A.M., K.M. Neugebauer, W.S. Lane, and M.B. Roth. 1993. Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Science*. 260:219-222.
- 254 Cavaloc, Y., M. Popielarz, J.P. Fuchs, R. Gattoni, and J. Stevenin. 1994. Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: a novel 35 kDa factor of the serine/arginine protein family. *The EMBO journal*. 13:2639-2649.
- 255 Reed, R., and T. Maniatis. 1986. A role for exon sequences and splice-site proximity in splice-site selection. *Cell*. 46:681-690.
- 256 Mayeda, A., and A.R. Krainer. 1992. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell*. 68:365-375.
- 257 Eperon, I.C., O.V. Makarova, A. Mayeda, S.H. Munroe, J.F. Caceres, D.G. Hayward, and A.R. Krainer. 2000. Selection of alternative 5' splice sites: role of U1 snRNP and models for the antagonistic effects of SF2/ASF and hnRNP A1.

- Molecular and cellular biology. 20:8303-8318.
- 258 Lin, S., and X.D. Fu. 2007. SR proteins and related factors in alternative splicing. *Advances in experimental medicine and biology*. 623:107-122.
- 259 Pandit, S., Y. Zhou, L. Shiue, G. Coutinho-Mansfield, H. Li, J. Qiu, J. Huang, G.W. Yeo, M. Ares, Jr., and X.D. Fu. 2013. Genome-wide analysis reveals SR protein cooperation and competition in regulated splicing. *Molecular cell*. 50:223-235.
- 260 Han, L., I.G. Lin, and C.L. Hsieh. 2001. Protein binding protects sites on stable episomes and in the chromosome from de novo methylation. *Molecular and cellular biology*. 21:3416-3424.
- 261 Sanford, J.R., X. Wang, M. Mort, N. Vanduy, D.N. Cooper, S.D. Mooney, H.J. Edenberg, and Y. Liu. 2009. Splicing factor SFRS1 recognizes a functionally diverse landscape of RNA transcripts. *Genome research*. 19:381-394.
- 262 Boucher, L., C.A. Ouzounis, A.J. Enright, and B.J. Blencowe. 2001. A genome-wide survey of RS domain proteins. *Rna*. 7:1693-1701.
- 263 Pinol-Roma, S., Y.D. Choi, M.J. Matunis, and G. Dreyfuss. 1988. Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes & development*. 2:215-227.
- 264 Krecic, A.M., and M.S. Swanson. 1999. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Current opinion in cell biology*. 11:363-371.
- 265 Han, N., W. Li, and M. Zhang. 2013. The function of the RNA-binding protein hnRNP in cancer metastasis. *Journal of cancer research and therapeutics*. 9 Suppl:S129-134.
- 266 Martinez-Contreras, R., P. Cloutier, L. Shkreta, J.F. Fiset, T. Revil, and B. Chabot. 2007. hnRNP proteins and splicing control. *Advances in experimental medicine and biology*. 623:123-147.
- 267 Dreyfuss, G., M.J. Matunis, S. Pinol-Roma, and C.G. Burd. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annual review of biochemistry*. 62:289-321.
- 268 Caputi, M., and A.M. Zahler. 2001. Determination of the RNA binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/H'/F/2H9 family. *The Journal of biological chemistry*. 276:43850-43859.
- 269 Hutchison, S., C. LeBel, M. Blanchette, and B. Chabot. 2002. Distinct sets of adjacent heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1/A2 binding sites control 5' splice site selection in the hnRNP A1 mRNA precursor. *The Journal of biological chemistry*. 277:29745-29752.
- 270 Jacquenet, S., A. Mereau, P.S. Bilodeau, L. Damier, C.M. Stoltzfus, and C. Branlant. 2001. A second exon splicing silencer within human immunodeficiency virus type 1 tat exon 2 represses splicing of Tat mRNA and binds protein hnRNP H. *The Journal of biological chemistry*. 276:40464-40475.
- 271 Buratti, E., M. Baralle, L. De Conti, D. Baralle, M. Romano, Y.M. Ayala, and F.E. Baralle. 2004. hnRNP H binding at the 5' splice site correlates with the pathological effect of two intronic mutations in the NF-1 and TSHbeta genes. *Nucleic acids research*. 32:4224-4236.
- 272 Lin, C.H., and J.G. Patton. 1995. Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors. *Rna*. 1:234-245.
- 273 Domsic, J.K., Y. Wang, A. Mayeda, A.R. Krainer, and C.M. Stoltzfus. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 hnRNP A/B-dependent exonic splicing silencer ESSV antagonizes binding of U2AF65 to viral polypyrimidine tracts. *Molecular and cellular biology*. 23:8762-8772.
- 274 Venables, J.P., C.F. Bourgeois, C. Dalgliesh, L. Kister, J. Stevenin, and D.J. Elliott. 2005. Up-regulation of the ubiquitous alternative splicing factor Tra2beta causes inclusion of a germ cell-specific exon. *Human molecular genetics*. 14:2289-2303.
- 275 Kashima, T., and J.L. Manley. 2003. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nature genetics*. 34:460-463.
- 276 Cartegni, L., M.L. Hastings, J.A. Calarco, E. de Stanchina, and A.R. Krainer. 2006. Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *American journal of human genetics*. 78:63-77.
- 277 Zhu, J., A. Mayeda, and A.R. Krainer. 2001. Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Molecular cell*. 8:1351-1361.
- 278 Mayeda, A., S.H. Munroe, J.F. Caceres, and A.R. Krainer. 1994. Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins. *The EMBO journal*. 13:5483-5495.
- 279 Mikula, M., A. Dzwonek, J. Karczmarski, T. Rubel, M. Dadlez, L.S. Wyrwicz, K. Bomsztyk, and J. Ostrowski. 2006. Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome. *Proteomics*. 6:2395-2406.
- 280 Bomsztyk, K., O. Denisenko, and J. Os-

- trowski. 2004. hnRNP K: one protein multiple processes. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 26:629-638.
- 281 Romano, M., R. Marcucci, E. Buratti, Y.M. Ayala, G. Sebastio, and F.E. Baralle. 2002. Regulation of 3' splice site selection in the 844ins68 polymorphism of the cystathionine Beta -synthase gene. *The Journal of biological chemistry*. 277:43821-43829.
- 282 House, A.E., and K.W. Lynch. 2006. An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition. *Nature structural & molecular biology*. 13:937-944.
- 283 Chabot, B., C. LeBel, S. Hutchison, F.H. Nasim, and M.J. Simard. 2003. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle A/B proteins and the control of alternative splicing of the mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle A1 pre-mRNA. *Progress in molecular and subcellular biology*. 31:59-88.
- 284 Hanamura, A., J.F. Caceres, A. Mayeda, B.R. Franza, Jr., and A.R. Krainer. 1998. Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *Rna*. 4:430-444.
- 285 Du, K., J.I. Leu, Y. Peng, and R. Taub. 1998. Transcriptional up-regulation of the delayed early gene HRS/SRp40 during liver regeneration. Interactions among YY1, GA-binding proteins, and mitogenic signals. *The Journal of biological chemistry*. 273:35208-35215.
- 286 Shinozaki, A., K. Arahata, and T. Tsukahara. 1999. Changes in pre-mRNA splicing factors during neural differentiation in P19 embryonal carcinoma cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 31:1279-1287.
- 287 Jumaa, H., J.L. Guenet, and P.J. Nielsen. 1997. Regulated expression and RNA processing of transcripts from the *Srp20* splicing factor gene during the cell cycle. *Molecular and cellular biology*. 17:3116-3124.
- 288 Chiu, Y., and P. Ouyang. 2006. Loss of Pnn expression attenuates expression levels of SR family splicing factors and modulates alternative pre-mRNA splicing in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 341:663-671.
- 289 Chen, M., and J.L. Manley. 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:741-754.
- 290 Uematsu, F., M. Takahashi, M. Yoshida, M. Igarashi, N. Watanabe, N. Suzuki, M. Abe, I. Rusyn, R.A. Floyd, and D. Nakae. 2005. Distinct patterns of gene expression in hepatocellular carcinomas and adjacent non-cancerous, cirrhotic liver tissues in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Cancer science*. 96:414-424.
- 291 Sreaton, G.R., J.F. Caceres, A. Mayeda, M.V. Bell, M. Plebanski, D.G. Jackson, J.I. Bell, and A.R. Krainer. 1995. Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors. *The EMBO journal*. 14:4336-4349.
- 292 Katiyar, S., X. Jiao, S. Addya, A. Ertel, Y. Covarrubias, V. Rose, M.C. Casimiro, J. Zhou, M.P. Lisanti, T. Nasim, P. Fortina, and R.G. Pestell. 2012. Mammary gland selective excision of c-jun identifies its role in mRNA splicing. *Cancer research*. 72:1023-1034.
- 293 Liu, Q., and G. Dreyfuss. 1995. In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. *Molecular and cellular biology*. 15:2800-2808.
- 294 Herrmann, F., M. Bossert, A. Schwander, E. Akgun, and F.O. Fackelmayer. 2004. Arginine methylation of scaffold attachment factor A by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle-associated PRMT1. *The Journal of biological chemistry*. 279:48774-48779.
- 295 Ostareck-Lederer, A., D.H. Ostareck, K.P. Rucknagel, A. Schierhorn, B. Moritz, S. Huttelmaier, N. Flach, L. Handoko, and E. Wahle. 2006. Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *The Journal of biological chemistry*. 281:11115-11125.
- 296 Nichols, R.C., X.W. Wang, J. Tang, B.J. Hamilton, F.A. High, H.R. Herschman, and W.F. Rigby. 2000. The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization. *Experimental cell research*. 256:522-532.
- 297 Sinha, R., E. Allemand, Z. Zhang, R. Karni, M.P. Myers, and A.R. Krainer. 2010. Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF. *Molecular and cellular biology*. 30:2762-2774.
- 298 Vassileva, M.T., and M.J. Matunis. 2004. SUMO modification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Molecular and cellular biology*. 24:3623-3632.
- 299 Li, T., E. Evdokimov, R.F. Shen, C.C. Chao, E. Tekle, T. Wang, E.R. Stadtman, D.C. Yang, and P.B. Chock. 2004. Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: a proteomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America. 101:8551-8556.
- 300 Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnad, M.L. Nielsen, M. Rehman, T.C. Walther, J.V. Olsen, and M. Mann. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 325:834-840.
- 301 Edmond, V., E. Moysan, S. Khochbin, P. Matthias, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Gazzeri, and B. Eymin. 2011. Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *The EMBO journal*. 30:510-523.
- 302 Stamm, S. 2008. Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 283:1223-1227.
- 303 Cao, W., S.F. Jamison, and M.A. Garcia-Blanco. 1997. Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *Rna*. 3:1456-1467.
- 304 Xiao, S.H., and J.L. Manley. 1997. Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes & development*. 11:334-344.
- 305 Mermoud, J.E., P. Cohen, and A.I. Lamond. 1992. Ser/Thr-specific protein phosphatases are required for both catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nucleic acids research*. 20:5263-5269.
- 306 Velazquez-Dones, A., J.C. Hagopian, C.T. Ma, X.Y. Zhong, H. Zhou, G. Ghosh, X.D. Fu, and J.A. Adams. 2005. Mass spectrometric and kinetic analysis of ASF/SF2 phosphorylation by SRPK1 and Clk/Sty. *The Journal of biological chemistry*. 280:41761-41768.
- 307 Shin, C., Y. Feng, and J.L. Manley. 2004. Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature*. 427:553-558.
- 308 Shen, H., and M.R. Green. 2006. RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through humans. *Genes & development*. 20:1755-1765.
- 309 Huang, Y., and J.A. Steitz. 2005. SRprises along a messenger's journey. *Molecular cell*. 17:613-615.
- 310 Pinol-Roma, S., and G. Dreyfuss. 1992. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature*. 355:730-732.
- 311 Michael, W.M., M. Choi, and G. Dreyfuss. 1995. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell*. 83:415-422.
- 312 Paronetto, M.P., F. Zalfa, F. Botti, R. Geremia, C. Bagni, and C. Sette. 2006. The nuclear RNA-binding protein Sam68 translocates to the cytoplasm and associates with the polyosomes in mouse spermatocytes. *Molecular biology of the cell*. 17:14-24.
- 313 van der Houven van Oordt, W., M.T. Diaz-Meco, J. Lozano, A.R. Krainer, J. Moscat, and J.F. Caceres. 2000. The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *The Journal of cell biology*. 149:307-316.
- 314 Habelhah, H., K. Shah, L. Huang, A. Ostareck-Lederer, A.L. Burlingame, K.M. Shokat, M.W. Hentze, and Z. Ronai. 2001. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nature cell biology*. 3:325-330.
- 315 Shimada, N., I. Rios, H. Moran, B. Sayers, and K. Hubbard. 2009. p38 MAP kinase-dependent regulation of the expression level and subcellular distribution of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and its involvement in cellular senescence in normal human fibroblasts. *RNA biology*. 6:293-304.
- 316 Vivarelli, S., S.C. Lenzken, M.D. Ruepp, F. Ranzini, A. Maffioletti, R. Alvarez, O. Muhlemann, and S.M. Barabino. 2013. Paraquat Modulates Alternative Pre-mRNA Splicing by Modifying the Intracellular Distribution of SRPK2. *PLoS one*. 8:e61980.
- 317 Leemann-Zakaryan, R.P., S. Pahlich, D. Grossebacher, and H. Gehring. 2011. Tyrosine Phosphorylation in the C-Terminal Nuclear Localization and Retention Signal (C-NLS) of the EWS Protein. *Sarcoma*. 2011:218483.
- 318 Hartmann, A.M., D. Rujescu, T. Giannakouros, E. Nikolakaki, M. Goedert, E.M. Mandelkow, Q.S. Gao, A. Andreadis, and S. Stamm. 2001. Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors. *Molecular and cellular neurosciences*. 18:80-90.
- 319 Nayler, O., F. Schnorrer, S. Stamm, and A. Ullrich. 1998. The cellular localization of the murine serine/arginine-rich protein kinase CLK2 is regulated by serine 141 autophosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 273:34341-34348.
- 320 Vu, N.T., M.A. Park, J.C. Shultz, R.W. Goehe, L.A. Hoferlin, M.D. Shultz, S.A. Smith, K.W. Lynch, and C.E. Chalfant. 2013. hnRNP U enhances caspase-9 splicing and is modulated by AKT-dependent phosphorylation of hnRNP L. *The Journal of biological chemistry*.

- 321 Kuyumcu-Martinez, N.M., G.S. Wang, and T.A. Cooper. 2007. Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Molecular cell*. 28:68-78.
- 322 Ninomiya, K., N. Kataoka, and M. Hagiwara. 2011. Stress-responsive maturation of Clk1/4 pre-mRNAs promotes phosphorylation of SR splicing factor. *The Journal of cell biology*. 195:27-40.
- 323 Ghosh, G., and J.A. Adams. 2011. Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *The FEBS journal*. 278:587-597.
- 324 Zhou, Z., J. Qiu, W. Liu, Y. Zhou, R.M. Plocinik, H. Li, Q. Hu, G. Ghosh, J.A. Adams, M.G. Rosenfeld, and X.D. Fu. 2012. The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. *Molecular cell*. 47:422-433.
- 325 Misteli, T., and D.L. Spector. 1996. Serine/threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors. *Molecular biology of the cell*. 7:1559-1572.
- 326 Shi, Y., B. Reddy, and J.L. Manley. 2006. PP1/PP2A phosphatases are required for the second step of Pre-mRNA splicing and target specific snRNP proteins. *Molecular cell*. 23:819-829.
- 327 Bedford, M.T., and S. Richard. 2005. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Molecular cell*. 18:263-272.
- 328 Lynch, K.W. 2007. Regulation of alternative splicing by signal transduction pathways. *Advances in experimental medicine and biology*. 623:161-174.
- 329 Lukong, K.E., and S. Richard. 2003. Sam68, the KH domain-containing superSTAR. *Biochimica et biophysica acta*. 1653:73-86.
- 330 Najib, S., C. Martin-Romero, C. Gonzalez-Yanes, and V. Sanchez-Margalet. 2005. Role of Sam68 as an adaptor protein in signal transduction. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 62:36-43.
- 331 Batsche, E., M. Yaniv, and C. Muchardt. 2006. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nature structural & molecular biology*. 13:22-29.
- 332 Fumagalli, S., N.F. Totty, J.J. Hsuan, and S.A. Courtneidge. 1994. A target for Src in mitosis. *Nature*. 368:871-874.
- 333 Taylor, S.J., and D. Shalloway. 1994. An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature*. 368:867-871.
- 334 Taylor, S.J., R.J. Resnick, and D. Shalloway. 2004. Sam68 exerts separable effects on cell cycle progression and apoptosis. *BMC cell biology*. 5:5.
- 335 Matter, N., P. Herrlich, and H. Konig. 2002. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature*. 420:691-695.
- 336 Kim, J.H., B. Hahm, Y.K. Kim, M. Choi, and S.K. Jang. 2000. Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *Journal of molecular biology*. 298:395-405.
- 337 Shnyreva, M., D.S. Schullery, H. Suzuki, Y. Higaki, and K. Bomsztyk. 2000. Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. *The Journal of biological chemistry*. 275:15498-15503.
- 338 Ostrowski, J., Y. Kawata, D.S. Schullery, O.N. Denisenko, Y. Higaki, C.K. Abrass, and K. Bomsztyk. 2001. Insulin alters heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein binding to DNA and RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:9044-9049.
- 339 Ostrowski, J., D.S. Schullery, O.N. Denisenko, Y. Higaki, J. Watts, R. Aebersold, L. Stempka, M. Gschwendt, and K. Bomsztyk. 2000. Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogenous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners. *The Journal of biological chemistry*. 275:3619-3628.
- 340 Cooper, D.R., J.E. Watson, N. Patel, P. Illingworth, M. Acevedo-Duncan, J. Goodnight, C.E. Chalfant, and H. Mischak. 1999. Ectopic expression of protein kinase Cbetall, -delta, and -epsilon, but not -beta or -zeta, provide for insulin stimulation of glucose uptake in NIH-3T3 cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 372:69-79.
- 341 Hermiston, M.L., Z. Xu, R. Majeti, and A. Weiss. 2002. Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *The Journal of clinical investigation*. 109:9-14.
- 342 Carroll, R.C., and R.S. Zukin. 2002. NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in neurosciences*. 25:571-577.
- 343 Cheng, C., M.B. Yaffe, and P.A. Sharp. 2006. A positive feedback loop couples Ras activation and CD44 alternative splicing. *Genes &*

- development. 20:1715-1720.
- 344 Rauch, J., K. Moran-Jones, V. Albrecht, T. Schwarzl, K. Hunter, O. Gires, and W. Kolch. 2011. c-Myc regulates RNA splicing of the A-Raf kinase and its activation of the ERK pathway. *Cancer research*. 71:4664-4674.
- 345 Katzenberger, R.J., M.S. Marengo, and D.A. Wassarman. 2006. ATM and ATR pathways signal alternative splicing of *Drosophila* TAF1 pre-mRNA in response to DNA damage. *Molecular and cellular biology*. 26:9256-9267.
- 346 Katzenberger, R.J., M.S. Marengo, and D.A. Wassarman. 2009. Control of alternative splicing by signal-dependent degradation of splicing-regulatory proteins. *The Journal of biological chemistry*. 284:10737-10746.
- 347 Gilbert, N., S. Gilchrist, and W.A. Bickmore. 2005. Chromatin organization in the mammalian nucleus. *International review of cytology*. 242:283-
- 348 Taddei, A., and S.M. Gasser. 2004. Multiple pathways for telomere tethering: functional implications of subnuclear position for heterochromatin formation. *Biochimica et biophysica acta*. 1677:120-128.
- 349 Iborra, F.J., A. Pombo, D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1996. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription «factories» in human nuclei. *Journal of cell science*. 109 (Pt 6):1427-1436.
- 350 Jackson, D.A., F.J. Iborra, E.M. Manders, and P.R. Cook. 1998. Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Molecular biology of the cell*. 9:1523-1536.
- 351 Osborne, C.S., L. Chakalova, K.E. Brown, D. Carter, A. Horton, E. Debrand, B. Goyenechea, J.A. Mitchell, S. Lopes, W. Reik, and P. Fraser. 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nature genetics*. 36:1065-1071.
- 352 Ling, J.Q., T. Li, J.F. Hu, T.H. Vu, H.L. Chen, X.W. Qiu, A.M. Cherry, and A.R. Hoffman. 2006. CTCF mediates interchromosomal colocalization between *Igf2/H19* and *Wsb1/Nf1*. *Science*. 312:269-272.
- 353 Spilianakis, C.G., M.D. Lalioti, T. Town, G.R. Lee, and R.A. Flavell. 2005. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*. 435:637-645.
- 354 Wieslander, L., G. Bauren, K. Bernholm, W.Q. Jiang, and I. Wetterberg. 1996. Processing of pre-mRNA in polytene nuclei of *Chironomus tentans* salivary gland cells. *Experimental cell research*. 229:240-246.
- 355 Carmo-Fonseca, M., and C. Carvalho. 2007. Nuclear organization and splicing control. *Advances in experimental medicine and biology*. 623:1-13.
- 356 Achsel, T., H. Stark, and R. Luhrmann. 2001. The Sm domain is an ancient RNA-binding motif with oligo(U) specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:3685-3689.
- 357 Kambach, C., S. Walke, R. Young, J.M. Avis, E. de la Fortelle, V.A. Raker, R. Luhrmann, J. Li, and K. Nagai. 1999. Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell*. 96:375-387.
- 358 Stark, H., P. Dube, R. Luhrmann, and B. Kastner. 2001. Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature*. 409:539-542.
- 359 Will, C.L., and R. Luhrmann. 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Current opinion in cell biology*. 13:290-301.
- 360 Filipowicz, W., and V. Pogacic. 2002. Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Current opinion in cell biology*. 14:319-327.
- 361 Sleeman, J.E., and A.I. Lamond. 1999. Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Current biology : CB*. 9:1065-1074.
- 362 Carvalho, T., F. Almeida, A. Calapez, M. Lafarga, M.T. Berciano, and M. Carmo-Fonseca. 1999. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *The Journal of cell biology*. 147:715-728.
- 363 Cioce, M., and A.I. Lamond. 2005. Cajal bodies: a long history of discovery. *Annual review of cell and developmental biology*. 21:105-131.
- 364 Jady, B.E., X. Darzacq, K.E. Tucker, A.G. Matera, E. Bertrand, and T. Kiss. 2003. Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. *The EMBO journal*. 22:1878-1888.
- 365 Nestic, D., G. Tanackovic, and A. Kramer. 2004. A role for Cajal bodies in the final steps of U2 snRNP biogenesis. *Journal of cell science*. 117:4423-4433.
- 366 Kunkel, G.R., R.L. Maser, J.P. Calvet, and T. Pederson. 1986. U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83:8575-8579.
- 367 Jurica, M.S., and M.J. Moore. 2003. Pre-mR-

- NA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular cell*. 12:5-14.
- 368 Ganot, P., B.E. Jady, M.L. Bortolin, X. Darzacq, and T. Kiss. 1999. Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. *Molecular and cellular biology*. 19:6906-6917.
- 369 Schaffert, N., M. Hossbach, R. Heintzmann, T. Achsel, and R. Luhrmann. 2004. RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *The EMBO journal*. 23:3000-3009.
- 370 Thiry, M. 1995. The interchromatin granules. *Histology and histopathology*. 10:1035-1045.
- 371 Spector, D.L. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annual review of cell biology*. 9:265-315.
- 372 Johnson, C., D. Primorac, M. McKinstry, J. McNeil, D. Rowe, and J.B. Lawrence. 2000. Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35 domain. *The Journal of cell biology*. 150:417-432.
- 373 Wei, X., S. Somanathan, J. Samarabandu, and R. Berezney. 1999. Three-dimensional visualization of transcription sites and their association with splicing factor-rich nuclear speckles. *The Journal of cell biology*. 146:543-558.
- 374 Shopland, L.S., C.V. Johnson, M. Byron, J. McNeil, and J.B. Lawrence. 2003. Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods. *The Journal of cell biology*. 162:981-990.
- 375 Brown, J.M., J. Green, R.P. das Neves, H.A. Wallace, A.J. Smith, J. Hughes, N. Gray, S. Taylor, W.G. Wood, D.R. Higgs, F.J. Iborra, and V.J. Buckle. 2008. Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *The Journal of cell biology*. 182:1083-1097.
- 376 Spector, D.L., and A.I. Lamond. 2011. Nuclear speckles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3.
- 377 Lamond, A.I., and D.L. Spector. 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 4:605-612.
- 378 Sacco-Bubulya, P., and D.L. Spector. 2002. Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *The Journal of cell biology*. 156:425-436.
- 379 Caceres, J.F., T. Misteli, G.R. Sreaton, D.L. Spector, and A.R. Krainer. 1997. Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *The Journal of cell biology*. 138:225-238.
- 380 Hedley, M.L., H. Amrein, and T. Maniatis. 1995. An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:11524-11528.
- 381 Li, H., and P.M. Bingham. 1991. Arginine/serine-rich domains of the su(wa) and tra RNA processing regulators target proteins to a subnuclear compartment implicated in splicing. *Cell*. 67:335-342.
- 382 Salichs, E., A. Ledda, L. Mularoni, M.M. Alba, and S. de la Luna. 2009. Genome-wide analysis of histidine repeats reveals their role in the localization of human proteins to the nuclear speckles compartment. *PLoS genetics*. 5:e1000397.
- 383 Jagiello, I., A. Van Eynde, V. Vulsteke, M. Beullens, A. Boudrez, S. Keppens, W. Stalmans, and M. Bollen. 2000. Nuclear and subnuclear targeting sequences of the protein phosphatase-1 regulator NIPP1. *Journal of cell science*. 113 Pt 21:3761-3768.
- 384 Eilbracht, J., and M.S. Schmidt-Zachmann. 2001. Identification of a sequence element directing a protein to nuclear speckles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:3849-3854.
- 385 Misteli, T., and D.L. Spector. 1997. Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trends in cell biology*. 7:135-138.
- 386 Huang, S., and D.L. Spector. 1996. Intron-dependent recruitment of pre-mRNA splicing factors to sites of transcription. *The Journal of cell biology*. 133:719-732.
- 387 Ahmad, Y., F.M. Boisvert, P. Gregor, A. Cobley, and A.I. Lamond. 2009. NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic acids research*. 37:D181-184.
- 388 Yoshimoto, R., K. Okawa, M. Yoshida, M. Ohno, and N. Kataoka. 2014. Identification of a novel component C2ORF3 in the lariat-intron complex: lack of C2ORF3 interferes with pre-mRNA splicing via intron turnover pathway. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 19:78-87.
- 389 Paronetto, M.P., B. Minana, and J. Valcarcel. 2011. The Ewing sarcoma protein regulates DNA damage-induced alternative splicing. *Molecular cell*. 43:353-368.
- 390 Sakashita, E., and H. Endo. 2010. SR and

- SR-related proteins redistribute to segregated fibrillar components of nucleoli in a response to DNA damage. *Nucleus*. 1:367-380.
- 391 Bressan, G.C., E.C. Moraes, A.O. Manfiolli, T.M. Kuniyoshi, D.O. Passos, M.D. Gomes, and J. Kobarg. 2009. Arginine methylation analysis of the splicing-associated SR protein SFRS9/SRP30C. *Cellular & molecular biology letters*. 14:657-669.
- 392 Bohnsack, M.T., R. Martin, S. Granneman, M. Ruprecht, E. Schleiff, and D. Tollervey. 2009. Prp43 bound at different sites on the pre-rRNA performs distinct functions in ribosome synthesis. *Molecular cell*. 36:583-592.
- 393 Lebaron, S., C. Papin, R. Capeyrou, Y.L. Chen, C. Froment, B. Monsarrat, M. Caizergues-Ferrer, M. Grigoriev, and Y. Henry. 2009. The ATPase and helicase activities of Prp43p are stimulated by the G-patch protein Pfa1p during yeast ribosome biogenesis. *The EMBO journal*. 28:3808-3819.
- 394 Valdez, B.C., L. Perlaky, and D. Henning. 2002. Expression, cellular localization, and enzymatic activities of RNA helicase II/Gu(beta). *Experimental cell research*. 276:249-263.
- 395 Ouyang, P. 2009. SRrp37, a novel splicing regulator located in the nuclear speckles and nucleoli, interacts with SC35 and modulates alternative pre-mRNA splicing in vivo. *Journal of cellular biochemistry*. 108:304-314
- 396 Uribe, D.J., K. Guo, Y.J. Shin, and D. Sun. 2011. Heterogeneous nuclear ribonucleo-protein K and nucleolin as transcriptional activators of the vascular endothelial growth factor promoter through interaction with secondary DNA structures. *Biochemistry*. 50:3796-3806.
- 397 Das, S., R. Cong, J. Shandilya, P. Senapati, B. Moindrot, K. Monier, H. Delage, F. Mongelard, S. Kumar, T.K. Kundu, and P. Bouvet. 2013. Characterization of nucleolin K88 acetylation defines a new pool of nucleolin colocalizing with pre-mRNA splicing factors. *FEBS letters*. 587:417-424.
- 398 Cong, R., S. Das, and P. Bouvet. 2011. The Multiple Properties and Functions of Nucleolin. In *The Nucleolus*. J.M.O. Olson, editor. Springer New York, New York, NY. 185-212.
- 399 Golding, M., C. Ruhrberg, J. Sandle, and W.J. Gullick. 2004. Mapping nucleolar and spliceosome localization sequences of neuregulin1-beta3. *Experimental cell research*. 299:110-118.
- 400 Leung, A.K., and A.I. Lamond. 2002. In vivo analysis of NHPX reveals a novel nucleolar localization pathway involving a transient accumulation in splicing speckles. *The Journal of cell biology*. 157:615-629.
- 401 Wagner, S., S. Chiosea, and J.A. Nickerson. 2003. The spatial targeting and nuclear matrix binding domains of SRm160. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:3269-3274.
- 402 Bellini, M. 2000. Coilin, more than a molecular marker of the cajal (coiled) body. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 22:861-867.
- 403 Broome, H.J., and M.D. Hebert. 2013. Coilin displays differential affinity for specific RNAs in vivo and is linked to telomerase RNA biogenesis. *Journal of molecular biology*. 425:713-724.
- 404 Bohmann, K., J. Ferreira, N. Santama, K. Weis, and A.I. Lamond. 1995. Molecular analysis of the coiled body. *Journal of cell science*. Supplement. 19:107-113.
- 405 Ochs, R.L., T.W. Stein, Jr., and E.M. Tan. 1994. Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells. *Journal of cell science*. 107 ( Pt 2):385-399.
- 406 Malatesta, M., C. Zancanaro, T.E. Martin, E.K. Chan, F. Amalric, R. Luhrmann, P. Vogel, and S. Fakan. 1994. Is the coiled body involved in nucleolar functions? *Experimental cell research*. 211:415-419.
- 407 Bohmann, K., J.A. Ferreira, and A.I. Lamond. 1995. Mutational analysis of p80 coilin indicates a functional interaction between coiled bodies and the nucleolus. *The Journal of cell biology*. 131:817-831.
- 408 Sleeman, J., C.E. Lyon, M. Platani, J.P. Kreivi, and A.I. Lamond. 1998. Dynamic interactions between splicing snRNPs, coiled bodies and nucleoli revealed using snRNP protein fusions to the green fluorescent protein. *Experimental cell research*. 243:290-304.
- 409 Lyon, C.E., K. Bohmann, J. Sleeman, and A.I. Lamond. 1997. Inhibition of protein dephosphorylation results in the accumulation of splicing snRNPs and coiled bodies within the nucleolus. *Experimental cell research*. 230:84-93.
- 410 Gerbi, S.A., A.V. Borovjagin, and T.S. Lange. 2003. The nucleolus: a site of ribonucleo-protein maturation. *Current opinion in cell biology*. 15:318-325.
- 411 Lorkovic, Z.J., and A. Barta. 2008. Role of Cajal bodies and nucleolus in the maturation of the U1 snRNP in Arabidopsis. *PLoS one*. 3:e3989.
- 412 Reyes-Gutierrez, P., J.C. Ritland Politz, and T. Pederson. 2014. A mRNA and cognate microRNAs localize in the nucleolus. *Nucleus*. 5:636-642.

- 413 John, H.A., M. Patrino-Georgoulas, and K.W. Jones. 1977. Detection of myosin heavy chain mRNA during myogenesis in tissue culture by *in vitro* and *in situ* hybridization. *Cell*. 12:501-508.
- 414 Bond, V.C., and B. Wold. 1993. Nucleolar localization of *myc* transcripts. *Molecular and cellular biology*. 13:3221-3230.
- 415 Kim, S.H., O.A. Koroleva, D. Lewandowska, A.F. Pendle, G.P. Clark, C.G. Simpson, P.J. Shaw, and J.W. Brown. 2009. Aberrant mRNA transcripts and the nonsense-mediated decay proteins UPF2 and UPF3 are enriched in the Arabidopsis nucleolus. *The Plant cell*. 21:2045-2057.
- 416 Sidebottom, E., and H. Harris. 1969. The Role of the Nucleolus in the Transfer of RNA from Nucleus to Cytoplasm. *Journal of cell science*. 5:351-364.
- 417 Izaurralde, E., J. Lewis, C. McGuigan, M. Jankowska, E. Darzynkiewicz, and I.W. Mattaj. 1994. A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell*. 78:657-668.
- 418 Lewis, J.D., E. Izaurralde, A. Jarmolowski, C. McGuigan, and I.W. Mattaj. 1996. A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site. *Genes & development*. 10:1683-1698.
- 419 Vagner, S., C. Vagner, and I.W. Mattaj. 2000. The carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase interacts with U2AF 65 to couple 3'-end processing and splicing. *Genes & development*. 14:403-413.
- 420 Millevoi, S., F. Geraghty, B. Idowu, J.L. Tam, M. Antoniou, and S. Vagner. 2002. A novel function for the U2AF 65 splicing factor in promoting pre-mRNA 3'-end processing. *EMBO reports*. 3:869-874.
- 421 Kyburz, A., A. Friedlein, H. Langen, and W. Keller. 2006. Direct interactions between subunits of CPSF and the U2 snRNP contribute to the coupling of pre-mRNA 3' end processing and splicing. *Molecular cell*. 23:195-205.
- 422 McCracken, S., M. Lambermon, and B.J. Blencowe. 2002. SRm160 splicing coactivator promotes transcript 3'-end cleavage. *Molecular and cellular biology*. 22:148-160.
- 423 Vagner, S., U. Ruegsegger, S.I. Gunderson, W. Keller, and I.W. Mattaj. 2000. Position-dependent inhibition of the cleavage step of pre-mRNA 3'-end processing by U1 snRNP. *Rna*. 6:178-188.
- 424 Kaida, D., M.G. Berg, I. Younis, M. Kasim, L.N. Singh, L. Wan, and G. Dreyfuss. 2010. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature*. 468:664-668.
- 425 Luo, M.J., and R. Reed. 1999. Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:14937-14942.
- 426 Rigo, F., and H.G. Martinson. 2008. Functional coupling of last-intron splicing and 3'-end processing to transcription *in vitro*: the poly(A) signal couples to splicing before committing to cleavage. *Molecular and cellular biology*. 28:849-862.
- 427 Reed, R. 2003. Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current opinion in cell biology*. 15:326-331.
- 428 Steckelberg, A.L., V. Boehm, A.M. Gro-madzka, and N.H. Gehring. 2012. CWC22 connects pre-mRNA splicing and exon junction complex assembly. *Cell reports*. 2:454-461.
- 429 Alexandrov, A., D. Colognori, M.D. Shu, and J.A. Steitz. 2012. Human spliceosomal protein CWC22 plays a role in coupling splicing to exon junction complex deposition and nonsense-mediated decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:21313-21318.
- 430 Chan, C.C., J. Dostie, M.D. Diem, W. Feng, M. Mann, J. Rappsilber, and G. Dreyfuss. 2004. eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *Rna*. 10:200-209.
- 431 Nott, A., H. Le Hir, and M.J. Moore. 2004. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes & development*. 18:210-222.
- 432 Le Hir, H., A. Nott, and M.J. Moore. 2003. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends in biochemical sciences*. 28:215-220.
- 433 Matsumoto, K., K.M. Wassarman, and A.P. Wolffe. 1998. Nuclear history of a pre-mRNA determines the translational activity of cytoplasmic mRNA. *The EMBO journal*. 17:2107-2121.
- 434 Zhang, J., X. Sun, Y. Qian, and L.E. Maquat. 1998. Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *Rna*. 4:801-815.
- 435 Lejeune, F., and L.E. Maquat. 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Current opinion in cell biology*. 17:309-315.
- 436 Braun, K.A., and E.T. Young. 2014. Coupling

- mRNA synthesis and decay. *Molecular and cellular biology*. 34:4078-4087.
- 437 Le Hir, H., D. Gatfield, E. Izaurralde, and M.J. Moore. 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal*. 20:4987-4997.
- 438 Singh, G., and J. Lykke-Andersen. 2003. New insights into the formation of active nonsense-mediated decay complexes. *Trends in biochemical sciences*. 28:464-466.
- 439 Shibuya, T., T.O. Tange, N. Sonenberg, and M.J. Moore. 2004. eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nature structural & molecular biology*. 11:346-351.
- 440 Zhang, Z., and A.R. Krainer. 2004. Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Molecular cell*. 16:597-607.
- 441 Kolasinska-Zwierz, P., T. Down, I. Latorre, T. Liu, X.S. Liu, and J. Ahringer. 2009. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nature genetics*. 41:376-381.
- 442 Schwartz, S., E. Meshorer, and G. Ast. 2009. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature structural & molecular biology*. 16:990-995.
- 443 Spies, N., C.B. Nielsen, R.A. Padgett, and C.B. Burge. 2009. Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons. *Molecular cell*. 36:245-254.
- 444 Tilgner, H., C. Nikolaou, S. Althammer, M. Sammeth, M. Beato, J. Valcarcel, and R. Guigo. 2009. Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nature structural & molecular biology*. 16:996-1001.
- 445 Lev Maor, G., A. Yearim, and G. Ast. 2015. The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends in genetics : TIG*. 31:274-280.
- 446 Zhou, H.L., G. Luo, J.A. Wise, and H. Lou. 2014. Regulation of alternative splicing by local histone modifications: potential roles for RNA-guided mechanisms. *Nucleic acids research*. 42:701-713.
- 447 Schor, I.E., D. Lleres, G.J. Risso, A. Pawellek, J. Ule, A.I. Lamond, and A.R. Kornblihtt. 2012. Perturbation of chromatin structure globally affects localization and recruitment of splicing factors. *PLoS one*. 7:e48084.
- 448 Bauren, G., and L. Wieslander. 1994. Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell*. 76:183-192.
- 449 LeMaire, M.F., and C.S. Thummel. 1990. Splicing precedes polyadenylation during *Drosophila* E74A transcription. *Molecular and cellular biology*. 10:6059-6063.
- 450 Wuarin, J., and U. Schibler. 1994. Physical isolation of nascent RNA chains transcribed by RNA polymerase II: evidence for cotranscriptional splicing. *Molecular and cellular biology*. 14:7219-7225.
- 451 Beyer, A.L., and Y.N. Osheim. 1988. Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes & development*. 2:754-765.
- 452 Xing, Y., C.V. Johnson, P.R. Dobner, and J.B. Lawrence. 1993. Higher level organization of individual gene transcription and RNA splicing. *Science*. 259:1326-1330.
- 453 Zhang, G., K.L. Taneja, R.H. Singer, and M.R. Green. 1994. Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei. *Nature*. 372:809-812.
- 454 Custodio, N., M. Carmo-Fonseca, F. Geraghty, H.S. Pereira, F. Grosveld, and M. Antoniou. 1999. Inefficient processing impairs release of RNA from the site of transcription. *The EMBO journal*. 18:2855-2866.
- 455 Gornemann, J., K.M. Kotovic, K. Hujer, and K.M. Neugebauer. 2005. Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Molecular cell*. 19:53-63.
- 456 Lacadie, S.A., and M. Rosbash. 2005. Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5' splice site base pairing in yeast. *Molecular cell*. 19:65-75.
- 457 Listerman, I., A.K. Sapra, and K.M. Neugebauer. 2006. Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. *Nature structural & molecular biology*. 13:815-822.
- 458 Sapra, A.K., M.L. Anko, I. Grishina, M. Lorenz, M. Pabis, I. Poser, J. Rollins, E.M. Weiland, and K.M. Neugebauer. 2009. SR protein family members display diverse activities in the formation of nascent and mature mRNPs in vivo. *Molecular cell*. 34:179-190.
- 459 Mabon, S.A., and T. Misteli. 2005. Differential recruitment of pre-mRNA splicing factors to alternatively spliced transcripts in vivo. *PLoS biology*. 3:e374.
- 460 Bentley, D.L. 2014. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature reviews. Genetics*. 15:163-175.
- 461 Bird, G., D.A. Zorio, and D.L. Bentley. 2004. RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation is required for cotranscriptional

- nal pre-mRNA splicing and 3'-end formation. *Molecular and cellular biology*. 24:8963-8969.
- 462 McCracken, S., N. Fong, K. Yankulov, S. Ballantyne, G. Pan, J. Greenblatt, S.D. Patterson, M. Wickens, and D.L. Bentley. 1997. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature*. 385:357-361.
- 463 Corden, J.L., and M. Patturajan. 1997. A CTD function linking transcription to splicing. *Trends in biochemical sciences*. 22:413-416.
- 464 Du, L., and S.L. Warren. 1997. A functional interaction between the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing. *The Journal of cell biology*. 136:5-18.
- 465 McCracken, S., N. Fong, E. Rosonina, K. Yankulov, G. Brothers, D. Siderovski, A. Hessel, S. Foster, S. Shuman, and D.L. Bentley. 1997. 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & development*. 11:3306-3318.
- 466 Kim, E., L. Du, D.B. Bregman, and S.L. Warren. 1997. Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *The Journal of cell biology*. 136:19-28.
- 467 Conrad, N.K., S.M. Wilson, E.J. Steinmetz, M. Patturajan, D.A. Brow, M.S. Swanson, and J.L. Corden. 2000. A yeast heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex associated with RNA polymerase II. *Genetics*. 154:557-571.
- 468 Robert, F., M. Blanchette, O. Maes, B. Chabot, and B. Coulombe. 2002. A human RNA polymerase II-containing complex associated with factors necessary for spliceosome assembly. *The Journal of biological chemistry*. 277:9302-9306.
- 469 Close, P., P. East, A.B. Dirac-Svejstrup, H. Hartmann, M. Heron, S. Maslen, A. Chariot, J. Soding, M. Skehel, and J.Q. Svejstrup. 2012. DBIRD complex integrates alternative mRNA splicing with RNA polymerase II transcript elongation. *Nature*. 484:386-389.
- 470 Lai, M.C., B.H. Teh, and W.Y. Tarn. 1999. A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *The Journal of biological chemistry*. 274:11832-11841.
- 471 Monsalve, M., Z. Wu, G. Adelmant, P. Puigserver, M. Fan, and B.M. Spiegelman. 2000. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Molecular cell*. 6:307-316.
- 472 Guillouf, C., I. Gallais, and F. Moreau-Gache-  
lin. 2006. Spi-1/PU.1 oncoprotein affects splicing decisions in a promoter binding-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 281:19145-19155.
- 473 Davies, R.C., C. Calvio, E. Bratt, S.H. Larsson, A.I. Lamond, and N.D. Hastie. 1998. WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes & development*. 12:3217-3225.
- 474 Nayler, O., W. Stratling, J.P. Bourquin, I. Staljar, L. Lindemann, H. Jasper, A.M. Hartmann, F.O. Fackelmayer, A. Ullrich, and S. Stamm. 1998. SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic acids research*. 26:3542-3549.
- 475 Lin, K.T., R.M. Lu, and W.Y. Tarn. 2004. The WW domain-containing proteins interact with the early spliceosome and participate in pre-mRNA splicing in vivo. *Molecular and cellular biology*. 24:9176-9185.
- 476 Goldstrohm, A.C., T.R. Albrecht, C. Sune, M.T. Bedford, and M.A. Garcia-Blanco. 2001. The transcription elongation factor CA150 interacts with RNA polymerase II and the pre-mRNA splicing factor SF1. *Molecular and cellular biology*. 21:7617-7628.
- 477 Dowhan, D.H., E.P. Hong, D. Auboeuf, A.P. Dennis, M.M. Wilson, S.M. Berget, and B.W. O'Malley. 2005. Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta. *Molecular cell*. 17:429-439.
- 478 Rosonina, E., M.A. Bakowski, S. McCracken, and B.J. Blencowe. 2003. Transcriptional activators control splicing and 3'-end cleavage levels. *The Journal of biological chemistry*. 278:43034-43040.
- 479 Yuryev, A., M. Patturajan, Y. Litingtung, R.V. Joshi, C. Gentile, M. Gebara, and J.L. Corden. 1996. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:6975-6980.
- 480 Kornblihtt, A.R., M. de la Mata, J.P. Fededa, M.J. Munoz, and G. Nogues. 2004. Multiple links between transcription and splicing. *Rna*. 10:1489-1498.
- 481 Cramer, P., J.F. Caceres, D. Cazalla, S. Kadener, A.F. Muro, F.E. Baralle, and A.R. Kornblihtt. 1999. Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Molecular cell*. 4:251-258.

- 482 Cramer, P., C.G. Pesce, F.E. Baralle, and A.R. Kornblihtt. 1997. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:11456-11460.
- 483 Auboeuf, D., D.H. Dowhan, Y.K. Kang, K. Larkin, J.W. Lee, S.M. Berget, and B.W. O'Malley. 2004. Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:2270-2274.
- 484 de la Mata, M., C.R. Alonso, S. Kadener, J.P. Fededa, M. Blaustein, F. Pelisch, P. Cramer, D. Bentley, and A.R. Kornblihtt. 2003. A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular cell*. 12:525-532.
- 485 Munoz, M.J., M.S. Perez Santangelo, M.P. Paronetto, M. de la Mata, F. Pelisch, S. Boireau, K. Glover-Cutter, C. Ben-Dov, M. Blaustein, J.J. Lozano, G. Bird, D. Bentley, E. Bertrand, and A.R. Kornblihtt. 2009. DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell*. 137:708-720.
- 486 Kornblihtt, A.R. 2007. Coupling transcription and alternative splicing. *Advances in experimental medicine and biology*. 623:175-189.
- 487 Pan, K., J.T. Lee, Z. Huang, and C.M. Wong. 2015. Coupling and coordination in gene expression processes with pre-mRNA splicing. *International journal of molecular sciences*. 16:5682-5696.
- 488 Lin, S., G. Coutinho-Mansfield, D. Wang, S. Pandit, and X.D. Fu. 2008. The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nature structural & molecular biology*. 15:819-826.
- 489 Ji, X., Y. Zhou, S. Pandit, J. Huang, H. Li, C.Y. Lin, R. Xiao, C.B. Burge, and X.D. Fu. 2013. SR proteins collaborate with 7SK and promoter-associated nascent RNA to release paused polymerase. *Cell*. 153:855-868.
- 490 Barash, Y., and J. Vaquero-Garcia. 2014. Splicing code modeling. *Advances in experimental medicine and biology*. 825:451-466.
- 491 Wang, E.T., R. Sandberg, S. Luo, I. Khrebtkova, L. Zhang, C. Mayr, S.F. Kingsmore, G.P. Schroth, and C.B. Burge. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 456:470-476.
- 492 Blencowe, B.J. 2006. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell*. 126:37-47.
- 493 Ule, J., G. Stefani, A. Mele, M. Ruggiu, X. Wang, B. Taneri, T. Gaasterland, B.J. Blencowe, and R.B. Darnell. 2006. An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature*. 444:580-586.
- 494 Fagnani, M., Y. Barash, J.Y. Ip, C. Misquitta, Q. Pan, A.L. Saltzman, O. Shai, L. Lee, A. Rozenhek, N. Mohammad, S. Willaime-Morawek, T. Babak, W. Zhang, T.R. Hughes, D. van der Kooy, B.J. Frey, and B.J. Blencowe. 2007. Functional coordination of alternative splicing in the mammalian central nervous system. *Genome biology*. 8:R108.
- 495 Castle, J.C., C. Zhang, J.K. Shah, A.V. Kulkarni, A. Kalsotra, T.A. Cooper, and J.M. Johnson. 2008. Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in 48 tissues and cell lines. *Nature genetics*. 40:1416-1425.
- 496 Kalsotra, A., X. Xiao, A.J. Ward, J.C. Castle, J.M. Johnson, C.B. Burge, and T.A. Cooper. 2008. A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:20333-20338.
- 497 Yeo, G.W., N.G. Coufal, T.Y. Liang, G.E. Peng, X.D. Fu, and F.H. Gage. 2009. An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nature structural & molecular biology*. 16:130-137.
- 498 Llorian, M., S. Schwartz, T.A. Clark, D. Hollander, L.Y. Tan, R. Spellman, A. Gordon, A.C. Schweitzer, P. de la Grange, G. Ast, and C.W. Smith. 2010. Position-dependent alternative splicing activity revealed by global profiling of alternative splicing events regulated by PTB. *Nature structural & molecular biology*. 17:1114-1123.
- 499 Luco, R.F., and T. Misteli. 2011. More than a splicing code: integrating the role of RNA, chromatin and non-coding RNA in alternative splicing regulation. *Current opinion in genetics & development*. 21:366-372.
- 500 Skotheim, R.I., and M. Nees. 2007. Alternative splicing in cancer: noise, functional, or systematic? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 39:1432-1449.
- 501 Venables, J.P. 2004. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer research*. 64:7647-7654.
- 502 Lodomery, M.R., S.J. Harper, and D.O. Bates. 2007. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer letters*. 249:133-142.
- 503 He, C., F. Zhou, Z. Zuo, H. Cheng, and R.

- Zhou. 2009. A global view of cancer-specific transcript variants by subtractive transcriptome-wide analysis. *PLoS one*. 4:e4732.
- 504 Gardina, P.J., T.A. Clark, B. Shimada, M.K. Staples, Q. Yang, J. Veitch, A. Schweitzer, T. Awad, C. Sugnet, S. Dee, C. Davies, A. Williams, and Y. Turpaz. 2006. Alternative splicing and differential gene expression in colon cancer detected by a whole genome exon array. *BMC genomics*. 7:325.
- 505 Thorsen, K., K.D. Sorensen, A.S. Brems-Eskildsen, C. Modin, M. Gaustadnes, A.M. Hein, M. Kruhoffer, S. Laurberg, M. Borre, K. Wang, S. Brunak, A.R. Krainer, N. Topping, L. Dyrskjot, C.L. Andersen, and T.F. Orntoft. 2008. Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 7:1214-1224.
- 506 Xi, L., A. Feber, V. Gupta, M. Wu, A.D. Bergemann, R.J. Landreneau, V.R. Litle, A. Pennathur, J.D. Luketich, and T.E. Godfrey. 2008. Whole genome exon arrays identify differential expression of alternatively spliced, cancer-related genes in lung cancer. *Nucleic acids research*. 36:6535-6547.
- 507 Ferreira, P.G., P. Jares, D. Rico, G. Gomez-Lopez, A. Martinez-Trillos, N. Villamor, S. Ecker, A. Gonzalez-Perez, D.G. Knowles, J. Monlong, R. Johnson, V. Quesada, S. Djebali, P. Papasaikas, M. Lopez-Guerra, D. Colomer, C. Royo, M. Cazorla, M. Pinyol, G. Clot, M. Aymerich, M. Rozman, M. Kulis, D. Tamborero, A. Gouin, J. Blanc, M. Gut, I. Gut, X.S. Puente, D.G. Pisano, J.I. Martin-Subero, N. Lopez-Bigas, A. Lopez-Guillermo, A. Valencia, C. Lopez-Otin, E. Campo, and R. Guigo. 2014. Transcriptome characterization by RNA sequencing identifies a major molecular and clinical subdivision in chronic lymphocytic leukemia. *Genome research*. 24:212-226.
- 508 Chen, L., J.M. Tovar-Corona, and A.O. Urrutia. 2011. Increased levels of noisy splicing in cancers, but not for oncogene-derived transcripts. *Human molecular genetics*. 20:4422-4429.
- 509 Dvinge, H., and R.K. Bradley. 2015. Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes. *Genome medicine*. 7:45.
- 510 Waks, Z., A.M. Klein, and P.A. Silver. 2011. Cell-to-cell variability of alternative RNA splicing. *Molecular systems biology*. 7:506.
- 511 Sebestyen, E., M. Zawisza, and E. Eyras. 2015. Detection of recurrent alternative splicing switches in tumor samples reveals novel signatures of cancer. *Nucleic acids research*. 43:1345-1356.
- 512 Eswaran, J., A. Horvath, S. Godbole, S.D. Reddy, P. Mudvari, K. Ohshiro, D. Cyanam, S. Nair, S.A. Fuqua, K. Polyak, L.D. Florea, and R. Kumar. 2013. RNA sequencing of cancer reveals novel splicing alterations. *Scientific reports*. 3:1689.
- 513 Oltean, S., and D.O. Bates. 2014. Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene*. 33:5311-5318.
- 514 Sveen, A., S. Kilpinen, A. Ruusulehto, R.A. Lothe, and R.I. Skotheim. 2015. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene*.
- 515 Ladomery, M. 2013. Aberrant alternative splicing is another hallmark of cancer. *International journal of cell biology*. 2013:463786.
- 516 Bauman, J.A., S.D. Li, A. Yang, L. Huang, and R. Kole. 2010. Anti-tumor activity of splice-switching oligonucleotides. *Nucleic acids research*. 38:8348-8356.
- 517 Boise, L.H., M. Gonzalez-Garcia, C.E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L.A. Turka, X. Mao, G. Nunez, and C.B. Thompson. 1993. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 74:597-608.
- 518 Todaro, M., M. Gaggianesi, V. Catalano, A. Benfante, F. Iovino, M. Biffoni, T. Apuzzo, I. Sperduti, S. Volpe, G. Cocorullo, G. Gulotta, F. Dieli, R. De Maria, and G. Stassi. 2014. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell stem cell*. 14:342-356.
- 519 Surget, S., M.P. Khoury, and J.C. Bourdon. 2013. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets and therapy*. 7:57-68.
- 520 Lukas, J., D.Q. Gao, M. Keshmeshian, W.H. Wen, D. Tsao-Wei, S. Rosenberg, and M.F. Press. 2001. Alternative and aberrant messenger RNA splicing of the mdm2 oncogene in invasive breast cancer. *Cancer research*. 61:3212-3219.
- 521 Mazoyer, S., N. Puget, L. Perrin-Vidoz, H.T. Lynch, O.M. Serova-Sinilnikova, and G.M. Lenoir. 1998. A BRCA1 nonsense mutation causes exon skipping. *American journal of human genetics*. 62:713-715.
- 522 Kandath, C., M.D. McLellan, F. Vandin, K. Ye, B. Niu, C. Lu, M. Xie, Q. Zhang, J.F. McMichael, M.A. Wyczalkowski, M.D. Leiserson, C.A. Miller, J.S. Welch, M.J. Walter, M.C. Wendl, T.J. Ley, R.K. Wilson, B.J. Raphael, and L. Ding. 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types.

- Nature. 502:333-339.
- 523 Watson, I.R., K. Takahashi, P.A. Futreal, and L. Chin. 2013. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nature reviews. Genetics*. 14:703-718.
- 524 Yoshida, K., M. Sanada, Y. Shiraishi, D. Nowak, Y. Nagata, R. Yamamoto, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, A. Kon, M. Nagasaki, G. Chalkidis, Y. Suzuki, M. Shiosaka, R. Kawahata, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, K. Ishiyama, H. Mori, F. Nolte, W.K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Sugano, C. Haferlach, H.P. Koeffler, L.Y. Shih, T. Haferlach, S. Chiba, H. Nakauchi, S. Miyano, and S. Ogawa. 2011. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 478:64-69.
- 525 Hahn, C.N., P. Venugopal, H.S. Scott, and D.K. Hiwase. 2015. Splice factor mutations and alternative splicing as drivers of hematopoietic malignancy. *Immunological reviews*. 263:257-278.
- 526 Scott, L.M., and V.I. Rebel. 2013. Acquired mutations that affect pre-mRNA splicing in hematologic malignancies and solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 105:1540-1549.
- 527 Quesada, V., L. Conde, N. Villamor, G.R. Ordóñez, P. Jares, L. Bassaganyas, A.J. Ramsay, S. Bea, M. Pinyol, A. Martínez-Trillos, M. Lopez-Guerra, D. Colomer, A. Navarro, T. Baumann, M. Aymerich, M. Rozman, J. Delgado, E. Gine, J.M. Hernandez, M. Gonzalez-Diaz, D.A. Puente, G. Velasco, J.M. Freije, J.M. Tubio, R. Royo, J.L. Gelpi, M. Orozco, D.G. Pisano, J. Zamora, M. Vazquez, A. Valencia, H. Himmelbauer, M. Bayes, S. Heath, M. Gut, I. Gut, X. Estivill, A. Lopez-Guillermo, X.S. Puente, E. Campo, and C. Lopez-Otin. 2012. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics*. 44:47-52.
- 528 Wang, L., M.S. Lawrence, Y. Wan, P. Stojanov, C. Sougnez, K. Stevenson, L. Werner, A. Sivachenko, D.S. DeLuca, L. Zhang, W. Zhang, A.R. Vartanov, S.M. Fernandes, N.R. Goldstein, E.G. Folco, K. Cibulskis, B. Tesar, Q.L. Sievers, E. Shefler, S. Gabriel, N. Hacohen, R. Reed, M. Meyerson, T.R. Golub, E.S. Lander, D. Neuberg, J.R. Brown, G. Getz, and C.J. Wu. 2011. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 365:2497-2506.
- 529 DeBoever, C., E.M. Ghia, P.J. Shepard, L. Rassenti, C.L. Barrett, K. Jepsen, C.H. Jamieson, D. Carson, T.J. Kipps, and K.A. Frazer. 2015. Transcriptome sequencing reveals potential mechanism of cryptic 3' splice site selection in SF3B1-mutated cancers. *PLoS computational biology*. 11:e1004105.
- 530 Dolatshad, H., A. Pellagatti, M. Fernandez-Mercado, B.H. Yip, L. Malcovati, M. Attwood, B. Przychodzen, N. Sahgal, A.A. Kana-pin, H. Lockstone, L. Scifo, P. Vandenberghe, E. Papaemmanuil, C.W. Smith, P.J. Campbell, S. Ogawa, J.P. Maciejewski, M. Cazzola, K.I. Savage, and J. Boulton. 2015. Disruption of SF3B1 results in deregulated expression and splicing of key genes and pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem and progenitor cells. *Leukemia*. 29:1092-1103.
- 531 Brooks, A.N., P.S. Choi, L. de Waal, T. Sharifnia, M. Imielinski, G. Saksena, C.S. Pedamallu, A. Sivachenko, M. Rosenberg, J. Chmielecki, M.S. Lawrence, D.S. DeLuca, G. Getz, and M. Meyerson. 2014. A pan-cancer analysis of transcriptome changes associated with somatic mutations in U2AF1 reveals commonly altered splicing events. *PloS one*. 9:e87361.
- 532 Przychodzen, B., A. Jerez, K. Guinta, M.A. Sekeres, R. Padgett, J.P. Maciejewski, and H. Makishima. 2013. Patterns of missplicing due to somatic U2AF1 mutations in myeloid neoplasms. *Blood*. 122:999-1006.
- 533 Ilagan, J.O., A. Ramakrishnan, B. Hayes, M.E. Murphy, A.S. Zebari, P. Bradley, and R.K. Bradley. 2015. U2AF1 mutations alter splice site recognition in hematological malignancies. *Genome research*. 25:14-26.
- 534 Chabot, B., and L. Shkreta. 2016. Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *The Journal of cell biology*. 212:13-27.
- 535 Kim, E., J.O. Ilagan, Y. Liang, G.M. Daubner, S.C. Lee, A. Ramakrishnan, Y. Li, Y.R. Chung, J.B. Micol, M.E. Murphy, H. Cho, M.K. Kim, A.S. Zebari, S. Aumann, C.Y. Park, S. Buonamici, P.G. Smith, H.J. Deeg, C. Lobry, I. Aifantis, Y. Modis, F.H. Allain, S. Halene, R.K. Bradley, and O. Abdel-Wahab. 2015. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer cell*. 27:617-630.
- 536 Komeno, Y., Y.J. Huang, J. Qiu, L. Lin, Y. Xu, Y. Zhou, L. Chen, D.D. Monterroza, H. Li, R.C. DeKaveler, M. Yan, X.D. Fu, and D.E. Zhang. 2015. SRSF2 Is Essential for Hematopoiesis, and Its Myelodysplastic Syndrome-Related Mutations Dysregulate Alternative Pre-mRNA Splicing. *Molecular and cellular biology*. 35:3071-3082.

- 537 Zhang, J., Y.K. Lieu, A.M. Ali, A. Penson, K.S. Reggio, R. Rabadan, A. Raza, S. Mukherjee, and J.L. Manley. 2015. Disease-associated mutation in SRSF2 misregulates splicing by altering RNA-binding affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112:E4726-4734.
- 538 Colla, S., D.S. Ong, Y. Ogoti, M. Marchesini, N.A. Mistry, K. Clise-Dwyer, S.A. Ang, P. Storti, A. Viale, N. Giuliani, K. Ruusaard, I. Ganan Gomez, C.A. Bristow, M. Estecio, D.C. Weksberg, Y.W. Ho, B. Hu, G. Genovese, P. Pettazzoni, A.S. Multani, S. Jiang, S. Hua, M.C. Ryan, A. Carugo, L. Nezi, Y. Wei, H. Yang, M. D'Anca, L. Zhang, S. Gaddis, T. Gong, J.W. Horner, T.P. Heffernan, P. Jones, L.J. Cooper, H. Liang, H. Kantarjian, Y.A. Wang, L. Chin, C. Bueso-Ramos, G. Garcia-Manero, and R.A. DePinho. 2015. Telomere dysfunction drives aberrant hematopoietic differentiation and myelodysplastic syndrome. *Cancer cell*. 27:644-657.
- 539 Karni, R., E. de Stanchina, S.W. Lowe, R. Sinha, D. Mu, and A.R. Krainer. 2007. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nature structural & molecular biology*. 14:185-193.
- 540 Kikuta, K., D. Kubota, T. Saito, H. Orita, A. Yoshida, H. Tsuda, Y. Suehara, H. Katai, Y. Shimada, Y. Toyama, K. Sato, T. Yao, K. Kaneko, Y. Beppu, Y. Murakami, A. Kawai, and T. Kondo. 2012. Clinical proteomics identified ATP-dependent RNA helicase DDX39 as a novel biomarker to predict poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumor. *Journal of proteomics*. 75:1089-1098.
- 541 Elliott, D.J., and P. Rajan. 2010. The role of the RNA-binding protein Sam68 in mammary tumorigenesis. *The Journal of pathology*. 222:223-226.
- 542 Song, L., L. Wang, Y. Li, H. Xiong, J. Wu, J. Li, and M. Li. 2010. Sam68 up-regulation correlates with, and its down-regulation inhibits, proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells. *The Journal of pathology*. 222:227-237.
- 543 Zhang, Z., J. Li, H. Zheng, C. Yu, J. Chen, Z. Liu, M. Li, M. Zeng, F. Zhou, and L. Song. 2009. Expression and cytoplasmic localization of SAM68 is a significant and independent prognostic marker for renal cell carcinoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 18:2685-2693.
- 544 Busa, R., and C. Sette. 2010. An emerging role for nuclear RNA-mediated responses to genotoxic stress. *RNA biology*. 7:390-396.
- 545 Adler, A.S., M.L. McClelland, S. Yee, M. Yaylaoglu, S. Hussain, E. Cosino, G. Quinones, Z. Modrusan, S. Seshagiri, E. Torres, V.S. Chopra, B. Haley, Z. Zhang, E.M. Blackwood, M. Singh, M. Junttila, J.P. Stephan, J. Liu, G. Pau, E.R. Fearon, Z. Jiang, and R. Firestein. 2014. An integrative analysis of colon cancer identifies an essential function for PRPF6 in tumor growth. *Genes & development*. 28:1068-1084.
- 546 Cohen-Eliav, M., R. Golan-Gerstl, Z. Siegfried, C.L. Andersen, K. Thorsen, T.F. Orntoft, D. Mu, and R. Karni. 2013. The splicing factor SRSF6 is amplified and is an oncoprotein in lung and colon cancers. *The Journal of pathology*. 229:630-639.
- 547 Lokody, I. 2014. Alternative splicing: aberrant splicing promotes colon tumour growth. *Nature reviews. Cancer*. 14:382-383.
- 548 Lefave, C.V., M. Squatrito, S. Vorlova, G.L. Rocco, C.W. Brennan, E.C. Holland, Y.X. Pan, and L. Cartegni. 2011. Splicing factor hnRNPH drives an oncogenic splicing switch in gliomas. *The EMBO journal*. 30:4084-4097.
- 549 Dutertre, M., S. Vagner, and D. Auboeuf. 2010. Alternative splicing and breast cancer. *RNA biology*. 7:403-411.
- 550 Nowak, D.G., E.M. Amin, E.S. Rennel, C. Hoareau-Aveilla, M. Gammons, G. Damodoran, M. Hagiwara, S.J. Harper, J. Woolard, M.R. Lodomery, and D.O. Bates. 2010. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 285:5532-5540.
- 551 Pagliarini, V., C. Naro, and C. Sette. 2015. Splicing Regulation: A Molecular Device to Enhance Cancer Cell Adaptation. *BioMed research international*. 2015:543067.
- 552 Perry, W.L., 3rd, R.L. Shepard, J. Sampath, B. Yaden, W.W. Chin, P.W. Iversen, S. Jin, A. Lesoon, K.A. O'Brien, V.L. Peek, M. Rolfe, A. Shyjan, M. Tighe, M. Williamson, V. Krishnan, R.E. Moore, and A.H. Dantzig. 2005. Human splicing factor SPF45 (RBM17) confers broad multidrug resistance to anticancer drugs when overexpressed--a phenotype partially reversed by selective estrogen receptor modulators. *Cancer research*. 65:6593-6600.
- 553 Corsini, L., S. Bonnal, J. Basquin, M. Hothorn, K. Scheffzek, J. Valcarcel, and M. Sattler. 2007. U2AF-homology motif interactions are required for alternative splicing regulation by SPF45. *Nature structural & molecular biology*.

- 14:620-629.
- 554 Wang, Y., D. Chen, H. Qian, Y.S. Tsai, S. Shao, Q. Liu, D. Dominguez, and Z. Wang. 2014. The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression. *Cancer cell*. 26:374-389.
- 555 Sveen, A., B. Johannessen, M.R. Teixeira, R.A. Lothe, and R.I. Skotheim. 2014. Transcriptome instability as a molecular pan-cancer characteristic of carcinomas. *BMC genomics*. 15:672.
- 556 Venables, J.P., R. Klinck, C. Koh, J. Gervais-Bird, A. Bramard, L. Inkel, M. Durand, S. Couture, U. Froehlich, E. Lapointe, J.F. Lucier, P. Thibault, C. Rancourt, K. Tremblay, P. Prinos, B. Chabot, and S.A. Elela. 2009. Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nature structural & molecular biology*. 16:670-676.
- 557 Zhang, J., and J.L. Manley. 2013. Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. *Cancer discovery*. 3:1228-1237.
- 558 Shilo, A., Z. Siegfried, and R. Karni. 2015. The role of splicing factors in deregulation of alternative splicing during oncogenesis and tumor progression. *Molecular & Cellular Oncology*. 2:e970955.
- 559 Naro, C., and C. Sette. 2013. Phosphorylation-mediated regulation of alternative splicing in cancer. *International journal of cell biology*. 2013:151839.
- 560 Paronetto, M.P., D. Farini, I. Sammarco, G. Maturo, G. Vespasiani, R. Geremia, P. Rossi, and C. Sette. 2004. Expression of a truncated form of the c-Kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer. *The American journal of pathology*. 164:1243-1251.
- 561 Lukong, K.E., D. Larocque, A.L. Tyner, and S. Richard. 2005. Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry*. 280:38639-38647.
- 562 Tisserant, A., and H. Konig. 2008. Signal-regulated Pre-mRNA occupancy by the general splicing factor U2AF. *PLoS one*. 3:e1418.
- 563 Naor, D., S. Nedvetzki, I. Golan, L. Melnik, and Y. Faitelson. 2002. CD44 in cancer. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 39:527-579.
- 564 Paronetto, M.P., T. Achsel, A. Massiello, C.E. Chalfant, and C. Sette. 2007. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *The Journal of cell biology*. 176:929-939.
- 565 Huot, M.E., C.M. Brown, N. Lamarche-Vane, and S. Richard. 2009. An adaptor role for cytoplasmic Sam68 in modulating Src activity during cell polarization. *Molecular and cellular biology*. 29:1933-1943.
- 566 Huot, M.E., G. Vogel, and S. Richard. 2009. Identification of a Sam68 ribonucleoprotein complex regulated by epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 284:31903-31913.
- 567 Sterne-Weiler, T., and J.R. Sanford. 2014. Exon identity crisis: disease-causing mutations that disrupt the splicing code. *Genome biology*. 15:201.
- 568 Futreal, P.A., L. Coin, M. Marshall, T. Down, T. Hubbard, R. Wooster, N. Rahman, and M.R. Stratton. 2004. A census of human cancer genes. *Nature reviews. Cancer*. 4:177-183.
- 569 Dorman, S.N., C. Viner, and P.K. Rogan. 2014. Splicing mutation analysis reveals previously unrecognized pathways in lymph node-invasive breast cancer. *Scientific reports*. 4:7063.
- 570 Pajares, M.J., T. Ezponda, R. Catena, A. Calvo, R. Pio, and L.M. Montuenga. 2007. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *The Lancet. Oncology*. 8:349-357.
- 571 Brinkman, B.M. 2004. Splice variants as cancer biomarkers. *Clinical biochemistry*. 37:584-594.
- 572 Le, K.Q., B.S. Prabhakar, W.J. Hong, and L.C. Li. 2015. Alternative splicing as a biomarker and potential target for drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica*. 36:1212-1218.
- 573 Shilo, A., V. Ben Hur, P. Denichenko, I. Stein, E. Pikarsky, J. Rauch, W. Kolch, L. Zender, and R. Karni. 2014. Splicing factor hnRNP A2 activates the Ras-MAPK-ERK pathway by controlling A-Raf splicing in hepatocellular carcinoma development. *Rna*. 20:505-515.
- 574 Wang, H., M. Zhou, B. Shi, Q. Zhang, H. Jiang, Y. Sun, J. Liu, K. Zhou, M. Yao, J. Gu, S. Yang, Y. Mao, and Z. Li. 2011. Identification of an exon 4-deletion variant of epidermal growth factor receptor with increased metastasis-promoting capacity. *Neoplasia*. 13:461-471.
- 575 Christofk, H.R., M.G. Vander Heiden, M.H. Harris, A. Ramanathan, R.E. Gerszten, R. Wei, M.D. Fleming, S.L. Schreiber, and L.C. Cantley. 2008. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 452:230-233.
- 576 Yang, W., Y. Xia, D. Hawke, X. Li, J. Liang, D. Xing, K. Aldape, T. Hunter, W.K. Alfred Yung,

- and Z. Lu. 2012. PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell*. 150:685-696.
- 577 Yang, W., Y. Xia, Y. Cao, Y. Zheng, W. Bu, L. Zhang, M.J. You, M.Y. Koh, G. Cote, K. Aldape, Y. Li, I.M. Verma, P.J. Chiao, and Z. Lu. 2012. EGFR-induced and PKCepsilon monoubiquitylation-dependent NF-kappaB activation upregulates PKM2 expression and promotes tumorigenesis. *Molecular cell*. 48:771-784.
- 578 Clower, C.V., D. Chatterjee, Z. Wang, L.C. Cantley, M.G. Vander Heiden, and A.R. Krainger. 2010. The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:1894-1899.
- 579 David, C.J., M. Chen, M. Assanah, P. Cannon, and J.L. Manley. 2010. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*. 463:364-368.
- 580 Biamonti, G., M. Catillo, D. Pignataro, A. Montecucco, and C. Ghigna. 2014. The alternative splicing side of cancer. *Seminars in cell & developmental biology*. 32:30-36.
- 581 Jewer, M., S.D. Findlay, and L.M. Postovit. 2012. Post-transcriptional regulation in cancer progression : Microenvironmental control of alternative splicing and translation. *Journal of cell communication and signaling*. 6:233-248.
- 582 Warzecha, C.C., and R.P. Carstens. 2012. Complex changes in alternative pre-mRNA splicing play a central role in the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). *Seminars in cancer biology*. 22:417-427.
- 583 Braeutigam, C., L. Rago, A. Rolke, L. Waldmeier, G. Christofori, and J. Winter. 2014. The RNA-binding protein Rbfox2: an essential regulator of EMT-driven alternative splicing and a mediator of cellular invasion. *Oncogene*. 33:1082-1092.
- 584 Venables, J.P., J.P. Brosseau, G. Gadea, R. Klinck, P. Prinos, J.F. Beaulieu, E. Lapointe, M. Durand, P. Thibault, K. Tremblay, F. Rousset, J. Tazi, S. Abou Elela, and B. Chabot. 2013. RBFOX2 is an important regulator of mesenchymal tissue-specific splicing in both normal and cancer tissues. *Molecular and cellular biology*. 33:396-405.
- 585 Di Modugno, F., P. Iapicca, A. Boudreau, M. Mottolese, I. Terrenato, L. Perracchio, R.P. Carstens, A. Santoni, M.J. Bissell, and P. Nistico. 2012. Splicing program of human MENA produces a previously undescribed isoform associated with invasive, mesenchymal-like breast tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:19280-19285.
- 586 Zhou, Y.Q., C. He, Y.Q. Chen, D. Wang, and M.H. Wang. 2003. Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in primary human colorectal adenocarcinomas: generation of different splicing RON variants and their oncogenic potential. *Oncogene*. 22:186-197.
- 587 Ghigna, C., S. Giordano, H. Shen, F. Benvenuto, F. Castiglioni, P.M. Comoglio, M.R. Green, S. Riva, and G. Biamonti. 2005. Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Molecular cell*. 20:881-890.
- 588 Vanharanta, S., C.B. Marney, W. Shu, M. Valiente, Y. Zou, A. Mele, R.B. Darnell, and J. Massague. 2014. Loss of the multifunctional RNA-binding protein RBM47 as a source of selectable metastatic traits in breast cancer. *eLife*. 3.
- 589 Xu, Y., X.D. Gao, J.H. Lee, H. Huang, H. Tan, J. Ahn, L.M. Reinke, M.E. Peter, Y. Feng, D. Gius, K.P. Siziopikou, J. Peng, X. Xiao, and C. Cheng. 2014. Cell type-restricted activity of hnRNPM promotes breast cancer metastasis via regulating alternative splicing. *Genes & development*. 28:1191-1203.
- 590 Yang, J., B.D. Bennett, S. Luo, K. Inoue, S.A. Grimm, G.P. Schroth, P.R. Bushel, H.K. Kin-yamu, and T.K. Archer. 2015. LIN28A Modulates Splicing and Gene Expression Programs in Breast Cancer Cells. *Molecular and cellular biology*. 35:3225-3243.
- 591 Hurov, K.E., C. Cotta-Ramusino, and S.J. Elledge. 2010. A genetic screen identifies the Triple T complex required for DNA damage signaling and ATM and ATR stability. *Genes & development*. 24:1939-1950.
- 592 Paulsen, R.D., D.V. Soni, R. Wollman, A.T. Hahn, M.C. Yee, A. Guan, J.A. Hesley, S.C. Miller, E.F. Cromwell, D.E. Solow-Cordero, T. Meyer, and K.A. Cimprich. 2009. A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Molecular cell*. 35:228-239.
- 593 Adamson, B., A. Smogorzewska, F.D. Sigoillot, R.W. King, and S.J. Elledge. 2012. A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nature cell biology*. 14:318-328.
- 594 Dutertre, M., S. Lambert, A. Carreira, M. Amor-Gueret, and S. Vagner. 2014. DNA damage: RNA-binding proteins protect from

- near and far. Trends in biochemical sciences. 39:141-149.
- 595 Sevcik, J., M. Falk, L. Macurek, P. Kleiblova, F. Lhota, J. Hojny, L. Stefancikova, M. Janatova, J. Bartek, J. Stribrna, Z. Hodny, L. Jezkova, P. Pohlreich, and Z. Kleibl. 2013. Expression of human BRCA1Delta17-19 alternative splicing variant with a truncated BRCT domain in MCF-7 cells results in impaired assembly of DNA repair complexes and aberrant DNA damage response. Cellular signalling.
- 596 Best, A., K. James, C. Dalgliesh, E. Hong, M. Kheirolah-Kouhestani, T. Curk, Y. Xu, M. Danilenko, R. Hussain, B. Keavney, A. Wipat, R. Klinck, I.G. Cowell, K. Cheong Lee, C.A. Austin, J.P. Venables, B. Chabot, M. Santibanez Koref, A. Tyson-Capper, and D.J. Elliott. 2014. Human Tra2 proteins jointly control a CHEK1 splicing switch among alternative and constitutive target exons. Nature communications. 5:4760.
- 597 Poulidakos, P.I., Y. Persaud, M. Janakiraman, X. Kong, C. Ng, G. Moriceau, H. Shi, M. Atefi, B. Titz, M.T. Gabay, M. Salton, K.B. Dahlman, M. Tadi, J.A. Wargo, K.T. Flaherty, M.C. Kelley, T. Misteli, P.B. Chapman, J.A. Sosman, T.G. Graeber, A. Ribas, R.S. Lo, N. Rosen, and D.B. Solit. 2011. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). Nature. 480:387-390.
- 598 Naro, C., P. Bielli, V. Pagliarini, and C. Sette. 2015. The interplay between DNA damage response and RNA processing: the unexpected role of splicing factors as gatekeepers of genome stability. Frontiers in genetics. 6:142.
- 599 Tuduri, S., L. Crabbe, C. Conti, H. Tourriere, H. Holtgreve-Grez, A. Jauch, V. Pantesco, J. De Vos, A. Thomas, C. Theillet, Y. Pommier, J. Tazi, A. Coquelle, and P. Pasero. 2009. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. Nature cell biology. 11:1315-1324.
- 600 Li, X., and J.L. Manley. 2005. Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. Cell. 122:365-378.
- 601 Shanbhag, N.M., I.U. Rafalska-Metcalf, C. Balane-Bolivar, S.M. Janicki, and R.A. Greenberg. 2010. ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. Cell. 141:970-981.
- 602 Tresini, M., D.O. Warmerdam, P. Kolovos, L. Snijder, M.G. Vrouwe, J.A. Demmers, I.W.F. van, F.G. Grosveld, R.H. Medema, J.H. Hoeijmakers, L.H. Mullenders, W. Vermeulen, and J.A. Marteijn. 2015. The core spliceosome as target and effector of non-canonical ATM signalling. Nature. 523:53-58.
- 603 Gaudreault, I., D. Guay, and M. Lebel. 2004. YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. Nucleic acids research. 32:316-327.
- 604 Krietsch, J., M.C. Caron, J.P. Gagne, C. Ethier, J. Vignard, M. Vincent, M. Rouleau, M.J. Hendzel, G.G. Poirier, and J.Y. Masson. 2012. PARP activation regulates the RNA-binding protein NONO in the DNA damage response to DNA double-strand breaks. Nucleic acids research. 40:10287-10301.
- 605 Hottiger, M.O. 2015. SnapShot: ADP-Ribosylation Signaling. Molecular cell. 58:1134-1134 e1131.
- 606 Mastrocola, A.S., S.H. Kim, A.T. Trinh, L.A. Rodenkirch, and R.S. Tibbetts. 2013. The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage. The Journal of biological chemistry. 288:24731-24741.
- 607 Britton, S., E. Dernoncourt, C. Delteil, C. Froment, O. Schiltz, B. Salles, P. Frit, and P. Calsou. 2014. DNA damage triggers SAF-A and RNA biogenesis factors exclusion from chromatin coupled to R-loops removal. Nucleic acids research. 42:9047-9062.
- 608 Rulten, S.L., A. Rotheray, R.L. Green, G.J. Grundy, D.A. Moore, F. Gomez-Herreros, M. Hafezparast, and K.W. Caldecott. 2014. PARP-1 dependent recruitment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated protein FUS/TLS to sites of oxidative DNA damage. Nucleic acids research. 42:307-314.
- 609 Dardenne, E., S. Pierredon, K. Driouch, L. Gratadou, M. Lacroix-Triki, M.P. Espinoza, E. Zonta, S. Germann, H. Mortada, J.P. Villemin, M. Dutertre, R. Lidereau, S. Vagner, and D. Auboeuf. 2012. Splicing switch of an epigenetic regulator by RNA helicases promotes tumor-cell invasiveness. Nature structural & molecular biology. 19:1139-1146.
- 610 Malanga, M., A. Czuby, A. Girstun, K. Staron, and F.R. Althaus. 2008. Poly(ADP-ribose) binds to the splicing factor ASF/SF2 and regulates its phosphorylation by DNA topoisomerase I. The Journal of biological chemistry. 283:19991-19998.
- 611 Ji, Y., and A.V. Tulin. 2009. Poly(ADP-ribosylation) of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulates splicing. Nucleic acids research. 37:3501-3513.
- 612 Savage, K.I., J.J. Gorski, E.M. Barros, G.W.

- Irwin, L. Manti, A.J. Powell, A. Pellagatti, N. Lukashchuk, D.J. McCance, W.G. McCluggage, G. Schettino, M. Salto-Tellez, J. Boultonwood, D.J. Richard, S.S. McDade, and D.P. Harkin. 2014. Identification of a BRCA1-mRNA splicing complex required for efficient DNA repair and maintenance of genomic stability. *Molecular cell*. 54:445-459.
- 613 Wang, W.Y., L. Pan, S.C. Su, E.J. Quinn, M. Sasaki, J.C. Jimenez, I.R. Mackenzie, E.J. Huang, and L.H. Tsai. 2013. Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nature neuroscience*. 16:1383-1391.
- 614 Yuan, M., C.G. Eberhart, and M. Kai. 2014. RNA binding protein RBM14 promotes radio-resistance in glioblastoma by regulating DNA repair and cell differentiation. *Oncotarget*. 5:2820-2826.
- 615 Marechal, A., J.M. Li, X.Y. Ji, C.S. Wu, S.A. Yazinski, H.D. Nguyen, S. Liu, A.E. Jimenez, J. Jin, and L. Zou. 2014. PRP19 transforms into a sensor of RPA-ssDNA after DNA damage and drives ATR activation via a ubiquitin-mediated circuitry. *Molecular cell*. 53:235-246.
- 616 Wan, L., and J. Huang. 2014. The PSO4 protein complex associates with replication protein A (RPA) and modulates the activation of ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR). *The Journal of biological chemistry*. 289:6619-6626.
- 617 Li, S., W.W. Kuhne, A. Kulharya, F.Z. Hudson, K. Ha, Z. Cao, and W.S. Dynan. 2009. Involvement of p54(nrb), a PSF partner protein, in DNA double-strand break repair and radioresistance. *Nucleic acids research*. 37:6746-6753.
- 618 Kuhnert, A., U. Schmidt, S. Monajembashi, C. Franke, B. Schlott, F. Grosse, K.O. Greulich, H.P. Saluz, and F. Hanel. 2012. Proteomic identification of PSF and p54(nrb) as TopBP1-interacting proteins. *Journal of cellular biochemistry*. 113:1744-1753.
- 619 Anantha, R.W., A.L. Alcivar, J. Ma, H. Cai, S. Simhadri, J. Ule, J. Konig, and B. Xia. 2013. Requirement of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C for BRCA gene expression and homologous recombination. *PloS one*. 8:e61368.
- 620 Polo, S.E., A.N. Blackford, J.R. Chapman, L. Baskcomb, S. Gravel, A. Rusch, A. Thomas, R. Blundred, P. Smith, J. Kzhyshkowska, T. Dobner, A.M. Taylor, A.S. Turnell, G.S. Stewart, R.J. Grand, and S.P. Jackson. 2012. Regulation of DNA-end resection by hnRNPU-like proteins promotes DNA double-strand break signaling and repair. *Molecular cell*. 45:505-516.
- 621 Li, H., W. Watford, C. Li, A. Parmelee, M.A. Bryant, C. Deng, J. O'Shea, and S.B. Lee. 2007. Ewing sarcoma gene EWS is essential for meiosis and B lymphocyte development. *The Journal of clinical investigation*. 117:1314-1323.
- 622 Morozumi, Y., Y. Takizawa, M. Takaku, and H. Kurumizaka. 2009. Human PSF binds to RAD51 and modulates its homologous-pairing and strand-exchange activities. *Nucleic acids research*. 37:4296-4307.
- 623 Shin, K.H., R.H. Kim, M.K. Kang, R.H. Kim, S.G. Kim, P.K. Lim, J.M. Yochim, M.A. Baluda, and N.H. Park. 2007. p53 promotes the fidelity of DNA end-joining activity by, in part, enhancing the expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G. *DNA repair*. 6:830-840.
- 624 Bladen, C.L., D. Udayakumar, Y. Takeda, and W.S. Dynan. 2005. Identification of the polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor.p54(nrb) complex as a candidate DNA double-strand break rejoining factor. *The Journal of biological chemistry*. 280:5205-5210.
- 625 Busa, R., M.P. Paronetto, D. Farini, E. Pierantozzi, F. Botti, D.F. Angelini, F. Attisani, G. Vespasiani, and C. Sette. 2007. The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells. *Oncogene*. 26:4372-4382.
- 626 Tissier, A., R. Janel-Bintz, S. Coulon, E. Klaile, P. Kannouche, R.P. Fuchs, and A.M. Cordonnier. 2010. Crosstalk between replicative and translesional DNA polymerases: PDIP38 interacts directly with Poleta. *DNA repair*. 9:922-928.
- 627 Chen, Y., L. Zhang, and K.A. Jones. 2011. SKIP counteracts p53-mediated apoptosis via selective regulation of p21Cip1 mRNA splicing. *Genes & development*. 25:701-716.
- 628 O'Connell, B.C., B. Adamson, J.R. Lydeard, M.E. Sowa, A. Ciccia, A.L. Bredemeyer, M. Schlabach, S.P. Gygi, S.J. Elledge, and J.W. Harper. 2010. A genome-wide camptothecin sensitivity screen identifies a mammalian MMS22L-NFKBIL2 complex required for genomic stability. *Molecular cell*. 40:645-657.
- 629 Salton, M., Y. Lerenthal, S.Y. Wang, D.J. Chen, and Y. Shiloh. 2010. Involvement of Matrin 3 and SFPQ/NONO in the DNA damage response. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 9:1568-1576.
- 630 Shkreta, L., and B. Chabot. 2015. The RNA Splicing Response to DNA Damage. *Biomole-*

- cules. 5:2935-2977.
- 631 Ip, J.Y., D. Schmidt, Q. Pan, A.K. Ramani, A.G. Fraser, D.T. Odom, and B.J. Blencowe. 2011. Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome research*. 21:390-401.
- 632 Riedmann, C., Y. Ma, M. Melikishvili, S.G. Godfrey, Z. Zhang, K.C. Chen, E.C. Rouchka, and Y.N. Fondufe-Mittendorf. 2015. Inorganic Arsenic-induced cellular transformation is coupled with genome wide changes in chromatin structure, transcriptome and splicing patterns. *BMC genomics*. 16:212.
- 633 Sprung, C.N., J. Li, D. Hovan, M.J. McKay, and H.B. Forrester. 2011. Alternative transcript initiation and splicing as a response to DNA damage. *PLoS one*. 6:e25758.
- 634 Giono, L.E., N. Nieto Moreno, A.E. Cambindo Botto, G. Dujardin, M.J. Munoz, and A.R. Kornblihtt. 2016. The RNA Response to DNA Damage. *Journal of molecular biology*. 428:2636-2651.
- 635 Pilch, B., E. Allemand, M. Facompre, C. Bailly, J.F. Riou, J. Soret, and J. Tazi. 2001. Specific inhibition of serine- and arginine-rich splicing factors phosphorylation, spliceosome assembly, and splicing by the antitumor drug NB-506. *Cancer research*. 61:6876-6884.
- 636 Solier, S., E. Logette, L. Desoche, E. Solary, and L. Corcos. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay among human caspases: the caspase-2S putative protein is encoded by an extremely short-lived mRNA. *Cell death and differentiation*. 12:687-689.
- 637 Filippov, V., E.L. Schmidt, M. Filippova, and P.J. Duerksen-Hughes. 2008. Splicing and splice factor SRp55 participate in the response to DNA damage by changing isoform ratios of target genes. *Gene*. 420:34-41.
- 638 Haley, B., T. Paunesku, M. Protic, and G.E. Woloschak. 2009. Response of heterogeneous ribonuclear proteins (hnRNP) to ionising radiation and their involvement in DNA damage repair. *International journal of radiation biology*. 85:643-655.
- 639 Sun, S., Z. Zhang, R. Sinha, R. Karni, and A.R. Krainer. 2010. SF2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control. *Nature structural & molecular biology*. 17:306-312.
- 640 Adesso, L., S. Calabretta, F. Barbagallo, G. Capurso, E. Pillozzi, R. Geremia, G. Delle Fave, and C. Sette. 2013. Gemcitabine triggers a pro-survival response in pancreatic cancer cells through activation of the MNK2/eIF4E pathway. *Oncogene*. 32:2848-2857.
- 641 Merdzhanova, G., V. Edmond, S. De Seranno, A. Van den Broeck, L. Corcos, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Gazzeri, and B. Eymin. 2008. E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell death and differentiation*. 15:1815-1823.
- 642 Rahmutulla, B., K. Matsushita, M. Satoh, M. Seimiya, S. Tsuchida, S. Kubo, H. Shimada, M. Ohtsuka, M. Miyazaki, and F. Nomura. 2014. Alternative splicing of FBP-interacting repressor coordinates c-Myc, P27Kip1/cyclinE and Ku86/XRCC5 expression as a molecular sensor for bleomycin-induced DNA damage pathway. *Oncotarget*. 5:2404-2417.
- 643 Ip, J.Y., D. Schmidt, Q. Pan, A.K. Ramani, A.G. Fraser, D.T. Odom, and B.J. Blencowe. 2011. Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome research*. 21:390-401.
- 644 Jungmichel, S., F. Rosenthal, M. Altmeyer, J. Lukas, M.O. Hottiger, and M.L. Nielsen. 2013. Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses. *Molecular cell*. 52:272-285.
- 645 Beli, P., N. Lukashchuk, S.A. Wagner, B.T. Weinert, J.V. Olsen, L. Baskcomb, M. Mann, S.P. Jackson, and C. Choudhary. 2012. Proteomic investigations reveal a role for RNA processing factor THRAP3 in the DNA damage response. *Molecular cell*. 46:212-225.
- 646 Moumen, A., P. Masterson, M.J. O'Connor, and S.P. Jackson. 2005. hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell*. 123:1065-1078.
- 647 Bensimon, A., A. Schmidt, Y. Ziv, R. Elkon, S.Y. Wang, D.J. Chen, R. Aebersold, and Y. Shiloh. 2010. ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage. *Science signaling*. 3:rs3.
- 648 Matsuoka, S., B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, 3rd, K.E. Hurov, J. Luo, C.E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S.P. Gygi, and S.J. Elledge. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 316:1160-1166.
- 649 Bennetzen, M.V., D.H. Larsen, J. Bunkenborg, J. Bartek, J. Lukas, and J.S. Andersen. 2010. Site-specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 9:1314-1323.
- 650 Leva, V., S. Giuliano, A. Bardoni, S. Camerini,

- M. Crescenzi, A. Lisa, G. Biamonti, and A. Montecucco. 2012. Phosphorylation of SRSF1 is modulated by replicational stress. *Nucleic acids research*. 40:1106-1117.
- 651 Blasius, M., J.V. Forment, N. Thakkar, S.A. Wagner, C. Choudhary, and S.P. Jackson. 2011. A phospho-proteomic screen identifies substrates of the checkpoint kinase Chk1. *Genome biology*. 12:R78.
- 652 Grover, R., P.S. Ray, and S. Das. 2008. Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated translation of p53 isoforms. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 7:2189-2198.
- 653 Llorian, M., M. Beullens, B. Lesage, E. Nicolescu, L. Beke, W. Landuyt, J.M. Ortiz, and M. Bollen. 2005. Nucleocytoplasmic shuttling of the splicing factor SIPP1. *The Journal of biological chemistry*. 280:38862-38869.
- 654 Shomron, N., M. Alberstein, M. Reznik, and G. Astar. 2005. Stress alters the subcellular distribution of hSlu7 and thus modulates alternative splicing. *Journal of cell science*. 118:1151-1159.
- 655 Guil, S., J.C. Long, and J.F. Caceres. 2006. hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Molecular and cellular biology*. 26:5744-5758.
- 656 Cammas, A., S.M. Lewis, S. Vagner, and M. Holcik. 2008. Post-transcriptional control of gene expression through subcellular relocalization of mRNA binding proteins. *Biochemical pharmacology*. 76:1395-1403.
- 657 Anderson, P., and N. Kedersha. 2008. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in biochemical sciences*. 33:141-150.
- 658 Cohen, A.A., N. Geva-Zatorsky, E. Eden, M. Frenkel-Morgenstern, I. Issaeva, A. Sigal, R. Milo, C. Cohen-Saidon, Y. Liron, Z. Kam, L. Cohen, T. Danon, N. Perzov, and U. Alon. 2008. Dynamic proteomics of individual cancer cells in response to a drug. *Science*. 322:1511-1516.
- 659 Busa, R., R. Geremia, and C. Sette. 2010. Genotoxic stress causes the accumulation of the splicing regulator Sam68 in nuclear foci of transcriptionally active chromatin. *Nucleic acids research*. 38:3005-3018.
- 660 Denegri, M., D. Moralli, M. Rocchi, M. Biggoggera, E. Raimondi, F. Cobianchi, L. De Carli, S. Riva, and G. Biamonti. 2002. Human chromosomes 9, 12, and 15 contain the nucleation sites of stress-induced nuclear bodies. *Molecular biology of the cell*. 13:2069-2079.
- 661 Wong, A., S. Zhang, D. Mordue, J.M. Wu, Z. Zhang, Z. Darzynkiewicz, E.Y. Lee, and M.Y. Lee. 2013. PDIP38 is translocated to the spliceosomes/nuclear speckles in response to UV-induced DNA damage and is required for UV-induced alternative splicing of MDM2. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 12:3184-3193.
- 662 Bauman, J.A., and R. Kole. 2011. Modulation of RNA splicing as a potential treatment for cancer. *Bioengineered bugs*. 2:125-128.
- 663 Miura, K., W. Fujibuchi, and M. Unno. 2012. Splice isoforms as therapeutic targets for colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 33:2311-2319.
- 664 Zhang, F., M. Wang, T. Michael, and R. Drabier. 2013. Novel alternative splicing isoform biomarkers identification from high-throughput plasma proteomics profiling of breast cancer. *BMC systems biology*. 7 Suppl 5:S8.
- 665 Antonarakis, E.S., C. Lu, H. Wang, B. Luber, M. Nakazawa, J.C. Roeser, Y. Chen, T.A. Mohammad, Y. Chen, H.L. Fedor, T.L. Lotan, Q. Zheng, A.M. De Marzo, J.T. Isaacs, W.B. Isaacs, R. Nadal, C.J. Paller, S.R. Denmeade, M.A. Carducci, M.A. Eisenberger, and J. Luo. 2014. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 371:1028-1038.
- 666 Vauchy, C., C. Gamonet, C. Ferrand, E. Daguindau, J. Galaine, L. Beziaud, A. Chauchet, C.J. Henry Dunand, M. Deschamps, P.S. Rohrllich, C. Borg, O. Adotevi, and Y. Godet. 2015. CD20 alternative splicing isoform generates immunogenic CD4 helper T epitopes. *International journal of cancer*. 137:116-126.
- 667 Borjesson, P.K., E.J. Postema, J.C. Roos, D.R. Colnot, H.A. Marres, M.H. van Schie, G. Stehle, R. de Bree, G.B. Snow, W.J. Oyen, and G.A. van Dongen. 2003. Phase I therapy study with (186)Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 9:3961S-3972S.
- 668 Albert, B.J., P.A. McPherson, K. O'Brien, N.L. Czaicki, V. Destefino, S. Osman, M. Li, B.W. Day, P.J. Grabowski, M.J. Moore, A. Vogt, and K. Koide. 2009. Meayamycin inhibits pre-messenger RNA splicing and exhibits picomolar activity against multidrug-resistant cells. *Molecular cancer therapeutics*. 8:2308-2318.
- 669 Kaida, D., H. Motoyoshi, E. Tashiro, T. Nojima, M. Hagiwara, K. Ishigami, H. Watanabe, T. Kitahara, T. Yoshida, H. Nakajima, T. Tani, S. Horinouchi, and M. Yoshida. 2007. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nature chemical biology*. 3:576-583.

- 670 Kotake, Y., K. Sagane, T. Owa, Y. Mimori-Kiyosue, H. Shimizu, M. Uesugi, Y. Ishihama, M. Iwata, and Y. Mizui. 2007. Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nature chemical biology*. 3:570-575.
- 671 Fan, L., C. Lagiseti, C.C. Edwards, T.R. Webb, and P.M. Potter. 2011. Sudemycins, novel small molecule analogues of FR901464, induce alternative gene splicing. *ACS chemical biology*. 6:582-589.
- 672 Bonnal, S., L. Vigevani, and J. Valcarcel. 2012. The spliceosome as a target of novel antitumor drugs. *Nature reviews. Drug discovery*. 11:847-859.
- 673 Yokoi, A., Y. Kotake, K. Takahashi, T. Kadowaki, Y. Matsumoto, Y. Minoshima, N.H. Sugi, K. Sagane, M. Hamaguchi, M. Iwata, and Y. Mizui. 2011. Biological validation that SF3b is a target of the antitumor macrolide pladienolide. *The FEBS journal*. 278:4870-4880.
- 674 Salton, M., and T. Misteli. 2016. Small Molecule Modulators of Pre-mRNA Splicing in Cancer Therapy. *Trends in molecular medicine*. 22:28-37.
- 675 Mizui, Y., T. Sakai, M. Iwata, T. Uenaka, K. Okamoto, H. Shimizu, T. Yamori, K. Yoshimatsu, and M. Asada. 2004. Pladienolides, new substances from culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107. III. In vitro and in vivo antitumor activities. *The Journal of antibiotics*. 57:188-196.
- 676 Furumai, R., K. Uchida, Y. Komi, M. Yoneyama, K. Ishigami, H. Watanabe, S. Kojima, and M. Yoshida. 2010. Spliceostatin A blocks angiogenesis by inhibiting global gene expression including VEGF. *Cancer science*. 101:2483-2489.
- 677 Ho, T.T., S.D. Merajver, C.M. Lapiere, B.V. Nusgens, and C.F. Deroanne. 2008. RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *The Journal of biological chemistry*. 283:21588-21598.
- 678 Chandler, D.S., R.K. Singh, L.C. Caldwell, J.L. Bitler, and G. Lozano. 2006. Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators MDM2 and MDM4. *Cancer research*. 66:9502-9508.
- 679 Mineur, P., A.C. Colige, C.F. Deroanne, J. Dubail, F. Kesteloot, Y. Habraken, A. Noel, S. Voo, J. Waltenberger, C.M. Lapiere, B.V. Nusgens, and C.A. Lambert. 2007. Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *The Journal of cell biology*. 179:1261-1273.
- 680 Ryan, M.C., J. Cleland, R. Kim, W.C. Wong, and J.N. Weinstein. 2012. SpliceSeq: a resource for analysis and visualization of RNA-Seq data on alternative splicing and its functional impacts. *Bioinformatics*. 28:2385-2387.
- 681 Thorvaldsdottir, H., J.T. Robinson, and J.P. Mesirov. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics*. 14:178-192.
- 682 Solier, S., J. Barb, B.R. Zeeberg, S. Varma, M.C. Ryan, K.W. Kohn, J.N. Weinstein, P.J. Munson, and Y. Pommier. 2010. Genome-wide analysis of novel splice variants induced by topoisomerase I poisoning shows preferential occurrence in genes encoding splicing factors. *Cancer research*. 70:8055-8065.
- 683 Jung, D.J., S.Y. Na, D.S. Na, and J.W. Lee. 2002. Molecular cloning and characterization of CAPER, a novel coactivator of activating protein-1 and estrogen receptors. *The Journal of biological chemistry*. 277:1229-1234.
- 684 Burger, K., B. Muhl, T. Harasim, M. Rohrmoser, A. Malamoussi, M. Orban, M. Kellner, A. Gruber-Eber, E. Kremmer, M. Holzel, and D. Eick. 2010. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *The Journal of biological chemistry*. 285:12416-12425.
- 685 Shkreta, L., L. Michelle, J. Toutant, M.L. Tremblay, and B. Chabot. 2011. The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *The Journal of biological chemistry*. 286:331-340.
- 686 Dutertre, M., G. Sanchez, M.C. De Cian, J. Barbier, E. Dardenne, L. Gratadou, G. Dujardin, C. Le Jossic-Corcus, L. Corcos, and D. Auboeuf. 2010. Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response. *Nature structural & molecular biology*. 17:1358-1366.
- 687 Dias, C.S., Y. Liu, A. Yau, L. Westrick, and S.C. Evans. 2006. Regulation of hdm2 by stress-induced hdm2alt1 in tumor and non-tumorigenic cell lines correlating with p53 stability. *Cancer research*. 66:9467-9473.
- 688 Blaustein, M., F. Pelisch, and A. Srebrow. 2007. Signals, pathways and splicing regulation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 39:2031-2048.
- 689 Eisenreich, A., R. Malz, W. Pepke, Y. Ayril, W. Poller, H.P. Schultheiss, and U. Rauch. 2009. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in regulating alternative splicing of tissue factor mRNA in human endothelial cells. *Circulation journal : official*

- journal of the Japanese Circulation Society. 73:1746-1752.
- 690 Gabriel, M., Y. Delforge, A. Deward, Y. Habraken, B. Hennuy, J. Piette, R. Klinck, B. Chabot, A. Colige, and C. Lambert. 2015. Role of the splicing factor SRSF4 in cisplatin-induced modifications of pre-mRNA splicing and apoptosis. *BMC cancer*. 15:227.
- 691 Campa, C.C., E. Ciralo, A. Ghigo, G. Germina, and E. Hirsch. 2015. Crossroads of PI3K and Rac pathways. *Small GTPases*. 6:71-80.
- 692 Okada, M., and K. Ye. 2009. Nuclear phosphoinositide signaling regulates messenger RNA export. *RNA biology*. 6:12-16.
- 693 Martelli, A.M., A. Ognibene, F. Buontempo, M. Fini, D. Bressanin, K. Goto, J.A. McCubrey, L. Cocco, and C. Evangelisti. 2011. Nuclear phosphoinositides and their roles in cell biology and disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 46:436-457.
- 694 Chen, R., V.H. Kang, J. Chen, J.C. Shope, J. Torabinejad, D.B. DeWald, and G.D. Prestwich. 2002. A monoclonal antibody to visualize PtdIns(3,4,5)P(3) in cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 50:697-708.
- 695 Lin, J.C., M. Hsu, and W.Y. Tarn. 2007. Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:2235-2240.
- 696 Kudo, K., E. Gavin, S. Das, L. Amable, L.A. Shevde, and E. Reed. 2012. Inhibition of Gli1 results in altered c-Jun activation, inhibition of cisplatin-induced upregulation of ERCC1, XPD and XRCC1, and inhibition of platinum-DNA adduct repair. *Oncogene*. 31:4718-4724.
- 697 Pena, E., M.T. Berciano, R. Fernandez, P. Crespo, and M. Lafarga. 2000. Stress-induced activation of c-Jun N-terminal kinase in sensory ganglion neurons: accumulation in nuclear domains enriched in splicing factors and distribution in perichromatin fibrils. *Experimental cell research*. 256:179-191.
- 698 Pelisch, F., M. Blaustein, A.R. Kornblihtt, and A. Srebrow. 2005. Cross-talk between signaling pathways regulates alternative splicing: a novel role for JNK. *The Journal of biological chemistry*. 280:25461-25469.
- 699 Tanackovic, G., and A. Kramer. 2005. Human splicing factor SF3a, but not SF1, is essential for pre-mRNA splicing in vivo. *Molecular biology of the cell*. 16:1366-1377.
- 700 Shao, C., B. Yang, T. Wu, J. Huang, P. Tang, Y. Zhou, J. Zhou, J. Qiu, L. Jiang, H. Li, G. Chen, H. Sun, Y. Zhang, A. Denise, D.E. Zhang, and X.D. Fu. 2014. Mechanisms for U2AF to define 3' splice sites and regulate alternative splicing in the human genome. *Nature structural & molecular biology*. 21:997-1005.
- 701 Singh, R., and J. Valcarcel. 2005. Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins. *Nature structural & molecular biology*. 12:645-653.
- 702 Fu, X.D., and M. Ares, Jr. 2014. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature reviews. Genetics*. 15:689-701.
- 703 Loerch, S., A. Maucuer, V. Manceau, M.R. Green, and C.L. Kielkopf. 2014. Cancer-relevant splicing factor CAPERalpha engages the essential splicing factor SF3b155 in a specific ternary complex. *The Journal of biological chemistry*. 289:17325-17337.
- 704 Rossi, F., E. Labourier, T. Forne, G. Divita, J. Derancourt, J.F. Riou, E. Antoine, G. Cathala, C. Brunel, and J. Tazi. 1996. Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature*. 381:80-82.
- 705 Czubyaty, A., A. Girstun, B. Kowalska-Loth, A.M. Trzcinska, E. Purta, A. Winczura, W. Grajkowski, and K. Staron. 2005. Proteomic analysis of complexes formed by human topoisomerase I. *Biochimica et biophysica acta*. 1749:133-141.
- 706 Heyd, F., G. ten Dam, and T. Moroy. 2006. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing. *Nature immunology*. 7:859-867.
- 707 Boulon, S., B.J. Westman, S. Hutten, F.M. Boisvert, and A.I. Lamond. 2010. The nucleolus under stress. *Molecular cell*. 40:216-227.
- 708 Emmott, E., and J.A. Hiscox. 2009. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO reports*. 10:231-238.
- 709 Scott, M.S., P.V. Troshin, and G.J. Barton. 2011. NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC bioinformatics*. 12:317.
- 710 Tapia, O., R. Bengoechea, A. Palanca, R. Arteaga, J.F. Val-Bernal, E.F. Tizzano, M.T. Berciano, and M. Lafarga. 2012. Reorganization of Cajal bodies and nucleolar targeting of coilin in motor neurons of type I spinal muscular atrophy. *Histochemistry and cell biology*.
- 711 Velma, V., Z.I. Carrero, C.B. Allen, and M.D. Hebert. 2012. Coilin levels modulate cell cycle progression and gammaH2AX levels in

- etoposide treated U2OS cells. *FEBS letters*. 586:3404-3409.
- 712 Gilder, A.S., P.M. Do, Z.I. Carrero, A.M. Cosman, H.J. Broome, V. Velma, L.A. Martinez, and M.D. Hebert. 2011. Coilin participates in the suppression of RNA polymerase I in response to cisplatin-induced DNA damage. *Molecular biology of the cell*. 22:1070-1079.
- 713 Zhao, X., Z.H. Li, R.M. Terns, M.P. Terns, and Y.T. Yu. 2002. An H/ACA guide RNA directs U2 pseudouridylation at two different sites in the branchpoint recognition region in *Xenopus* oocytes. *Rna*. 8:1515-1525.
- 714 Bailey, T.L., M. Boden, F.A. Buske, M. Frith, C.E. Grant, L. Clementi, J. Ren, W.W. Li, and W.S. Noble. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*. 37:W202-208.
- 715 Kim, D.D., T.T. Kim, T. Walsh, Y. Kobayashi, T.C. Matise, S. Buyske, and A. Gabriel. 2004. Widespread RNA editing of embedded alu elements in the human transcriptome. *Genome research*. 14:1719-1725.
- 716 Barbier, J., M. Dutertre, D. Bittencourt, G. Sanchez, L. Gratadou, P. de la Grange, and D. Auboeuf. 2007. Regulation of H-ras splice variant expression by cross talk between the p53 and nonsense-mediated mRNA decay pathways. *Molecular and cellular biology*. 27:7315-7333.
- 717 Gardner, L.B. 2010. Nonsense-mediated RNA decay regulation by cellular stress: implications for tumorigenesis. *Molecular cancer research : MCR*. 8:295-308.
- 718 Kleiman, F.E., and J.L. Manley. 2001. The BARD1-CstF-50 interaction links mRNA 3' end formation to DNA damage and tumor suppression. *Cell*. 104:743-753.
- 719 Savage, K.I., and D.P. Harkin. 2015. BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *The FEBS journal*. 282:630-646.
- 720 Pelisch, F., B. Pozzi, G. Risso, M.J. Munoz, and A. Srebrow. 2012. DNA damage-induced heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K sumoylation regulates p53 transcriptional activation. *The Journal of biological chemistry*. 287:30789-30799.
- 721 Moumen, A., C. Magill, K.L. Dry, and S.P. Jackson. 2013. ATM-dependent phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K promotes p53 transcriptional activation in response to DNA damage. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 12:698-704.
- 722 Shkreta, L., U. Froehlich, E.R. Paquet, J. Toutant, S.A. Elela, and B. Chabot. 2008. Anticancer drugs affect the alternative splicing of Bcl-x and other human apoptotic genes. *Molecular cancer therapeutics*. 7:1398-1409.
- 723 Filippov, V., M. Filippova, and P.J. Duerksen-Hughes. 2007. The early response to DNA damage can lead to activation of alternative splicing activity resulting in CD44 splice pattern changes. *Cancer research*. 67:7621-7630.
- 724 Solier, S., A. Lansiaux, E. Logette, J. Wu, J. Soret, J. Tazi, C. Bailly, L. Desoche, E. Solary, and L. Corcos. 2004. Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. *Molecular cancer research : MCR*. 2:53-61.

# RÉSUMÉ

Les dommages à l'ADN ont des conséquences variées sur le métabolisme cellulaire parmi lesquelles l'épissage alternatif (AS). L'AS est un mécanisme essentiel impliqué dans de nombreux processus tels que le développement et les maladies génétiques. Cependant, les mécanismes conduisant à l'AS après un stress génotoxique ainsi que ses conséquences cellulaires sont peu décrits. L'épissage constitutif et alternatif est régulé par de nombreux mécanismes parmi lesquels la vitesse de transcription, les modifications des histones ou les modifications postraductionnelles et de localisation des facteurs d'épissage.

Dans ce projet, les dommages à l'ADN ont été induits par des agents génotoxiques utilisés en chimiothérapie anticancéreuse (Cisplatine et Camptothécine). Un séquençage à haut débit réalisé après traitement au cisplatine a montré des modifications d'épissages sur plus de 600 transcrits. Après validations, trois événements d'exclusions affectants *COASY*, *HNRNPDL* et *AMZ2* ont été étudiés plus en profondeur. De manière intéressante, la Camptothécine et le Cisplatine sont capables d'induire les mêmes événements d'AS.

De nombreuses études ont montré l'implication de kinases activées durant un stress génotoxique dans l'induction de l'épissage alternatif (par exemple ATM, ATR, JNK ou p38). Nous avons évalué le rôle de certaines d'entre-elles dans l'induction de l'AS par le Cisplatine et la Camptothécine. L'AS induit par le cisplatine s'est révélé dépendant des PI3K et des MAPK. Plus précisément c-Jun a un rôle important dans l'induction de l'AS par le Cisplatine.

À l'aide d'une bibliothèque de siRNAs contre 56 protéines se liant à l'ARN (RBPs), nous avons identifié quatre facteurs d'épissage qui miment l'effet du cisplatine sur l'AS de *COASY* et *HNRNPDL*. Le cisplatine augmente la localisation nucléolaire de ces quatre RBPs et la camptothécine élargit les « nuclear speckles » dans lesquels elles se localisent.

C-Jun interagit avec deux d'entre-elles (SF3A1 et RBM39). Après un traitement au cisplatine c-Jun est phosphorylé et induit l'AS et la localisation nucléolaire de SF3A1 d'une manière indépendante de son rôle dans la transcription. De plus, c-Jun, lorsqu'il est phosphorylé sur les résidus Ser63 et Thr91 se localise dans les « nuclear speckles » où il interagit probablement avec les facteurs d'épissage.

Nos résultats indiquent que l'AS induit par le Cisplatine augmenterait la mortalité cellulaire. En effet, les siRNAs dirigés contre SF3A1 et RBM39 sont capables d'induire l'AS et conduisent à une plus grande mortalité alors que ceux dirigés contre c-Jun et SRSF4 réduisent l'AS et la mortalité.

Nos résultats suggèrent un nouveau rôle pour c-Jun. Il se lie aux facteurs d'épissage, régule l'AS et induit la mortalité après un traitement au Cisplatine.

# ABSTRACT

DNA damages have various consequences on the cell metabolism among which alternative splicing (AS). AS is an essential mechanism involved in a large number of process from development to genetic diseases. However, little is known about the underlying molecular mechanisms leading to the induction of AS after a genotoxic stress and the biological role of this one. Constitutive and alternative splicing are regulated by several mechanisms upon which transcription rate, histone modifications or re-localization and post-transcriptional modifications of splicing factors.

In this project, DNA lesions were inflicted by two genotoxic compounds used in cancer therapy (Cisplatin and Camptothecin). RNAseq analysis was performed after Cisplatin treatment and showed a modification of splicing on more than 600 transcripts. After validations, three events of exclusions affecting COASY, HNRNPDL and AMZ2 were selected for further analysis. Interestingly, we observed that the AS events induced by Cisplatin and Camptothecin are identical.

Numerous studies have shown the implication of kinases activated during genotoxic stress (e.g. ATM, ATR, JNK, p38 ...) in AS induction. We assessed the role of some of these kinases in the global modification of splicing after Cisplatin and Camptothecin treatments and we showed that Cisplatin induced AS is dependent of PI3K and MAPK. More specifically, c-Jun is an important player in AS iduced by DNA Damages.

SiRNA library against fifty-six RNA binding protein (RBPs) allowed us to identify four RBPs whose depletion mimics genotoxic treatment regarding the AS of COASY and HNRNPDL. The intracellular localization of these four RBPs was specifically modified by the treatment: Cisplatin increased their nucleolar localization while Camptothecin favored their accumulation in enlarged nuclear speckles.

We observed that c-Jun interacts with two of these RBPs (SF3A1 and RBM39), and is phosphorylated during the treatment. Both AS and nucleolar localization of RBPs occur independently of its function as transcription factor. Interestingly, c-Jun phosphorylated on Ser63 and Thr91 localizes in nuclear speckles where it probably interacts with splicing factors.

It seems that Cisplatin-related alternative splicing increases mortality. Indeed, the depletion of RBM39 and SF3A1 induces both AS and mortality while, the depletion of c-Jun and SRSF4 (that reduces AS), also reduces the mortality.

In conclusion, our results suggest new roles for c-Jun: it binds to splicing factors, regulates AS and induces mortality after Cisplatin treatment.