

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL**

**CARACTÉRISATION DE LA CYCLINE D2 TRONQUÉE DE SOURIS : SON  
IMPLICATION DANS LE CANCER**

**MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE**

**PAR  
FÉE-ANN CHAPMAN MCNABB**

**MAI 2007**

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement mon directeur de recherche, Dr Éric Rassart, qui a dirigé l'ensemble de ce projet. Je le remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de faire ma maîtrise au sein de son équipe. Je voudrais aussi remercier Steve Teasdale qui m'a permis de développer mes intérêts en biologie moléculaire et par ce fait, présenté à Dr Éric Rassart.

Je remercie Dr. Catherine Denicourt, l'instigatrice du sujet de ma maîtrise. Une découverte qui permettra l'avancement des connaissances entourant le développement du cancer chez l'humain.

Un très grand merci à Véronique Voisin pour toute son aide, sa patience et son soutien au quotidien. Merci aussi à Séverine Landais pour tous ses conseils. Ensemble, elles m'ont aidée dans mon cheminement scientifique.

Je remercie aussi Diana Paulina Salazar Ospina pour sa générosité, ses encouragements et surtout pour son amitié. Travailler à ses côtés me manquera.

Merci au Dr. Elsy Édouard, à Philippe Legault et à Sonia Do Carmo pour toute l'aide fournie. Et un grand merci à toute l'équipe de biologie moléculaire du Dr Éric Rassart. Ils ont tous, à leur façon, fait de cette expérience un moment très enrichissant.

Je remercie mes parents, conjoint et amis(es), sans eux je ne serais pas rendue où je suis, et j'aimerais remercier Émile McNabb Lacoste pour m'avoir donné le temps d'écrire ce mémoire...

**MERCI !**

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	vi
LISTE DES SYMBOLES .....	x
RÉSUMÉ .....	xi
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1	
ÉTAT DES CONNAISSANCES .....	3
1.1. Régulation de la division cellulaire.....	3
1.2. Le cycle cellulaire eucaryote en général .....	4
1.2.1. Les cyclines.....	5
1.2.2. Progression du cycle.....	6
1.3. Phase G0/G1 à la phase S .....	9
1.3.1. Les cyclines D.....	9
1.3.1.1. Types et rôles de cyclines D .....	9
1.3.1.2. Régulation Transcriptionnelle.....	11
1.3.2. CDKs.....	12
1.3.3. CAK .....	13
1.3.4. CKIs .....	14
1.3.4.1. Cip/Kip .....	15
1.3.4.2. INK4 .....	16
1.3.5. pRB .....	17
1.3.6. Régulation de la phase G1 et de la transition G1/S.....	18
1.4. Expression oncogénique des cyclines D .....	19
1.5. Cycline D2 tronquée .....	21
1.5.1. Structure et Fonction .....	22
1.5.2. Caractéristiques <i>in vivo</i> .....	23
1.5.3. Caractéristiques <i>in vitro</i> .....	23
1.6. Hypothèses de travail .....	30
CHAPITRE 2	
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	31
2.1. Mutagenèse dirigée, délétion progressive et séquençage des différents mutants.....	31
2.1.1. Mutagenèse dirigée .....	31

2.1.2. Délétions progressives.....	31
2.1.3. Séquençage.....	32
2.2. Lignée cellulaire, conditions de culture et transfections .....	32
2.3. Localisation cellulaire.....	32
2.4. Immunoprécipitation et immunotransfert des protéines intactes et mutantes .....	33
2.4.1. Choix du vecteur d'expression.....	33
2.4.2. Immunoprécipitation.....	34
2.4.3. Immunotransfert.....	34
CHAPITRE 3	
RÉSULTATS.....	36
3.1. Construction des mutants.....	36
3.1.1. Spécificité de chacune des constructions .....	37
3.1.1.1. Mutant de la D2 .....	37
3.1.1.2. Mutants de la D2Trc .....	37
3.2. Régions impliquées dans la localisation nucléaire des protéines.....	41
3.2.1. La région C-terminale de la D2, qui comprend les a.a. 157 à 289 n'est pas impliquée dans la localisation nucléaire de la protéine. ....	41
3.2.2. La région C-terminale de la boîte cycline de la D2 est nécessaire à la localisation nucléaire de la protéine. ....	42
3.3. Région de la boîte cycline responsable de la liaison entre CDK4 et des différentes isoformes (normale et tronquée).....	45
CHAPITRE 4	
DISCUSSION.....	49
4.1. Localisation cellulaire.....	49
4.1.1. Propriétés oncogéniques reliées .....	52
4.1.1.1. Cip/Kip .....	53
4.1.1.2. CDK5.....	54
4.2. Régions de la boîte cycline responsables de la liaison de CDK4 chez les deux types d'isoformes (normale et tronquée) du gène <i>CCND2</i> .....	55
CHAPITRE 5	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES .....	56
ANNEXE 1 .....	59
RÉFÉRENCES .....	60

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Représentation schématique de l'insertion provirale en Gris 1 chez la souris.....	26
Figure 1.2 : Représentation schématique de l'ADNc de l'isoforme normale et obtenue après épissage alternatif du gène <i>CCND2</i> .....	28
Figure 1.3 : Comparaison de la séquence en acides aminés de l'isoforme tronquée (D2Trc) et de l'isoforme longue (D2).....	29
Figure 3.1 : Représentation schématique des isoformes (normale et tronquée) du gène de la cycline D2 et des protéines mutantes créées par PCR.....	40
Figure 3.2 : Localisation subcellulaire de D2 $\Delta$ 157à289-GFP et D2Trc $\Delta$ 137à156-GFP dans les cellules NIH/3T3.....	44
Figure 3.3 : Analyse des régions de la boîte cycline responsable de la liaison entre CDK4 et des différents isoformes (normale et tronquée) de la cycline D2 dans des cellules NIH/3T3 transfectées à l'aide des constructions marquées par myc.....	48
Figure 4.1 : Compilation des résultats de la localisation cellulaire des différentes isoformes (normale et tronquée) du gène de la cycline D2 et celle des protéines mutantes créées par PCR.....	51

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

A :	Adénine
A.A :	Acide aminé
ADN:	Acide désoxyribonucléotidique
ADNc :	Acide désoxyribonucléotidique complémentaire
AKT (PKB) :	Protéine Kinase B
Apa :	Facteur de transcription
APC :	Anaphase Promoting Complex
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ATF :	Activating transcription factor
BCL :	Facteur répresseur de transcription (B-Cell Lymphome)
C	Cytosine
CAK :	CDK activating kinase
<i>CCND</i> :	Gène des cyclines D
<i>CCND1</i> :	Gène de la cycline D1
<i>CCND2</i> :	Gène de la cycline D2
<i>CCND3</i> :	Gène de la cycline D3
CDK :	Kinase cycline dépendante
Cip/Kip :	Inhibiteur des CDKS
CKI :	CDK Kinase Inhibitor
c-Myc	oncogène Myc cellulaire
CREB	Élément de réponse au AMPc
CRM1 :	Exportine
CRS :	Signal de Rétention Cytoplasmique
D1 :	Cycline D1
D2 :	Cycline D2
D2Δ157à289:	Isoforme longue délétée de ses 133 derniers a.a.
D2Trc :	Cycline D2 Tronquée

D2TrcT151A :	Isoforme tronquée dont la thréonine 151 est changée pour une alanine
D2TrcP154T :	Isoforme tronquée dont la proline 154 est changée pour une thréonine
D3 :	Cycline D3
DH5 $\alpha$ :	DH5 alpha
dNTP :	Deoxyribonucleotide triphosphate
E2A :	Facteur de transcription E2A
E2F :	E2 promoter binding factor
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGFP :	Enhanced Green Fluorescent Protein
ERK :	Extracellular-Regulated Kinase
G0 :	Quiescence
G1 :	Gap 1
G2 :	Gap 2
GSK3 $\beta$ :	Glycogène Synthase Kinase 3 $\beta$
Ha-Ras :	Ras constitutivement actif
HCl :	Chlorure d'hydrogène
IL :	Interleukine
INK4 :	Inhibitor of CDK4
IP :	Immunoprécipitation
Kpb :	Kilopaire(s) de base
KDa:	Kilodalton
LB :	Luria broth
M:	Molaire
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinases
MAT1 :	Ménage à trois
MEF :	Mouse embryonic fibroblast
MgCl <sub>2</sub> :	Chlorure de magnésium
mg :	Milligramme
mL :	Millilitre
$\mu$ g :	Microgramme
$\mu$ l :	Microlitres

Mm:	milimolaire
MPF :	M-phase Promoting Factor
MuLV:	Murine leukemia virus
NFKB :	Facteur nucléaire kappa B
NaCl :	Chlorure de sodium
NaOH :	Hydroxyde de sodium
NaOAc :	Acétate de sodium
ng :	Nanogramme
NLS:	Nuclear Localisation Signal
nm :	Nanomètre
Oligo :	Oligonucléotide
o/n :	Overnight
P:	Proline
pb :	Paire de bases
PBS :	Tampon phosphate salin
PCNA :	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR :	Polimérase chain reaction
Phase M :	Mitose
Phase S :	Synthèse
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
pRB :	Protéine du rétinoblastome
Pre-B-cell :	Précurseur de cellule B
R :	Point de restriction
Rac :	Petite GTPase Rac
RIPA:	Tampon de lyse
SDS:	Dodécyl sulfate de sodium
Sp1:	Facteur de transcription
STAT:	Signal Transducer and activator of transcription
T:	Thymidine
Tm :	Melting point temperature
Tris :	1,3-Propanediol, 2-amino-2-(hydroxymethyl)

X: Acides Aminés quelconque  
X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside

## LISTE DES SYMBOLES

°C	Température en degrés Celsius
g	Force centrifuge
hre	Heure
m	Milli, $10^{-3}$
min	Minute
%	Pourcentage
o/n	Overnight
rpm	Rotation par minute
sec	Seconde
U	Unités
n	Nano, $10^{-12}$
u	Micro, $10^{-6}$

## RÉSUMÉ

Les cyclines D sont des régulateurs importants de la phase G1 du cycle cellulaire. Il existe trois types de cyclines D (D1, D2, D3) dont le taux d'expression varie selon le type cellulaire. L'étude de la transformation cellulaire par le rétrovirus Graffi chez la souris nous a permis de découvrir une nouvelle isoforme de la cycline D2 : la cycline D2 tronquée (D2Trc). Cette protéine se retrouve à un niveau basal dans des tissus normaux (cerveau, ovaire) et est fortement exprimée dans des leucémies chez la souris et dans différents cancers de cerveau humain. Il a été démontré que la forme tronquée possède un pouvoir transformant plus élevé que l'isoforme normale (D2), et que, contrairement à celui-ci, elle se localise uniquement dans le cytoplasme. De plus, bien qu'il lui manque la région C-terminale de la boîte cycline (*cyclin box*), la D2Trc garde sa capacité à se lier aux CDK4/6. Pour comprendre les rôles oncogéniques et cellulaires de la D2Trc, nous avons étudié la région C-terminale de la boîte cycline qui distingue, entre autre, l'isoforme tronquée de l'isoforme normale. Pour ce faire, différents ADNc de protéines mutantes ont été créés par PCR (D2 $\Delta$ 157à289, D2TrcT151A et D2Trc $\Delta$ 155- 151- 147- 143- 137- à 156). La localisation cellulaire des mutants D2 $\Delta$ 157à289 et D2Trc $\Delta$ 137à156 a été faite à l'aide de la protéine de fusion fluorescente GFP, en comparaison avec la protéine D2Trc native. Par immunoprécipitation, nous avons cherché à déterminer les régions ou acides aminés qui permettent aux deux isoformes du gène *CCND2* de se lier aux CDK4/6. Pour ce faire, les mutants D2 $\Delta$ 157à289 et D2Trc $\Delta$ 151- 147- 137- à 156 ont été utilisés. Nous avons constaté que ce sont les vingt derniers acides aminés de la boîte cycline de l'isoforme longue qui sont importants dans la localisation nucléaire des protéines. L'étude des partenaires d'interaction permettrait de mieux comprendre le rôle physiologique de la D2Trc.

## MOTS CLÉS

Leucémie, Cycle cellulaire, Cycline D2 tronquée, Localisation cytoplasmique, Boîte cycline.

## INTRODUCTION

L'étude de la transformation cellulaire par le rétrovirus Graffi chez la souris, nous a permis de mettre en évidence l'importance d'une nouvelle isoforme de la cycline D2 : la cycline D2 tronquée (D2Trc). Cette isoforme est activée dans 13% des leucémies induites par le MuLV Graffi (4/30 tumeurs indépendantes étudiées), ce qui montre que la dérégulation du gène *CCND2* est un événement important dans l'induction de la tumorigenèse (Denicourt *et al.*, 2003).

Cette isoforme: la cycline D2 tronquée (D2Trc) est trouvée dans certaines tumeurs murines induites par les rétrovirus Graffi (Denicourt *et al.*, 2003) et RadLV/VL3 (Tremblay *et al.*, 1992) mais aussi dans différents cancers de cerveau humain (Denicourt, 2002). De plus, elle semblerait jouer un rôle cellulaire, puisqu'on la retrouve dans certains tissus normaux, tant chez l'humain que chez la souris et la grenouille (Denicourt, 2002; Taïeb et Jessus, 1996).

Il a été démontré que la surexpression de la D2Trc avec un Ha-Ras activé induit un phénotype transformé chez les fibroblastes primaires d'embryons de souris (MEF) et que cette capacité oncogénique était très supérieure à celle de la D2 (Denicourt, 2002). Aussi, il semble que la D2Trc n'intervienne pas de la même façon dans la cellule. Bien qu'elle garde sa capacité à interagir avec les CDK4/6, elle se localise uniquement dans le cytoplasme des cellules NIH/3T3 et semble avoir une co-localisation partielle avec le cytosquelette d'actine (majoritairement dans la région périnucléaire de la cellule) (Denicourt, 2002).

La D2Trc semble être importante dans la progression du cycle cellulaire et dans l'induction de la tumorigenèse. Connaître son rôle dans les voies de signalisation entourant la prolifération cellulaire est donc fondamental pour la compréhension de ses effets biologiques. Nous avons étudié les régions divergentes de la D2Trc à l'isoforme normale pour éclaircir comment cette isoforme interagit dans la progression du cycle cellulaire. Pour ce faire, différentes protéines mutantes ont été créées par PCR (D2 $\Delta$ 157-289, D2TrcT151A et D2Trc $\Delta$ 155-151-147-143-137-à156). Certaines de ces constructions (D2 $\Delta$ 157-289 et

D2Trc $\Delta$ 137-156) ont été, par la suite, fusionnées à la Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) pour connaître la région protéique responsable de la localisation cytoplasmique de la D2Trc. De plus, nous avons cherché à déterminer quelle région ou acides aminés permettent aux deux isoformes de se lier aux CDK4/6 par co-immunoprécipitation, à l'aide des mutants D2 $\Delta$ 157-289 et D2Trc $\Delta$ 151-147-137-156.

## CHAPITRE 1

### ÉTAT DES CONNAISSANCES

#### 1.1. Régulation de la division cellulaire

Les systèmes de régulation cellulaire doivent être contrôlés de façon spécifique pour permettre la coordination de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Les facteurs de croissance, les récepteurs, les transducteurs intracellulaires, les facteurs de transcription et les protéines gouvernant le cycle cellulaire, participent au contrôle de la prolifération cellulaire. Puisque ces différents éléments sont impliqués dans la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire (proto-oncogènes), ils sont souvent responsables du développement de différents types de cancers humains lorsqu'ils sont mutés, altérés ou surexprimés (oncogènes).

Les cellules tumorales ou cancéreuses ont comme caractéristique commune, la perte ou la désorganisation de certains éléments du système de régulation. La prolifération des cellules cancéreuses repose principalement sur leur capacité à esquiver l'entrée en quiescence, malgré les signaux anti-prolifératifs. La transition G1/S du cycle cellulaire est une étape décisive, car la cellule entreprend soit un nouveau cycle de division soit une entrée en quiescence. Les gènes régulant la transition G1/S, sont donc par leur statut, majoritairement responsables de différents types de cancers humains. Leur identification et caractérisation restent une étape importante pour éventuellement élaborer des stratégies permettant de combattre le cancer.

La progression à travers les différentes étapes du cycle cellulaire est essentiellement régulée par différentes classes de CDK (kinase dépendante des cyclines). Les CDKs sont des kinases à sérine et thréonine, dont l'activité catalytique consiste à phosphoryler des protéines cibles intervenant dans les événements du cycle cellulaire ou dans la progression du cycle. Associées à leur cycline correspondante, elles sont activées ou inactivées dépendamment des partenaires environnants (revue par Sherr, 1993).

## 1.2. Le cycle cellulaire eucaryote en général

Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes supérieures comprend quatre phases. Durant deux de ces phases (S et M), les cellules exécutent les événements fondamentaux du cycle, soit la réplication de l'ADN (S) et le partage correct de son bagage génétique par mitose (M), aux deux cellules filles. Les deux autres phases du cycle (G1 et G2) représentent des intervalles (*gap*). Durant la phase G1, la cellule effectue sa croissance, intègre les signaux mitogènes ou anti-mitogènes et se prépare pour effectuer correctement la phase S. Lorsque les conditions sont favorables, la cellule s'engage irréversiblement dans le cycle de division. Au-delà du point de restriction (R), la cellule achève son cycle cellulaire indépendamment des facteurs ectopiques (revue par Planas-Silva et Weinberg, 1997). Lorsque les conditions ne sont pas favorables à la division, la cellule peut entrer réversiblement dans un état quiescent qui définit la phase G0. Au cours de la phase G2, la cellule se prépare à la phase M.

Pour assurer d'une part, l'ordre et la succession des quatre phases du cycle, soit G1, S, G2 et M (régulation du cycle), et d'autre part, l'obtention de deux cellules filles identiques (surveillance de l'ADN), la cellule dispose de mécanismes de contrôle (*checkpoints*). Une sorte de «contrôle de qualité» à chaque étape qui bloque le déroulement du cycle lorsqu'une anomalie est détectée (endommagement de l'ADN, ADN non complètement répliqué, chromosomes non attachés au fuseau mitotique) (Pommier et Kohn, 2003; Stewart *et al.*, 2003). Pour la régulation du cycle, ce sont essentiellement les unités catalytiques de kinases dépendantes des cyclines (CDK), qui interviennent. Pour l'obtention de deux cellules filles identiques, d'autres molécules entrent en jeu pour inhiber les CDKs, afin d'arrêter le cycle.

### 1.2.1. Les cyclines

Selon les étapes du cycle cellulaire, les cyclines sont présentes à des taux variables dans le cytoplasme (ou pour certaines cyclines dans les noyaux) des cellules. Synthétisées à des moments différents du cycle cellulaire, les cyclines se lient à leurs kinases (CDK) spécifiques, et permettent la progression du cycle cellulaire. La famille des cyclines possède 6 membres (cyclines A, B, D, E, F et J) impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et 4 membres (cyclines C, H, K et T) impliqués dans la régulation de la transcription. Elles sont les unités régulatrices du complexe formé avec les CDKs. L'activité du complexe cyclines-CDK est régie par différents évènements, incluant l'assemblage des cyclines aux CDKs, des modifications post-transcriptionnelles (Aktas *et al.*, 1997) et l'association du complexe à des protéines inhibitrices (Sherr et Roberts, 1999). La succession normale des différentes phases ne peut avoir lieu, que si les différentes CDKs sont présentes et actives aux bons moments.

Les cyclines contiennent deux domaines  $\alpha$  (chacun contenant cinq hélices), formés d'une séquence répétée de 90 acides aminés. Ils forment les repliements de la protéine (appelés *cyclin folds*). Chaque repliement ou répétition cycline est relié par un court peptide de 10 à 15 résidus. La première répétition correspond à ce qui est défini comme étant la boîte cycline (*cyclin box*). Elle est conservée chez tous les types de cyclines. Dans le complexe enzymatique cycline-CDK, la première répétition cycline est en contact direct avec la sous-unité CDK (Kobayashi *et al.*, 1992; Lees et Harlow, 1993). Le deuxième repliement par contre, ne semble pas contribuer directement à l'interaction de la cycline avec la CDK (Kim *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1997).

Concernant les cyclines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, on en distingue deux types : les cyclines dites G1 (cyclines D1, D2, D3) ou G1/S (cycline E) (Reed *et al.*, 1991; Sherr, 1993), et les cyclines dites mitotiques (cyclines A et B) dont le pic d'expression se situe en G2/M (Hunt, 1991; Pines, 1991). Ces deux types de cyclines varient dans leur structure générale : les cyclines de types G1/S possèdent leur boîte cycline en région N-terminale alors que chez les cyclines mitotiques, cette boîte se retrouve plutôt en C-

terminale (Hunt, 1991). De plus, les cyclines G1/S ont, en aval de la boîte cycline, une région riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine appelée «PEST». Cette région joue un rôle dans le renouvellement rapide de ces cyclines et leur confère une demi-vie courte (Koff *et al.*, 1991; Lew *et al.*, 1991). Les cyclines G2/M possèdent en N-terminale, une boîte de destruction (*destruction box*), nécessaire à leur dégradation dépendante de l'ubiquitine (Glotzer *et al.*, 1991; Hershko *et al.*, 1991).

### 1.2.2. Progression du cycle

La progression en phase G1 nécessite la présence des cyclines D qui répondent aux facteurs de croissance. Présentes, elles permettent à la sous-unité catalytique kinase cycline D dépendante (CDK lié à la cycline D) la phosphorylation, entre autre, du produit de l'anti-oncogène pRB (protéine du rétinoblastome) (Voir annexe 1).

Phosphorylé, pRB libère les facteurs de transcription E2F qui contrôlent l'expression des gènes nécessaires pour la transition G1/S et la progression vers S. Par exemple, la synthèse des cyclines E et A requiert l'activation des facteurs de transcription E2F1 (revue dans Assoian, 1997) et E2F3 (Humbert *et al.*, 2000) respectivement.

Le complexe cycline E/CDK2 est un des acteurs principaux de la phase S. Sa fonction principale est d'initier la synthèse de l'ADN en hyperphosphorylant pRB (Ortega *et al.*, 2002; Koff *et al.*, 1992).

La cycline A s'associe aux kinases CDK2 et CDK1 (Pagano *et al.*, 1992). La cycline A est une protéine nucléaire (Pines et Hunter, 1991). Elle commence à s'exprimer durant la phase tardive de G1 et s'accumule durant les phases S et G2 (Pines et Hunter, 1990). Associée à la kinase CDK2, elle intervient au début de la réplication (Girard *et al.*, 1991; Krude *et al.*, 1997) en se liant au facteur de transcription PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Cardoso *et al.*, 1993; Sobczak-Thepot *et al.*, 1993), requis pour l'activité de l'ADN polymérase  $\delta$ . De plus, la cycline A serait nécessaire pour restreindre la réplication à juste une par cycle (Erlandsson *et al.*, 2000).

Le taux des cyclines mitotiques augmente progressivement au cours des phases S et G2 pour atteindre un pic en mitose. Les cyclines A et B interagissent toutes les deux avec la kinase CDK1 pour déclencher la mitose et la dégradation de ces deux protéines est nécessaire pour que la cellule sorte de la mitose (Minshull *et al.*, 1989). La dégradation de la cyclines A débute au début de la prométaphase et se termine en métaphase (den Elzen et Pines, 2001; Geley *et al.*, 2001). La cycline B est synthétisée et détruite un peu après la cycline A (Pines et Hunter, 1990; Poon *et al.*, 1994; Erlandsson *et al.*, 2000). En fait, la cycline A contrôle la demi-vie de la cycline B (Yam *et al.*, 2002). Le complexe cycline A-CDK permet l'accumulation de la cycline B en phosphorylant, entre autre, CDH1 (activateur d'une sous-unité de l'*Anaphase Promoting Complex (APC<sup>cdh1</sup>)*). CDH1 phosphorylé ne peut plus se lier à l'APC, ce qui retarde la dégradation ubiquitine de la cycline B (Lukas *et al.*, 1999). L'APC est responsable de la dégradation des cyclines mitotiques par la reconnaissance de la boîte de destruction (*D-box*) en N-terminale des protéines (Glotzer *et al.*, 1991; Hershko *et al.*, 1991).

Le complexe inactif cycline B-CDK1 s'accumule dans le centrosome durant l'interphase (Bailly *et al.*, 1992). L'export nucléaire de ce complexe se produit à l'aide du CRM1 (exportine), qui reconnaît le signal de rétention cytoplasmique (CRS) en région N-terminale de la cycline B (Pines et Hunter, 1994). Lors de la prophase, le complexe cycline B-CDK1 reste dans le noyau. Cette accumulation nucléaire est due à la phosphorylation de quatre résidus sérines du CRS qui empêchent alors, la reconnaissance du CRS par CRM1 (Hagting *et al.*, 1998; Hagting *et al.*, 1999; Pines et Hunter, 1994). À partir du moment où le complexe cycline B-CDK1 est majoritairement nucléaire, on observe l'entrée en phase M.

L'entrée en mitose est gouvernée par le complexe cycline B-CDK1 (Nurse, 1990; Poon, 2002). Bien qu'il s'accumule durant les phase S et G2, l'activité de ce complexe est inhibée due à la phosphorylation des résidus Tyr-14 et Thr-15 de CDK1, par les protéines kinases Wee1/MiK1/Myt1 (Mueller *et al.*, 1995; Wells *et al.*, 1999). La Cdc25c phosphatase est stimulée afin de déphosphoryler ces résidus, ce qui permet l'activation de CDK1 (Donzelli et Draetta, 2003). Une fois activé, le complexe cycline B-CDK1, forme le MPF (*M-phase promoting factor*) (Hoffman *et al.*, 1993; Ohi et Gould, 1999; Peter *et al.*, 2002). Le MPF est

l'acteur moléculaire responsable de l'entrée en phase M par phosphorylation de certains composants clés de la cellule. Par exemple, MPF cible au niveau du noyau les condensines et les histones H1 et H3, qui sont impliquées dans la condensation des chromosomes en prophase (Hirano *et al.*, 1997). Aussi, MPF cible les lamines nucléaires, ce qui provoque leur dépolymérisation et donc la rupture de l'enveloppe nucléaire en prométaphase (Peter *et al.*, 1990). D'autres substrats du MPF interviennent au niveau cytoplasmique, par exemple des protéines associées aux microtubules, ce qui permet l'assemblage du fuseau mitotique. Le MPF agit aussi sur des moteurs moléculaires de la famille des kinésines et d'autres protéines liant les microtubules, ce qui permet la séparation des centrosomes (Nigg, 2001).

Dès l'entrée en anaphase, la dégradation de la cycline B s'effectue par protéolyse ubiquitine dépendante du à l'APC qui reconnaît la boîte de destruction (*D-box*) en N-terminale de la protéine. Cette protéolyse est indispensable à l'inactivation du complexe cycline B-CDK1 et permet ainsi la sortie de la mitose (Goltzer *et al.*, 1991).

### 1.3. Phase G0/G1 à la phase S

Les mécanismes qui contrôlent la progression ordonnée de la transition entre les phases G1 à S du cycle cellulaire ainsi que les joueurs impliqués dans cette régulation chez les cellules de mammifères seront présentés dans cette partie du travail.

#### 1.3.1. Les cyclines D

##### 1.3.1.1. Types et rôles de cyclines D

Il existe trois types de cyclines D (D1, D2, D3). Elles sont codées par les gènes *CCND1* (11q13), *CCND2* (12p13) et *CCND3* (6p21). Leur taux d'expression varie selon le type cellulaire (Matsushime *et al.*, 1991). La cycline D1 s'exprime dans la plupart des tissus humains à l'exception des lignées lymphoïdes, et ce, indépendamment des facteurs mitogènes (Ajchenbaum *et al.*, 1993; Matsushime *et al.*, 1991). Les cyclines D2 et D3 sont, quant à elles, majoritairement exprimées dans les cellules hématopoïétiques (Ajchenbaum *et al.*, 1993; Palmero *et al.*, 1993).

Bien que très similaire et ayant des fonctions communes, les différentes cyclines D semblent exercer des rôles distincts. En effet, la distribution des ARNm et les profils d'expression de chacune diffèrent i.e. la cycline D1 s'exprime en phase précoce de G1, la cycline D2 s'exprime plutôt en phase tardive de G1 et la cycline D3 s'exprime en phase S (Lukas *et al.*, 1995, Pestell *et al.*, 1999). Par contre, dans les lymphocytes T humains, la cycline D2 s'exprime en phase précoce de G1 et la cycline D3 en phase tardive de G1 (Ajchenbaum *et al.*, 1993).

L'étude de souris Knockout a permis d'élucider certains rôles spécifiques aux différentes cyclines D, et a permis de mieux comprendre celui des cyclines D en général. Les

souris Knockout d'une cycline D (D1, D2 ou D3) présentent des phénotypes précis sur des tissus spécifiques. En effet, les souris déficientes en cycline D1 présentent un développement neurologique anormal et une hypoplasie de la rétine et des glandes mammaires (Sicinski *et al.*, 1995). Les souris D2<sup>-/-</sup> présentent aussi une anomalie cérébrale (Huard *et al.*, 1999), auquel se rajoutent une détérioration de la prolifération des lymphocytes B (Lam *et al.*, 2000; Solvason *et al.*, 2000), une hypoplasie des cellules  $\beta$  pancréatiques (Kozar *et al.*, 2004) ainsi qu'une anomalie de la granulosa ovarienne (femelle) ou une hypoplasie des testicules (mâle) (Sicinski *et al.*, 1996). Les souris D3<sup>-/-</sup> montrent un désordre dans le développement des lymphocytes T (Sicinska *et al.*, 2003). Deuxièmement, par la sélection d'une seule cycline D (souris double Knockout), l'équipe de Ciemerych (2002) a permis de démontrer que chacune des cyclines D est suffisante à elle seule pour permettre le développement normal de chaque tissu. En effet, les souris se développent normalement jusqu'au jour E17.5 alors que tous les organes et tissus sont développés au 13.5<sup>ème</sup> jours. De plus, les souris D2 et D3 naissent et certaines vivent plusieurs semaines. L'équipe de Kozar (2004) a démontré par l'étude de souris Knockout D1<sup>-/-</sup> D2<sup>-/-</sup> D3<sup>-/-</sup>, que les cyclines D ne sont pas requises pour l'embryogenèse, mais qu'elles sont essentielles pour l'expansion des cellules souches hématopoïétiques multipotentes (CFU-S). En effet, l'analyse du cycle cellulaire hématopoïétique de ces embryons montre qu'il est déficient.

D'autres études ont également démontré que la cycline D2 joue un rôle crucial dans la prolifération des cellules de type B murin (Banerji *et al.*, 2001; Glassford *et al.*, 2001; Mohamedali *et al.*, 2003) et que la cycline D3 est requise et essentielle pour le développement des cellules précurseurs des cellules B (pre-B cell) (Cooper *et al.*, 2006).

### 1.3.1.2. Régulation Transcriptionnelle

L'abondance des cyclines D est largement contrôlée par le taux de transcription du gène. Cette transcription est régulée par plusieurs facteurs de transcription qui sont induits suivant les signaux extracellulaires, les voies de signalisation oncogénique ou les variations physiologiques d'autres protéines cellulaires. Donc, contrairement aux autres cyclines où leur taux d'expression fluctue périodiquement durant la progression du cycle cellulaire, le niveau des cyclines D est contrôlé par l'environnement extracellulaire (Sherr et Roberts, 1999).

Les cyclines D sont les facteurs limitants pour la progression du cycle cellulaire. Sous le contrôle de la voie de signalisation RAS/RAF/MAPK, l'induction des cyclines D (en phase G1) est régulée par la présence de facteurs de croissance (Matsushime *et al.*, 1991), par l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire (Aktas *et al.*, 1997; Revue dans Assoian, 1997; Roover *et al.*, 1999; Schwarts et Assoian, 2001) et par l'intégrité du cytosquelette cellulaire (Huang *et al.*, 1998).

En se liant aux récepteurs à activité tyrosine kinase, les facteurs de croissance ouvrent la voie de signalisation et, en coopérant avec les signaux transmis grâce à l'adhésion cellulaire, induisent la synthèse des cyclines D. L'accumulation des cyclines D durant la phase G1 requiert aussi la présence de facteurs de croissance. En effet, l'accumulation des cyclines D nécessite l'inhibition de la GSK3B (Glycogène Synthase Kinase 3 $\beta$ ) par la PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) et l'activité de PI3K dépend des signaux mitogènes (Alt *et al.*, 2002; Diehl *et al.*, 1998). De plus, la formation du complexe cycline D-CDK4/6 est dépendante des mitogènes i.e. l'absence de ces signaux empêche les cyclines D de s'assembler efficacement aux CDKs lorsqu'elles sont surexprimées (Cheng *et al.*, 1998; Matsushime *et al.*, 1994). Le mécanisme d'induction des cyclines D oblige donc la cellule à rencontrer toutes les conditions requises pour s'engager dans un nouveau cycle cellulaire.

Ainsi, le complexe cycline D-CDK4/6 permet aux cellules de passer de la phase dépendante des mitogènes à la phase indépendante des mitogènes pendant la phase G1, et permet une transition correcte vers la phase de synthèse d'ADN (phase S).

En général, la régulation transcriptionnelle du gène de la cycline D est complexe et implique un grand nombre de protéines. La région promotrice du gène *CCND* contient plusieurs éléments-cis régulateurs. On y retrouve les sites de liaison pour un ensemble de facteurs de transcription incluant Ap1, STAT, Sp1, NFκB et ATF/CREB (Bromberg *et al.*, 1999; Guttridge *et al.*, 1999; Hinz *et al.*, 1999; Joyce *et al.*, 1997; Leslie *et al.*, 2006; Martino *et al.*, 2001; Matsumura *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1996).

Concernant la région promotrice du gène *CCND2* impliquée dans les lignées cellulaires lymphoïdes, plusieurs études montrent qu'elle est formée des sites de liaison pour Ap1, STAT5, Sp1, CREB-1, E2A et BCL6 (Martino *et al.*, 2001; Pestell *et al.*, 1999; Shaffer *et al.*, 2000; White *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2001). Ainsi, la transcription de la cycline D2 (première transcrite dans les cellules B et T), est induite en réponse à divers stimuli incluant des cytokines (Il-2, et Il-7), Ras, des récepteurs activés et par co-stimulation (Appleman *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2000; Martino *et al.*, 2001).

### 1.3.2. CDKs

Les cyclines D peuvent former des complexes avec les CDKs -2, -4, -5, et -6. La kinase CDK4 apparaît comme le partenaire le plus important dans les macrophages et les fibroblastes. CDK6, quant à lui, est l'acteur principal dans la réponse proliférative des lymphocytes T du sang périphérique (Malumbres *et al.*, 2004; Matsushime *et al.* 1994). Par contre, CDK2 se lie aux cyclines D dans le cas précis où les cellules (MEFs) sont déficientes en CDK4/6 (Malumbres *et al.*, 2004). CDK5 est une kinase dépendante des cyclines D uniquement (Xiong *et al.*, 1992), qui est majoritairement exprimée et active dans les cellules du système nerveux (Hellmich *et al.* 1992). Elle se localise au niveau du cytoplasme de la cellule. Les rôles les plus connus pour la CDK5 sont la régulation de la structure du cytosquelette, la régulation des fonctions synaptiques et l'orientation des axones (Dhavan et Tsai, 2001). Il a aussi été démontré que CDK5 pouvait interagir avec la β-caténine, ce qui entraîne la perte d'adhésion cellulaire (Kwon *et al.*, 2000).

Les CDKs font partie d'un groupe de protéines à activité sérine/thréonine kinase conservée chez tous les types cellulaires eucaryotes (Andersen *et al.*, 1997). Dès leur synthèse et dans leur état monomérique, les CDKs sont inactives. En plus d'une liaison aux cyclines, l'activation des CDKs chez les mammifères nécessite plusieurs phosphorylations régulatrices. La plus connue est l'activation par une kinase activatrice des CDKs (CAK).

### 1.3.3. CAK

L'activité d'une CDK pour la progression du cycle cellulaire est régulée à trois niveaux : la liaison à une cycline (unité régulatrice du complexe), des phosphorylations activatrices ou inhibitrices et l'association à des protéines (souvent inhibitrices). Une fois liée à une cycline, la kinase devient accessible à l'action du complexe CAK (CDK activating kinase). Par exemple, lorsque la cycline A se lie à la CDK2, elle modifie l'orientation de l'ATP dans la fente catalytique et provoque un déplacement de la boucle T (Jeffrey *et al.*, 1995 ; Johnson et O'Reilly, 1996). Ainsi, le segment d'activation devient accessible à la CAK. Elle peut alors phosphoryler le résidu thréonine (p-Thr160) de la boucle T (Andersen *et al.*, 1997; Marshal, 1994) permettant le perfectionnement de la liaison du complexe cycline A/CDK2 aux substrats.

La CAK est un complexe enzymatique nucléaire qui permet la stabilisation du complexe cycline/CDK (Jeffrey *et al.*, 1995). La CAK est formée de la kinase CDK7 associée à la cycline H et au facteur p36 (MAT1) (Andersen *et al.*, 1997). La CAK est responsable de la phosphorylation activatrice des kinases CDK1, CDK2 et CDK4/6 en phosphorylant respectivement les résidus Thr161, Thr160 et Thr172 (Andersen *et al.*, 1997; Jeffrey *et al.*, 1995 ; Johnson et O'Reilly, 1996).

CDK7 est lui-même phosphorylé sur le segment d'activation (Thr170 chez l'humain) mais, contrairement aux autres CDKs, cette phosphorylation n'est pas essentielle pour

l'activité de CAK. La présence de Mat1 peut substituer la phosphorylation de Thr170 et c'est suffisant pour l'activation de CDK7/cycline H (Devault *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1995). CDK7 possède un autre site de phosphorylation sur le segment d'activation (Ser164) (Lolli *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 1997). Cette phosphorylation augmente l'activation et la liaison avec la cycline H. *In vitro*, il semblerait que les complexes cycline B1/CDK1 et cycline A/CDK2 phosphorylent CDK7 sur les deux sites, suggérant un rétrocontrôle positif pour la phosphorylation activatrice (Fisher *et al.*, 1995). L'activité de la CAK ne varie pas en fonction du cycle cellulaire (Andersen *et al.*, 1997), mais le niveau transcriptionnel de CDK7 diminue en phase G0 (Poon *et al.*, 1994).

#### 1.3.4. CKIs

L'activité catalytique du complexe enzymatique cycline/CDK peut être inhibée par les CDKs inhibiteurs (CKI) qui réduisent l'activité des CDKs. Deux familles de protéines font partie de cette classe, les Cip/Kip (p21<sup>cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup> et p57<sup>kip2</sup>), qui se lient et inhibent le complexe cycline-CDK contenant soit CDK4/6 ou CDK2 (Sherr et Roberts, 1999; Revue dans Assoian, 1997), et les INK4 (p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c et p19INK4d), qui se lient et inhibent le complexe catalytique CDK4/6 uniquement.

### 1.3.4.1. Cip/Kip

p21<sup>cip1</sup>/p27<sup>kip1</sup> s'associent aux cyclines D, E et A en complexe avec leurs CDKs correspondantes (Cycline D-CDK2 ou 4/6, cycline E-CDK2, cycline A-CDK2). Les Cip/Kip possèdent en N-terminale le domaine de liaison qui inhibe les kinases dépendantes des cyclines et en C-terminale, le domaine de liaison qui inhibe PCNA i.e. p21<sup>cip</sup> interfère sur l'activité de la polymérase  $\delta$  en se liant directement sur PCNA, ce qui inhibe la réplication de l'ADN (Chen *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995; Sherr et Robert, 1995; Waga *et al.*, 1994).

Les Cip/Kip disposent d'un double jeu régulateur dans la progression du cycle cellulaire: ils sont des inhibiteurs importants des complexes cyclines/CDK2 et des régulateurs positifs importants des complexes cyclines D-CDK4/6. Plusieurs études montrent que p21<sup>cip1</sup>/p27<sup>kip1</sup> favorisent la formation du complexe actif cycline D-CDK4/6 en permettant l'assemblage du complexe cycline D-CDK *in vitro* (Blain, *et al.*, 1997; Sherr et Robert, 1999; Zhang *et al.*, 1994). De plus, étant donné que les cyclines ne contiennent pas de séquence consensus de localisation nucléaire, il a été suggéré que le signal de localisation nucléaire (NLS) présent sur p21<sup>cip1</sup>/p27<sup>kip1</sup>, soit responsable de l'accumulation des cyclines D dans le noyau (LaBaer *et al.*, 1997). Cependant, d'autres études suggèrent que p21<sup>cip1</sup>/p27<sup>kip1</sup> agiraient plutôt comme inhibiteur de l'export nucléaire de la cycline D, en empêchant la liaison entre l'exportine CRM1 et le complexe cycline D-CDK4/6 (Alt *et al.*, 2002)

De plus, p21<sup>cip1</sup>/p27<sup>kip1</sup> favoriseraient la migration et la prolifération cellulaire. La présence de facteurs de croissance enclenche la voie de signalisation Ras/PI3K/AKT permettant la phosphorylation des résidus Thr-145 et Ser-146 du NLS de p21<sup>cip</sup> (Rossig *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002). La phosphorylation de la Ser-146 augmenterait la stabilité de la protéine (Li *et al.*, 2002) et la phosphorylation de la Thr-145 inhiberait la liaison p21<sup>cip</sup>-PCNA favorisant alors la réplication de l'ADN (Li *et al.*, 2002). Aussi, p21<sup>cip</sup> issu de l'activation par AKT, n'inhiberait pas le complexe cycline E-CDK2 et activerait les complexes cyclines D-CDK4 (Li *et al.*, 2002). Selon l'équipe de Zhou (2001), ces phosphorylations seraient reliées à un changement de localisation subcellulaire de p21<sup>cip</sup> dans le cytoplasme. Cette localisation cytoplasmique expliquerait son rôle dans la migration cellulaire (voir DISCUSSION pour détails). p27<sup>kip</sup> répondrait sensiblement de la même

manière aux facteurs de croissance. En effet, la phosphorylation du résidu Ser-10 favoriserait l'export nucléaire par CRM1 et augmenterait la stabilité de p27<sup>kip</sup> (McAllister *et al.*, 2003). De plus, étant donné que p27<sup>kip</sup> possède en C-terminale un domaine « scatter » (*Scatter domain*) qui lui permet de se co-localiser avec l'actine F, il peut réarranger le cytosquelette et augmenter la motilité cellulaire (McAllister *et al.*, 2003).

#### 1.3.4.2. INK4

La famille de protéines INK4 comprend p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c et p19INK4d (Sherr et Roberts, 1999). Ces protéines partagent le même motif structural appelé des répétitions ankyrines. Ce motif consiste en des paires d'hélices  $\alpha$  antiparallèles superposées l'une sur l'autre et reliées par un motif en épingle à cheveux (hairpin). Ces domaines structuraux se lient à la région non catalytique de CDK4/6, soit la région opposée au site de liaison des cyclines D, ce qui induit un changement allostérique de CDK4/6 en pivotant de 15° par rapport à l'axe vertical, les deux lobes structuraux de la kinase. Ceci altère le site de liaison aux cyclines D et réduit son affinité à l'ATP (Pavletich, 1999), deux mécanismes qui réduisent fortement l'activité des CDK4/6. De plus, en prévenant la formation du complexe cycline D-CDK4/6, les INK4 forcent la redistribution des Cip/Kip aux complexes cyclines E-CDK2 provoquant la diminution de l'activité kinase de ceux-ci (Jiang *et al.*, 1998; Reynisdottir *et al.*, 1995; Sherr et Roberts, 1999).

### 1.3.5. pRB

L'expression de la cycline D et l'activité obtenue par son association aux kinases sont plus élevées lors de la transition G1/S. L'activation de ce complexe permet, entre autres, la phosphorylation des protéines de la famille du rétinoblastome, pRB (p105RB), p107 et p130 (pocket protein) (revue dans Sherr et Roberts, 1999; Ortega *et al.*, 2002). pRB est une phosphoprotéine nucléaire de 928 acides aminés qui joue un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire i.e. elle empêche la progression du cycle cellulaire en phase G1 en se liant et en altérant l'activité des facteurs de transcription E2F (Sherr et Roberts, 1999; Ortega *et al.*, 2002).

Durant le cycle cellulaire, pRB se présente sous différents états de phosphorylation. En phase G1, pRB est hypophosphorylé. Complexé aux facteurs de transcription, il sert d'activateur de la cycline D en se liant à son promoteur (Muller *et al.*, 1994). En phase G1, les CDKs phosphorylent pRB, ce qui conduit à la dissociation du complexe pRB/E2F et donc à la libération de facteurs E2F actifs. CDK4/6 associé aux cyclines D, initie le processus et permet une activation transcriptionnelle partielle, libérant E2F1, requis pour la synthèse des cyclines E (revue dans Assoian, 1997). Les cyclines E disponibles confèrent l'activité nécessaire aux CDK2. Une phosphorylation supplémentaire de pRB par CDK2/cycline E et CDK2/cycline A, permet la libération complète des facteurs E2F permettant la transcription des gènes essentiels à la progression du cycle vers la phase de synthèse de l'ADN (revue dans Harbour et Dean, 2000; Ortega *et al.*, 2002). Dans les cellules quiescentes (G0) et en cours de différenciation, pRB n'est pas phosphorylée (forme inactive). Jusqu'à présent, la phosphorylation de pRB représentait le mécanisme moléculaire impliqué dans le passage du point de restriction R. Or l'équipe de Martinsson (2005) démontre que la phosphorylation de pRB survient après le point R et qu'il s'agirait plutôt de deux points de contrôle distincts pour la cellule (point R et phosphorylation de pRB).

pRB contient 16 sites potentiels phosphoaccepteurs (Ser/Thr-Pro) (Kaelin, 1999). Les CDKs (CDK-2/-4/-6) activées phosphorylent pRB en des sites spécifiques (Kitagawa *et al.*, 1996; Zarkowska et Mittnacht 1997). Les complexes cyclines D/CDKs reconnaissent les sites

S780, T826 et S795 (Connell-Crowley *et al.*, 1997; Kitagawa *et al.*, 1996; Zarkowska et Mittnacht, 1997). Le motif responsable de la liaison de pRB aux complexes cyclines D/CDKs est situé en position N-terminale des différentes cyclines et consiste en la suite d'acides aminés LXCXE (Dowdy *et al.*, 1993). Contrairement à ce qui a déjà été démontré, le motif LXCXE des cyclines D ne semble pas essentiel à la phosphorylation de pRB (Connell-Croley *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 2001). L'équipe de Baker (2005) rajoute, par contre, que ce motif est essentiel pour la phosphorylation de pRB par la cycline D2, comparativement à la cycline D1 pour laquelle ce motif ne l'est pas.

### 1.3.6. Régulation de la phase G1 et de la transition G1/S

Le complexe cycline D-CDK4/6 aide les cellules à passer le point de restriction R. Une fois ce point franchi, les cellules sont amenées en phase de synthèse d'ADN (S). Deux mécanismes indépendants permettent cette transition. Premièrement, le complexe cycline D-CDK4/6 phosphoryle les protéines de la famille des pRB ce qui résulte en l'activation de E2F1, requis pour la synthèse des cyclines E (revue dans Assoian, 1997). Deuxièmement, le complexe cycline D-CDK4/6 séquestre des CKIs. Les CKIs, ainsi séquestrés, libèrent le complexe cycline E-CDK2 et induisent l'activation de ce complexe (revue dans Sherr et Roberts, 1999).

Ces deux mécanismes permettent au complexe cycline E-CDK2 d'être actif. Pour une transition correcte G1/S et l'initiation de la phase S, le complexe cycline E-CDK2 phosphoryle les protéines de la famille pRB permettant la libération et/ou l'activation, par exemple, des cyclines A. De plus, le complexe cyclin E-CDK2 phosphoryle la protéine inhibitrice p27<sup>Kip1</sup> permettant davantage son activation. En fait, lorsque le processus de séquestration par le complexe cycline D-CDK4/6 diminue le niveau effectif des CKIs sous le point critique, le complexe cycline E-CDK2 facilite son activation en phosphorylant à son tour la protéine p27<sup>Kip1</sup>. De cette façon, la cellule diminue sa dépendance aux facteurs mitogènes pour compléter son cycle cellulaire.

L'accumulation des cyclines D dépend d'une autre voie de signalisation de la GTPase Ras impliquant la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) et l'AKT (protéine kinase B) (revue dans Sherr et Roberts, 1999). Ras et PI3K collaborent pour activer AKT qui régule négativement, par phosphorylation, la glycogène synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Le taux de dégradation des cyclines D est régulé par la phosphorylation d'un seul résidu thréonine (Thr-286 chez la cycline D1, Thr-282 chez la cycline D2) par la GSK-3 $\beta$  (Diehl *et al.*, 1998). En absence de facteur de croissance, il y a dégradation des cyclines D i.e. la GSK-3 $\beta$  active catalyse la phosphorylation du résidu Thr (Thr-286 ou Thr-282) ce qui augmente l'export nucléaire des cyclines D et accélère leur dégradation protéosomale dépendante de l'ubiquitine dans le cytoplasme. La GSK-3 $\beta$  est dans le cytoplasme en phase G1 et entre dans le noyau en phase S (Diehl *et al.*, 1998).

#### 1.4. Expression oncogénique des cyclines D

Les protéines qui permettent la progression du cycle cellulaire, comme les cyclines, sont souvent surexprimées dans les tumeurs primaires alors que les protéines qui ralentissent la division cellulaire, par exemple les CKIs, sont souvent inactivées (Hirama et Koeffler, 1995). De tous les régulateurs du cycle cellulaire impliqués dans le développement du cancer chez l'humain, les cyclines D sont souvent les plus sollicitées. La surexpression des cyclines D a pour effet de raccourcir la durée de la phase G1 diminuant alors la taille des cellules et leur dépendance aux facteurs mitogènes (Ohtsubo et Robert, 1993 ; Quelle *et al.*, 1993 ; Renitzky *et al.*, 1994).

Plusieurs études ont démontré que la cycline D1 est un proto-oncogène et que son amplification et sa surexpression peut contribuer à la croissance cellulaire dans plusieurs tumeurs humaines incluant les lymphomes du manteau, le cancer du sein, les épithéliomes spinocellulaires de la tête et du cou et le cancer de l'œsophage (Donnellan et Chetty 1998; Gillett *et al.*, 1994; Gramlich *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1997).

Plusieurs études tendent à démontrer qu'il y aurait débalancement entre l'amplification du gène et la traduction de la protéine de la cycline D1. Ce débalancement serait causé par la présence d'une version stable de la cycline D1 appelée cycline D1b (Betticher *et al.*, 1995). Cette isoforme est exprimée dans les cellules dérivées de tumeurs de l'œsophage (Lu *et al.*, 2003). La cycline D1b résulte d'un épissage alternatif du gène *CCND1* qui produit un transcrit de 1.7 Kpb. La cycline D1b est tronquée en C-terminale. Elle est réfractaire à la phosphorylation de la GSK3 $\beta$  et donc, de l'export nucléaire causé par la CRM 1. Elle est par ce fait, constitutivement nucléaire. Par contre, elle garde la capacité à se lier et à activer CDK4. Aussi, bien qu'elle soit suffisante pour enclencher la transformation cellulaire dans des NIH/3T3, sa capacité à phosphoryler pRb est faible comparativement à l'isoforme longue (Solomon *et al.*, 2003 ; Lu *et al.*, 2003). De plus, il a été démontré que la surexpression de cette cycline D1b augmentait l'indépendance d'ancrage face aux facteurs mitogènes dans des MEFs primaires cycline D1<sup>-/-</sup> contrairement à la surexpression de la D1 (Holley *et al.*, 2005).

La cycline D2 est amplifiée et surexprimée dans certaines lignées cellulaires de carcinomes colorectaux (Leach *et al.*, 1993). Aussi, la cycline D2 semblerait impliquée dans le cancer gastrique (Takano *et al.*, 1999 ; 2000). En effet, la surexpression de la cycline D2 et de CDK4 est reliée à la progression du cancer et corrèle étroitement avec un mauvais pronostic. Selon Takano *et al.* (2000), la localisation cytoplasmique de la cycline D2 pourrait être en lien avec ces résultats. En effet, Lukas *et al.*, (1995), rapporte que la cycline D2 se localise dans le noyau en phase G1 et qu'à la transition G1/S, elle se distribue à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme, ce qui suggère que la cycline D2 localisée dans le cytoplasme reflète un rôle additionnel, non encore identifié (Tanaka *et al.*, 2002).

La cycline D3 est surexprimée dans plusieurs lignées cellulaires de type gliomes (Donnellan et Chetty, 1998). Elle aurait un rôle dans la transformation cellulaire vers un phénotype malin plutôt que dans l'initiation et la progression de la tumeur, comme il a été décrit pour la cycline D1 (Zhang *et al.*, 2005).

### 1.5. Cycline D2 tronquée

Le rétrovirus murin Graffi a été utilisé comme outil pour générer un modèle d'étude de leucémies chez la souris. Il a été possible d'identifier un nouveau site commun d'intégration virale nommé Gris 1 (site d'intégration 1 du MuLV Graffi). Situé sur le chromosome 6 murin, il se trouve entre 75 et 85 Kpb en amont du gène de la cycline D2 (Fig. 1.1). Les intégrations en Gris 1 activent à la fois l'expression de la cycline D2 (D2) et l'expression d'une protéine tronquée obtenue grâce à un épissage alternatif du gène. Cette isoforme, la cycline D2 tronquée (D2Trc), est activée dans 13% des leucémies induites par le MuLV Graffi (4/30 tumeurs indépendantes étudiées), ce qui montre que la dérégulation de l'expression du gène de la cycline D2 est un événement important dans l'induction de la tumorigenèse (Denicourt *et al.*, 2003).

La dérégulation de l'expression du gène de la cycline D2 a aussi été rapportée dans des leucémies de type T induites par le rétrovirus RadLV/VL3 (Hanna *et al.*, 1993; Tremblay *et al.*, 1992). Dans ce cas-ci par contre, le rétrovirus se localise dans la région promotrice du gène (Tremblay *et al.*, 1992). Dans ces études, 5% des tumeurs ont été réarrangées et l'intégration de ce virus résulte en la surexpression du transcrit majeur de 6.5 Kpb correspondant à l'isoforme normale de la D2. De plus, un transcrit plus court de 1.1 Kpb a été observé (Tremblay *et al.*, 1992). Bien qu'à l'époque il n'a pas été caractérisé, ce transcrit semble correspondre à la D2Trc. L'analyse du transcrit de 1.1 Kpb présent dans la tumeur 133-1 induite par RadLV/VL3, a démontré que ce transcrit s'hybride fortement à une sonde formée de l'intron 2 du gène de la cycline D2 (Denicourt, 2002 (résultat non montré)). Ces résultats suggèrent que l'intégration rétrovirale en 5' du gène de la cycline D2 dérégule l'expression du gène et induit, entre autre, l'expression d'un transcrit obtenu suite à un épissage alternatif correspondant à la D2Trc (Denicourt, 2002).

### 1.5.1. Structure et Fonction

La D2Trc est une protéine de 156 acides aminés. Comparativement à l'isoforme normale du gène, la D2Trc résulte d'un épissage alternatif dû à l'utilisation d'un site donneur d'épissage alternatif localisé dans l'intron 2 du gène de la cycline D2. De cette façon, elle est codée par l'exon 1, suivi de l'exon 2 plus long (exon 2+) et finalement par un exon 3' alternatif qui contient un nouveau signal poly-A (AATAA). L'isoforme formée possède 20 acides aminés différents (137<sup>ième</sup> à 156<sup>ième</sup> a.a. inclusivement) et une terminaison prématurée de la protéine (codon stop juste après le 156<sup>ième</sup> résidu). La protéine représente donc une cycline D2 avec une boîte cycline tronquée (Fig. 1.2A et 1.2B).

Comparativement à la D2, il lui manque 133 acides aminés, incluant les derniers 21 acides aminés de la boîte cycline. À cet endroit par contre, elle possède une nouvelle séquence de 20 acides aminés. Dans cette région, la D2Trc a conservé certains acides aminés : L143, L146, P155 et H156; juste à la fin de la boîte cycline, suggérant que ces résidus peuvent avoir un important rôle fonctionnel probablement dans la formation du complexe avec les CDK4/6 ou avec d'autres partenaires (Fig. 1.3).

### 1.5.2. Caractéristiques *in vivo*

Bien qu'il soit présent dans des tumeurs causées par des rétrovirus chez la souris (Graffi, RadLV/VL3 (Tremblay *et al.*, 1992)), l'isoforme tronquée de la cycline D2 apparaît dans certains tissus normaux de différents organismes suggérant un important rôle cellulaire pour cette protéine. Par exemple, chez la souris, la protéine tronquée est majoritairement exprimée dans le cerveau et les ovaires mais à un niveau plus faible que ce qui est observé dans les tumeurs Gris 1 (Denicourt, 2002). Chez *Xenopus laevis*, un transcrite similaire et codant aussi pour une cycline D2 tronquée a été isolé d'une banque d'ADNc d'ovaires (Taïeb et Jessus, 1996). Chez l'humain, on retrouve son expression dans les tissus normaux de cerveau mais à un degré plus faible que dans les tumeurs glioblastomes et oligodendrogliomes (dépendamment du degré de la tumeur) (Denicourt, 2002).

### 1.5.3. Caractéristiques *in vitro*

La D2 est un proto-oncogène qui anormalement activée ou surexprimée peut contribuer à la transformation cellulaire (Malumbres et Barbacid, 2001). Tout comme la D2, la D2Trc semble jouer un important rôle tumorigène. Plus encore, elle semble révéler des capacités oncogéniques plus élevées que l'isoforme normale (Denicourt, 2002). Exprimées de façon exogène avec un Ha-Ras activé, les deux isoformes normale et tronquée de la cycline D2 induisent un phénotype transformé chez les MEFs primaires. Par contre, le nombre de foyers obtenus lors de la co-expression de l'isoforme tronquée avec un Ha-Ras activé est beaucoup plus important qu'en présence de la D2 et comparable à ce qui est observé lors de la co-expression de c-Myc avec un Ha-Ras activé (Denicourt, 2002).

La majorité des cellules dérivées des foyers transformés où la D2Trc est exprimée sont multi-nucléées. Ces cellules ont une perte de l'inhibition de contact, ce qui suggère que la capacité de la D2Trc à transformer les MEFs primaires soit due à une altération de l'adhésion cellulaire. Puisque ces cellules expriment faiblement la D2, il a été suggéré qu'il y ait

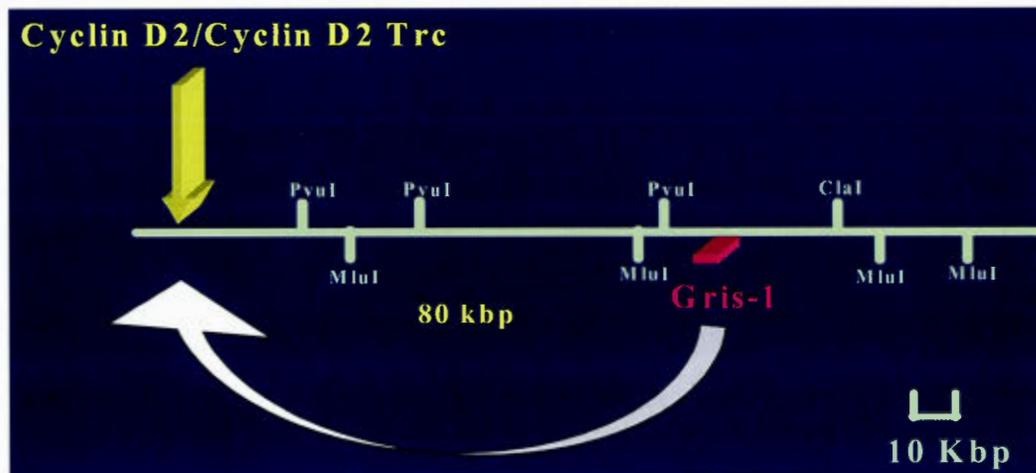
possiblement une sélection contre l'établissement de lignées cellulaires exprimant un haut degré de D2Trc. Il a aussi été suggéré qu'une forte expression de la D2Trc inhibe complètement l'adhésion cellulaire (Denicourt, 2002).

La cycline D1, lorsque surexprimée, induit l'indépendance d'ancrage de la progression du cycle cellulaire des cellules NIH/3T3 et Rat 1 (Schulze *et al.*, 1996). Il est donc suggéré que la D2Trc soit capable d'influencer l'adhésion cellulaire en interagissant avec le même, aujourd'hui inconnu, partenaire de la D2 puisqu'elles partagent la même séquence d'acides aminés pour la majeure partie de la boîte cycline (Denicourt, 2002).

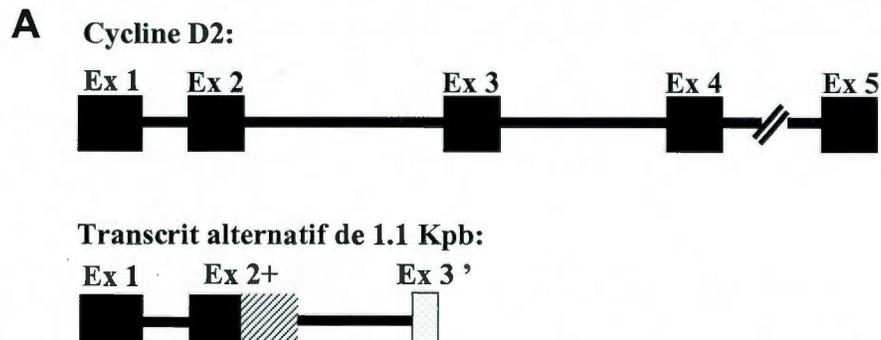
La D2Trc est localisée dans le cytoplasme des cellules NIH/3T3, jamais dans le noyau. Les cyclines D s'accumulent dans le noyau durant la phase G1 et en disparaissent lorsque la cellule entre dans la phase de synthèse de l'ADN. Il a été démontré que le mutant de la cycline D1, D1T156A, se retrouve uniquement dans le cytoplasme des cellules NIH/3T3, bien qu'il garde son habileté à interagir avec CDK4. Le résidu Thr-156 (cycline D1) semble important à la fois pour la localisation nucléaire et pour l'activation du complexe formé avec sa CDK (Diehl et Sherr, 1997). Chez la D2, le résidu T156 de la cycline D1 correspond à T154. Cependant, ce résidu n'est pas conservé chez la D2Trc. Ce qui pourrait expliquer en partie la localisation cytoplasmique de la D2Trc. La D2Trc interagit avec CDK4 lorsque surexprimée dans les cellules NIH/3T3 (Denicourt, 2002). Elle possède la majorité de la boîte cycline intacte, ce qui est responsable et suffisant pour son interaction avec la CDK4.

L'expression des cyclines D est dépendante de stimulations mitogènes continues. Dans les cellules hématopoïétiques de la lignée 32Dcl3, la D2 est exprimée dans les cellules en prolifération et cette expression dépend de la présence de IL-3. Aussi, l'expression et le niveau de la D2 déclinent rapidement lorsque IL-3 est enlevé (Denicourt, 2002). Il a été démontré que l'expression et la stabilité de la D2Trc dépendent de la présence de stimuli mitogènes IL-3, dans la lignée cellulaire 32Dcl3. Ceci suggère que l'expression des deux transcrits 6.5 et 1.1 Kpb du gène de la cycline D2 est contrôlée par les mêmes éléments de régulation qui sont activés par des facteurs de croissance.

Le site spécifique de phosphorylation catalysé par GSK-3 $\beta$  des cyclines D1 et D2 est respectivement le résidu thréonine 286 (Thr286) et 282 (Thr-282). Celui-ci est critique pour maintenir la présence ou l'absence de ces cyclines D durant le cycle cellulaire (Diehl et Sherr, 1997; Diehl *et al.*, 1998). Bien que la D2Trc ne possède pas ce résidu (Thr-282), il a été démontré que la stabilité de cette isoforme dépend de la présence de facteurs de croissance (Denicourt, 2002). Il est possible que la dégradation de la D2Trc soit dépendante de la phosphorylation d'un autre résidu.



**Figure 1.1 : Représentation schématique de l'insertion provirale en Gris 1 chez la souris.** Les insertions provirales en Gris1 sont localisées à 80 Kpb en amont du gène de la cycline D2. Gris1 est le site d'intégration du rétrovirus Graffi dans 13% des tumeurs analysées. L'expression des deux isoformes (normale et tronquée) du gène de la cycline D2 se trouve dérégulée (surexprimée) sous l'influence de l'intégration rétrovirale.



**B**

1 <sup>Ex 1</sup> GTTCGGAGGGAAGGACCGGTGCGAGTCAGGCGGCCCTTGAGGCTCCGCTCGCCACCTTC  
61 CACTCTTCTCTCTCTCTCTCTCCCTCTCTCTCTTTGCCAFTTCTTTCCCTCTCCAAATCTCC  
121 CATT CAGCCAAAGGAAGGAGSTAAGGGAAGCACTCCCCGACCCCCCGCACCTCCAAAAA  
181 ATAATAATAATAAAAAAAAAATTTACAGTCGGGACCGAGTGGTGGCCGGCTGGCTATGGAGC  
M E L  
241 TGCTGTGCTGCGAGGTGGACCCGGTCCGCGAGGGCCGCGCCGACCGCAACCTGCTGGAAG  
L C C E V D P V R R A A P D R N L L E D  
301 ACCCGGTTCTGCAGAACCTGTTGACCATCGAGGAGCGCTACCTCCCGCAGTGTTCCTATT  
R V L Q N L L T I E E R Y L P Q C S Y F  
361 TCAAGTGCCTGCAGAAGGACATCCAACCGTACATGCGCAGGATGGTGGCCACCTGGATGC  
K C V Q K D I Q P Y M R R M V A T W M L  
421 <sup>Ex 2+</sup> TAGAGGTCTGTGAGGAACAAAGTGTGAAGAAGAGGTCTTTCTCTGGCCATGAATTACC  
E V C E E Q K C E E E V F P L A M N Y L  
481 TGGACCGTTCCTTGGCTGGAGTCCCGACTCCTAAGACCCATCTTCAGCTCCTGGGTGCAG  
D R F L A G V P T P K T H L Q L L G A V  
541 TGTGCATGTTCTTAGCTTCCAAGCTGAAAGAGACCATCCCGCTGACTGCGGAAAAGCTGT  
C H F L A S K L K E T I P L T A E K L C  
601 GCATTACACCGACAACCTCTGTGAAGCCCCAGGAGCTGCTGGTAAATGCCGCCCTCCCTGC  
I Y T D N S V K P Q E L L V M P P S L L  
661 TCCTGACTCTGCCCTTCCCCATCACACTAAGGCCGCCACACTAACCAAGACTGTAAGAAA  
L T L P F P I T L R P P H \*  
721 AAAAAAAAAAGATGTCCTTTAGTAGGAGAGAGCTAGTCTTCCACATCAGGGAGTGAGCAA  
761 AGCTATCAGTGCCCTCATGAAATTCATGAGGGTGAATTCGTGTGTGTGTGGGTGGGG <sup>Ex 3'</sup>  
841 GGGGGGCATAAATAGAATATCTAGTTAATGATGTTATAATTAATGTCCAGATTCCACT  
901 GAACCCTGAGAACACGGTCTGATTTCTCACATTCTAGTTTGTGTGTTTCCCAAGACCT  
961 GGAGGTGTAACAGGTAATGTCTTAAAGACCATAAATGGTCATGGACAACTTAAAAAAA  
1021 AAAAAAAAAA

**Figure 1.2 : Représentation schématique de l'ADNc de l'isoforme normale et obtenue après épissage alternatif du gène *CCND2*.** (A) Les boîtes foncées représentent les cinq exons (EX 1-5) de la D2. L'isoforme de 1.1 Kpb contient les exons 1 et 2 de l'isoforme normale. Les boîtes hachurées et pointillées représentent les régions rajoutées suite à l'épissage alternatif et proviennent de l'intron 2 du gène. (B) Séquence nucléotidique de l'ADNc de 1.1 Kpb, et la séquence en acides aminés déduite. Le point de départ de ces trois exons est indiqué par une flèche. La tête de flèche indique la fin de l'exon 2 du transcrit de 6.5 Kpb. Le signal consensus de polyadénylation est encadré. Figure tirée de l'article de Denicourt *et al.*, 2003.

Trc	<b>MELLCEVDPVRRVPDRNLLDRVLQNLITIEERYLPQCSYFKCVQKDIQPYMRRMVAT</b>	60
D2	<b>MELLCEVDPVRRVPDRNLLDRVLQNLITIEERYLPQCSYFKCVQKDIQPYMRRMVAT</b>	60
trc	<b>WMLEVCEEQKCEEEVFPLAMNYLDREFLAGVPTPKTHLQLLGAVCMELASKLKETIPLTAE</b>	120
D2	<b>WMLEVCEEQKCEEEVFPLAMNYLDREFLAGVPTPKTHLQLLGAVCMELASKLKETIPLTAE</b>	120
Trc	<b>KLCIYTDNSVKPQELLVMPPSLLTLPFPITLRPPH</b> -----	156
D2	<b>KLCIYTDNSVKPQELLEWELVVLGKIKWNLAAVTPHDFIEHILRKLPOQKEKLSLIRKHA</b>	180
	↑	
Trc	-----	
D2	QTFIALCATDFKFMYPSPMIATGSVGAAICGLQDDEVNTLTCDALTELLAKITHTDVD	240
Trc	-----	
D2	CLKACQEQIEALLNSLQQFRQEQHNAGSKSVEDPDQATTPTDVRDVDL	289

**Figure 1.3 : Comparaison de la séquence en acides aminés de l'isoforme tronquée (D2Trc) et de l'isoforme longue (D2).** Les premiers 136 résidus sont codés par la même séquence. Une flèche indique la fin de la boîte cycline. Les boîtes foncées indiquent les régions identiques. Les pointillées représentent les acides aminés manquants. Figure tirée de l'article de Denicourt *et al.*, 2003.

### 1.6. Hypothèses de travail

Connaissant la position stratégique des cyclines D dans la progression du cycle cellulaire, il devient indispensable de comprendre les cascades d'interactions enclenchées avec tous les partenaires protéiniques environnants, tant proto-oncogéniques que oncogéniques. La D2Trc semble elle aussi être importante dans la progression du cycle cellulaire et également dans l'induction de la tumorigenèse. Connaître l'implication de cette isoforme dans les voies de signalisation régulant la prolifération cellulaire est donc fondamentale pour la compréhension de ses effets biologiques sur la cellule.

L'objectif principal de cette étude est d'approfondir la caractérisation de la fonction de D2Trc en étudiant les régions divergentes de la D2Trc par rapport à l'isoforme normale (D2). Pour cela, nous avons généré plusieurs protéines mutantes.

Puisque la D2Trc se localise uniquement dans le cytoplasme, la région C-terminale de l'isoforme normale est potentiellement impliquée dans la localisation nucléaire de cette protéine. L'utilisation des protéines mutantes (D2 $\Delta$ 157à289 et D2Trc $\Delta$ 137à156) ciblant cette région nous aidera à confirmer cette hypothèse.

Sachant que la D2Trc garde sa capacité de se lier à la kinase CDK4, cela suggère que les résidus conservés (L143, L146, P155 et H156) de la région C-terminale de sa boîte cycline, peuvent avoir un important rôle fonctionnel, probablement dans la formation du complexe avec les CDK4/6 ou avec d'autres partenaires. Des délétions progressives des régions comprenant ces différents résidus (D2 $\Delta$ 157à289, D2Trc $\Delta$ 151à156, D2Trc $\Delta$ 147à156 et D2Trc $\Delta$ 137à156) vont nous permettre de répondre à cette question.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1. Mutagenèse dirigée, délétion progressive et séquençage des différents mutants

##### 2.1.1. Mutagenèse dirigée

Le mutant D2TrcT151A de la D2Trc et celui de la D2 délétée de ces 133 a.a. en C-terminale (D2 $\Delta$ 157à289) ont été produits en suivant le protocole décrit dans Benchmarks (1997) "*Modification of a PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Method*". Les mutants ont été obtenus à partir des constructions Trc-pBluescript II KS+ (HindIII-XbaI) et D2-pBluescript II KS+ (HindIII-XbaI). Les amorces utilisées sont respectivement: 5'-pcga tgg gga agg gca gag tca-3' et 5'-pcac taa ggc cgc cac act aa-3'; 5'-ptta gtg agg ggt gac tgc ggc cag g-3' et 5'-gcc acc gcg gtg gag cgc caa ttc-3'.

##### 2.1.2. Délétions progressives

Les délétions progressives de la région C-terminale de la boîte cycline de la D2Trc ont été réalisées par PCR. Le plasmide contenant l'ADNc de la D2Trc de souris (Trc-pBluescript II KS + clonée en HindIII-XbaI) a été utilisé comme ADN matriciel. L'amorce 1 (5'-pcga ggt cga cgg tat cga taa-3') s'hybride à la région 5' de l'ADNc (N-terminal) et est utilisée pour chacune des délétions. L'amorce X (2 (5'-patg aat tct tac ggc ctt agt gtg atg gg-3'), 3 (5'-patg aat tct tag atg ggg aag ggc aga gt-3'), 4 (5'-patg aat tct tac aga gtc agg agc agg ga-3'), 5 (5'-patg aat tct tac agg gag ggc ggc att ac-3') ou 6 (5'-patg aat tct tac agc agc tcc tgg ggc-3')) ajoute un codon de terminaison à l'endroit précis dans la région 3' du cDNA (C-terminal) de la D2Trc. Les couples d'amorces suivantes (1 et 2; 1 et 3; 1 et 4; 1 et 5; 1 et 6) ont été

utilisés respectivement pour produire les protéines D2Trc $\Delta$ 155à156, D2Trc $\Delta$ 151à156, D2Trc $\Delta$ 147à156, D2Trc $\Delta$ 143à156 et D2Trc $\Delta$ 137à156.

### **2.1.3. Séquençage**

Les produits de ligation ont été transformés dans les bactéries compétentes DH5 $\alpha$ . Pour le séquençage, les plasmides recombinants ont été isolés de la biomasse suivant le protocole de lyse alcaline de QIAGEN Miniprep. Ensuite, les plasmides ont été ultérieurement envoyés au séquençage (Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, Montréal).

### **2.2. Lignée cellulaire, conditions de culture et transfections**

Les fibroblastes murins NIH/3T3 (ATCC) ont été mis en culture dans du milieu modifié Eagle's medium (GIBCO) enrichi de 10% de sérum de veau (GIBCO). Toutes les transfections ont été réalisées en utilisant le matériel et suivant le protocole de Polyfect (QIAGEN).

### **2.3. Localisation cellulaire**

Pour étudier la localisation cellulaire de la D2Trc, les mutants produits (D2 $\Delta$ 157à289 et D2Trc $\Delta$ 137à156) ont été clonés dans un vecteur d'expression de mammifère contenant la protéine EGFP de 26 Kda, soit le vecteur pEGFP-C1 (Clontech). Les fragments obtenus ont été fusionnés à l'extrémité C-terminale de la protéine EGFP. Les constructions Trc-pEGFP-C1 et D2-pEGFP-C1 ont été utilisées comme contrôle. La protéine D2 $\Delta$ 157à289 a été clonée en NaeI-SacII alors que D2Trc $\Delta$ 137à156 a été clonée en NaeI-EcoR1 pour s'assurer qu'elles

soient dans le même cadre de lecture que la protéine EGFP (BglII *blunt* par la S1 nucléase et SacII ou EcoR1).

Toutes les constructions ont été transfectées dans les cellules NIH/3T3 (ATCC) et la localisation de ces protéines mutantes a été examinée à l'aide d'un microscope à fluorescence confocale sur des plaques de 4 puits (LABTEK).

## 2.4. Immunoprécipitation et immunotransfert des protéines intactes et mutantes

### 2.4.1. Choix du vecteur d'expression

Pour vérifier les régions impliquées dans la liaison entre D2Trc et la kinase CDK4, les mutants produits (D2 $\Delta$ 157à289, D2Trc $\Delta$ 151à156, D2Trc $\Delta$ 147à156, D2Trc $\Delta$ 137à156) ont été clonés dans un vecteur d'expression de mammifère contenant l'épitope myc en N-terminale du MCS (Multiple cloning site), soit le vecteur pCMV-myc (Clontech). Les constructions D2Trc-pCMV-myc et D2-pCMV-myc ont été utilisées comme contrôle positifs.

La protéine D2 $\Delta$ 157à289 a été clonée en NaeI-Sfi1b (*blunt* par la Klenow), les gènes des protéines D2Trc $\Delta$ 151- 147- 137- à156 ont été clonés en NaeI-EcoR1 et les contrôles (D2, D2Trc) ont été clonés en NaeI-Not1 pour s'assurer qu'ils soient lus tous dans le même cadre de lecture que l'épitope myc (pCMV-myc digéré par Sfi1b-EcoR1f, Sfi1b-EcoR1 et Sfi1b-Not1, respectivement (*blunt* et *Fill in* par la Klenow). Toutes les constructions ont été transfectées dans les cellules NIH/3T3.

### 2.4.2. Immunoprécipitation

Les cellules NIH/3T3 ( $10^6$ /pétri de 100 cm) transfectées à l'aide des différentes constructions, ont été lysées 24 h après les transfections dans le tampon d'immunoprécipitation (Tampon IP) contenant 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 et d'un mélange complet d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les lysats ont été séparés par centrifugation à 10 000 X g pendant 5 min. Les surnageants ont été traités durant 4 h à 4°C à l'aide de billes à protéines G-Sepharose (Amersham Bioscience) recouvertes d'une quantité saturée d'anticorps anti-CDK4/6 (Santa-Cruz sc-601). Les protéines immunoprécipitées sur les billes ont été lavées 5 fois avec 1 ml de Tampon IP. Les billes ont été resuspendues dans du tampon de chargement 2X (30% glycérol, 4% SDS, 160 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10%  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0.02% de bleu de bromophenol) et chauffées durant 10 min à 95°C. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées sur gel 12% de polyacrylamide en présence de SDS et électro-transférées sur membrane Immobilon-P PVDF (Millipore).

### 2.4.3. Immunotransfert

Pour les analyses d'immunotransfert, les protéines ont été solubilisées à l'aide du tampon RIPA (150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH8) et les concentrations protéiques des différents extraits ont été mesurées à l'aide de Bio-Rad protein assay. 30 à 80  $\mu$ g de protéines ont été resuspendues dans du tampon de chargement 2X (30% glycérol, 4% SDS, 160 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10%  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0.02% de bleu de bromophenol) puis chauffées durant 3 min. à 95 °C. Les protéines ont été séparées sur gel 12% de polyacrylamide en présence de SDS et électro-transférées sur membrane Immobilon-P PVDF. Les membranes ont ensuite été imbibées à l'aide de PBS contenant 0.2% Tween-20 et 4% de lait en poudre écrémé (PBS-Tween-lait) durant 1 h à température pièce. Après l'incubation d'une heure avec l'anticorps correspondant (dilution 1:5000 dans PBS/Tween/lait), les membranes PVDF ont été lavées

dans du PBS contenant 0.2 % Tween-20 (PBS/Tween) et incubées 1 h avec l'enzyme peroxydase couplée à un l'IgG anti-lapin (dilution 1:5000 dans PBS/Tween/lait) (BD Pharmingen). Les complexes immuns ont été révélés par chemiluminescence en utilisant la trousse ECL plus (Amersham Biosciences).

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

#### 3.1. Construction des mutants

La D2Trc résulte d'un épissage alternatif du gène *CCND2*. Elle est composée que de 156 acides aminés (comparativement à 289 a.a. chez la D2). De plus, des 20 derniers acides aminés formant la région C-terminale de sa boîte cycline (a.a. 137 à 156 de la D2Trc), seulement 4 sont conservés (L143, L146, P155, H156). La D2Trc s'exprime dans certains tissus normaux (cerveau, ovaires) et est surexprimée dans différents types de cancers du cerveau chez l'humain (glioblastome, oligodendrogliome). Elle semble donc importante dans la progression du cycle cellulaire et dans l'induction de la tumorigenèse. Nous savons que son expression dépend de facteurs mitogènes malgré l'absence du résidu Thr-282 connu comme étant responsable de la présence et de l'absence des cyclines D. De plus, contrairement à la D2, la D2Trc se localise dans le cytoplasme des cellules et sa capacité de transformation est très supérieure à celle de la D2. Il devient alors intéressant d'associer ces fonctions aux régions de la D2Trc i.e. de caractériser cette protéine tronquée. Pour ce faire, nous avons produit différents mutants à partir de la D2 et de la D2Trc pour ensuite les soumettre à différents tests de fonctionnalité. Ainsi, nous avons pu cibler certaines régions responsables des différences entre la D2 et la D2Trc.

La figure 3.1 montre une représentation schématique des différentes constructions générées. La spécificité de chacune d'elles, c'est-à-dire la mise en évidence des différents résidus de la D2Trc, est décrite ci bas.

### **3.1.1. Spécificité de chacune des constructions**

#### **3.1.1.1. Mutant de la D2**

Le mutant D2 $\Delta$ 157à289 (Fig. 3.1A) représente la cycline D2 normale déléetée de la région C-terminale de la protéine, à l'endroit où se termine la D2Trc. Cette construction a été faite afin d'évaluer l'importance de la région C-terminale de la cycline D2 (a.a. 157 à 289 de la D2) qui est déléetée chez la D2Trc. De plus, cela permet également de mettre en évidence la fonction de la région C-terminale de la boîte cycline de la D2 (a.a. 137 à 156 de la D2) qui diffère de celle de la D2Trc (a.a. 137 à 156 de la D2Trc).

#### **3.1.1.2. Mutants de la D2Trc**

##### **Mutant ponctuel**

Une mutation ponctuelle de la D2Trc au niveau de la thréonine 151 changée pour une alanine (D2TrcT151A) a pour but de vérifier si cette thréonine est ciblée par la GSK3 $\beta$  comme c'est le cas pour de la thréonine 282 de la D2 (Fig. 3.1B). La GSK3 $\beta$  phosphoryle la Thr-282 chez la D2, ce qui permet son exportation dans le cytoplasme en vue de sa dégradation dépendante des mitogènes. Bien que la Thr-282 soit absente de la D2Trc, la partie C-terminale de sa boîte cycline contient 2 thréonines (T145 et T151) qui peuvent potentiellement jouer ce rôle. En effet, la D2Trc semble aussi sensible aux facteurs de croissance puisque son expression répond à IL-3 dans la ligne cellulaire 32Dcl3. De plus, étant donné que la dégradation des protéines s'effectue majoritairement dans le cytoplasme par le protéasome, il devient intéressant de vérifier si en plus de l'influence sur la dégradation, cette mutation entraînerait aussi la localisation de cette protéine (D2TrcT151A) dans le noyau.

### Délétions progressives

On retrouve ensuite la succession de délétion de groupes d'acides aminés de la région C-terminale de la boîte cycline de l'isoforme courte (a.a. 137 à 156 de la D2Trc) (Fig. 3.1B). Nous avons cerné les différents groupes de résidus à déléter afin de cibler des régions d'intérêt. Chacune des délétions renferme des aminoacides conservés chez la D2 et/ou des résidus susceptibles d'influencer la structure tertiaire ayant possiblement, comme conséquence, d'influencer les liaisons protéiques de la D2Trc. Dépendamment des résultats obtenus et des régions d'intérêt ciblées, la sélection de résidus spécifiques pourra alors être faite et éventuellement analysée.

Ainsi, D2Trc $\Delta$ 155à156 permet de vérifier l'importance des deux derniers acides aminés conservés de la boîte cycline (P155 et H156).

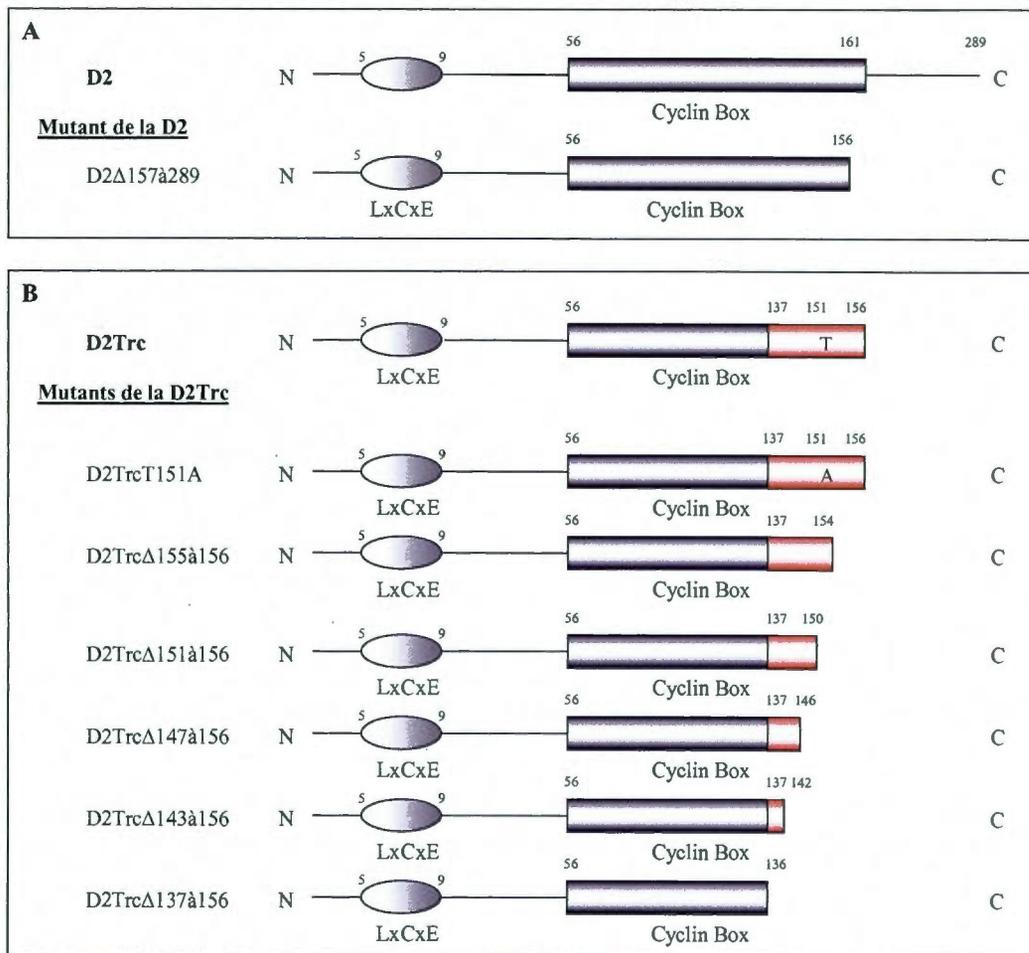
Le mutant D2Trc $\Delta$ 151à156 mesure à la fois l'importance de la thréonine 151 et du résidu responsable de la charge positive de la région C-terminale de la boîte cycline de D2Trc, soit l'arginine (R153). En effet, la D2 détient une charge générale neutre pour la région C-terminale de sa boîte cycline. Or, cette même région sur la D2Trc est de charge positive dû au résidu R. Ceci peut alors changer les interactions protéiques et donc modifier ses fonctions.

D2Trc $\Delta$ 147à156 est délétée de deux prolines, celles-ci pouvant être responsables d'un changement de conformation tridimensionnelle de la région C-terminale de la boîte cycline. L'élimination des repliements possiblement formés peut permettre la réexposition de résidus qui sont peut-être responsables de certaines fonctions de la D2, mais qui sont, chez la D2Trc, inatteignables dû à la conformation induite par les prolines.

La protéine D2Trc $\Delta$ 143à156 offre la possibilité de mettre en évidence, la pertinence de la thréonine 145 et celle des deux leucines conservées (L143, L146). La thréonine 145 peut être responsable de la dégradation protéosomale de la D2Trc et/ou responsable de la liaison entre D2Trc et CDK4.

Finalement, dans le but d'évaluer la pertinence de la région C-terminale de la boîte cycline de l'isoforme tronquée, le mutant D2Trc $\Delta$ 137à156 représente la protéine délétée de

ses 20 derniers acides aminés (a.a. 137 à 156). Ainsi, cette protéine nous permet de comparer la pertinence des 20 acides aminés de la boîte cycline nouvellement formée.



**Figure 3.1 : Représentation schématique des isoformes (normale et tronquée) du gène de la cycline D2 et des protéines mutantes créées par PCR. (A) Mutant de la D2. Le rectangle gris qui contient les acides aminés 56 à 161 représente la boîte cycline. (B) Mutants de la D2Trc. Les 136 premiers acides aminés restent inchangés comparativement à la cycline D2. La région rouge correspond à la région C-terminale de la boîte cycline qui distingue l'isoforme tronquée de l'isoforme normale. La construction de ces mutants est décrite dans la section Matériel et Méthodes. Les localisations de la boîte cycline et de la région LxCxE sont représentées respectivement par un rectangle et un ovale.**

### **3.2. Régions impliquées dans la localisation nucléaire des protéines**

Les cyclines de type D s'accumulent dans le noyau durant la phase G1 et en disparaissent lorsque les cellules entrent en phase S. Puisque la D2Trc se localise uniquement dans le cytoplasme (Denicourt, 2002), la région C-terminale de l'isoforme normale (a.a.157 à 289 de la D2) a été soupçonnée d'être impliquée dans la localisation nucléaire de cette protéine.

#### **3.2.1. La région C-terminale de la D2, qui comprend les a.a. 157 à 289 n'est pas impliquée dans la localisation nucléaire de la protéine.**

Pour vérifier la région responsable de la localisation nucléaire des protéines, nous avons fusionné la EGFP aux protéines mutantes générées, et observé leur localisation cellulaire à l'aide d'un microscope de fluorescence à balayage confocal. Ainsi, nous avons pu localiser dans la cellule, les produits d'expression des mutants, à l'aide de la lumière fluorescente verte émise par les constructions transfectées.

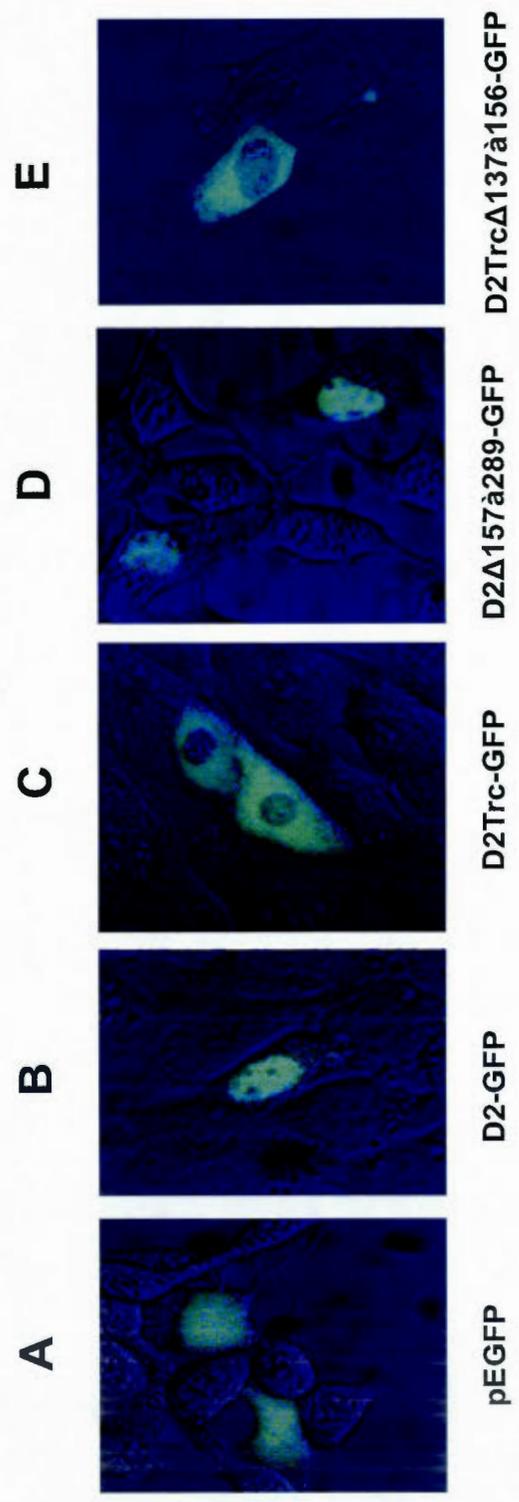
Nous observons à la figure 3.2A, le résultat attendu de la localisation cellulaire de la EGFP seule i.e. elle diffuse partout dans la cellule. Ensuite, conformément à ce qui a déjà été démontré (Denicourt, 2002), nous observons une concentration de la fluorescence dans le noyau représentant la localisation nucléaire de la D2 (Fig. 3.2B), et dans le cas de la D2Trc, la fluorescence est dans le cytoplasme (Fig. 3.2C). Nous observons la localisation cellulaire du produit d'expression de la D2 $\Delta$ 157à289-GFP, qui fluoresce dans le noyau (Fig. 3.2D). Et finalement, nous observons la localisation cellulaire du produit d'expression de la D2Trc137 $\Delta$ 156-GFP, qui se localise dans le cytoplasme (Fig. 3.2E).

Comme le produit d'expression de la D2 $\Delta$ 157à289-GFP se localise dans le noyau (Fig. 3.2D), il nous est possible d'affirmer que cette région (a.a. 157 à 289) n'est pas requise pour la localisation nucléaire de la protéine. En effet, l'absence de la région C-terminale de la protéine (correspondant à la région déléetée de la D2Trc) n'empêche pas une localisation

nucléaire de la D2 $\Delta$ 157-289-GFP. Ceci suggère que l'information pour la localisation nucléaire de la cycline D2 est contenue dans la région N-terminale de la protéine (résidus 1-156). Donc, l'absence de la région C-terminale de la D2Trc (résidus 157-289) ne serait pas responsable de la localisation cytoplasmique de celle-ci.

### **3.2.2. La région C-terminale de la boîte cycline de la D2 est nécessaire à la localisation nucléaire de la protéine.**

L'utilisation de la protéine mutante D2Trc $\Delta$ 137-156 nous permet de démontrer que la région C-terminale de la boîte cycline de la D2Trc ne contient pas l'information nécessaire à la localisation subcellulaire de la protéine. En effet, le produit d'expression de la D2Trc $\Delta$ 137-156-GFP se localise au même endroit que la D2Trc native, soit dans le cytoplasme (Fig. 3.2C et E). De plus, étant donné que la cycline D2 normale amputée des résidus 157 à 289 (D2 $\Delta$ 157-289-GFP) (Fig. 3.2D) continue à se localiser au noyau, ceci renforce l'idée que la région C-terminale de la boîte cycline (a.a. 137 à 156) est nécessaire à la localisation nucléaire de la protéine.



**Figure 3.2 : Localisation subcellulaire de D2 $\Delta$ 157à289-GFP et D2Trc $\Delta$ 137à156-GFP dans les cellules NIH/3T3.** Les cellules NIH/3T3 ont été transfectées avec le vecteur pEGFP-C1 (A) (contrôle), D2-GFP (B), D2Trc-GFP (C), D2 $\Delta$ 157à289-GFP (D) et D2Trc $\Delta$ 137à156-GFP (E). Ces vecteurs permettent l'expression de protéine de fusion avec la EGFP. N=3 et observation de plus de 50 champs par type de protéines.

### 3.3. Région de la boîte cycline responsable de la liaison entre CDK4 et des différentes isoformes (normale et tronquée)

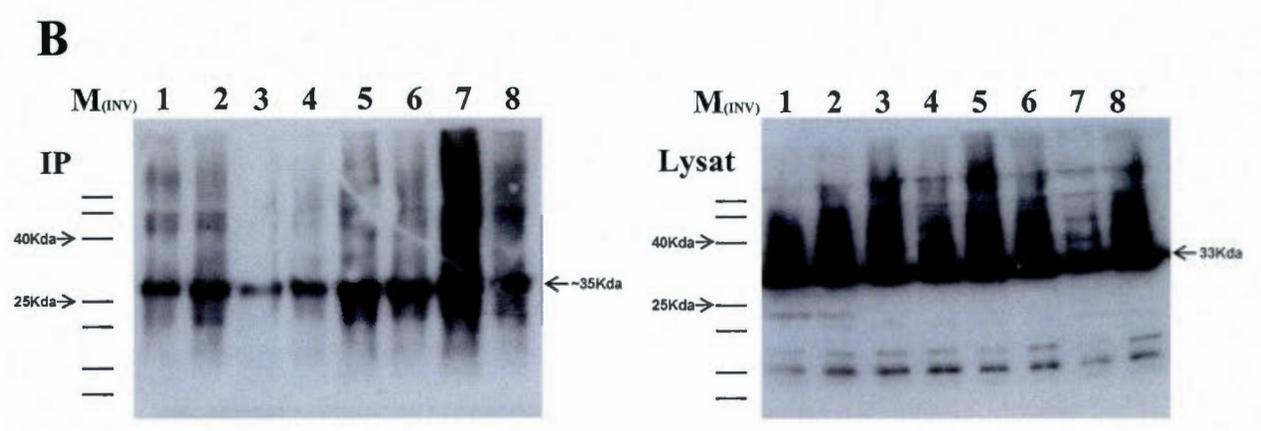
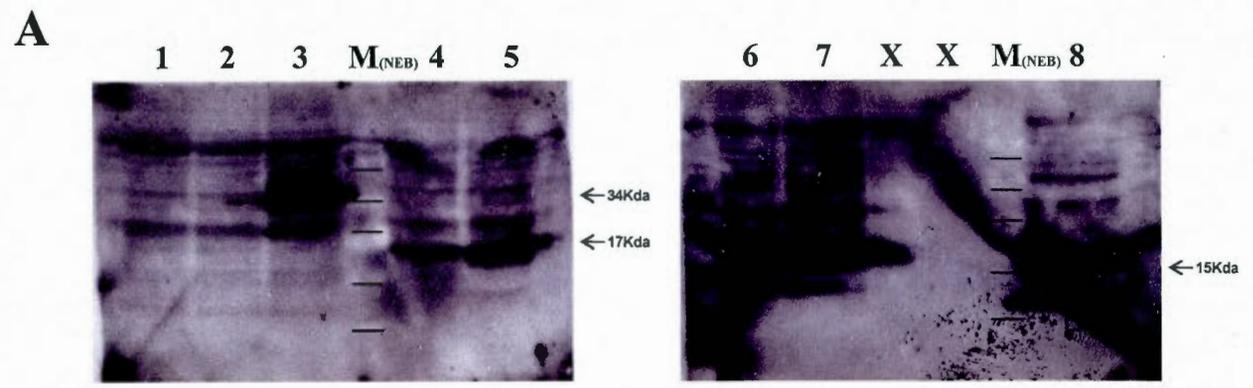
La boîte cycline est essentielle pour permettre la liaison entre les cyclines et leur CDK correspondante. Il a été démontré que la D2Trc se lie à la kinase CDK4 malgré sa région C-terminale tronquée. Comparativement à la D2, il lui manque 133 acides aminés incluant les derniers 21 acides aminés de la boîte cycline. À cet endroit par contre, elle possède une nouvelle séquence de 20 acides aminés dont les résidus conservés suivants : L143, L146, P155 et H156. Puisque la D2Trc est capable de se lier à CDK4, il est possible que ces résidus aient un important rôle fonctionnel dans la formation du complexe avec les CDKs.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons testé la liaison de CDK4 avec les constructions suivantes: D2 $\Delta$ 157-289-myc, D2Trc $\Delta$ 151-156-myc, D2Trc $\Delta$ 147-156-myc et D2Trc $\Delta$ 137-156-myc par co-immunoprécipitation. Les constructions D2-myc et D2Trc-myc ont été utilisées comme contrôles positifs d'interactions.

Premièrement, nous avons voulu vérifier que les protéines étaient bien produites. Par immunobuvardage, l'expression des différentes protéines des constructions transfectées est observable (Fig. 3.3A). On retrouve pour chaque puit, une protéine majeure immunodétectée correspondant aux poids moléculaires attendus, de 34 Kda pour la D2, 17 Kda pour les protéines D2Trc et D2 $\Delta$ 157-289, et entre 17 Kda et 15 Kda pour les protéines D2Trc $\Delta$ 151-147-137-156. Cependant, les niveaux d'expressions étaient très variables entre les différentes constructions (Fig. 3.3A).

La figure 3.3B représente les essais de co-immunoprécipitations. Le panneau de droite prouve la présence du CDK4 endogène dans les échantillons avant co-immunoprécipitation. Le panneau de gauche représente les résultats des co-immunoprécipitations. Ils devraient représenter la présence des complexes protéines/CDK4 révélée par immunodétections en utilisant l'anticorps anti-myc à la suite d'immunoprécipitations par un anticorps anti-CDK4. Nous observons dans tous les puits la présence d'une protéine immunoréactive migrant entre 30-40 Kda.

Les deux contrôles négatifs (mock et pCMV-myc) devraient représenter des échantillons où la CDK4 immunoprécipitée des cellules transfectées avec ces constructions vides ne peuvent être immunodétectées par l'anti-myc. Or, ces échantillons (contrôles négatifs) montrent qu'une protéine de 30 Kda est reconnue par l'anticorps dirigé contre myc.



**Figure 3.3 : Analyse des régions de la boîte cycline responsable de la liaison entre CDK4 et des différents isoformes (normale et tronquée) de la cycline D2 dans des cellules NIH/3T3 transfectées à l'aide des constructions marquées par myc.** Les échantillons suivants ont été utilisés : NIH/3T3 mock (puit 1), vecteur pCMV-myc (puit 2), D2 $\Delta$ 157à289-myc (puit 5), D2Trc $\Delta$ 151à156-myc (puit 6), D2Trc $\Delta$ 147à156-myc (puit 7) et D2Trc $\Delta$ 137à156 (puit 8). D2-myc (puit 3) et D2Trc-myc (puit 4) ont été utilisées comme contrôles positifs d'interactions. (A) L'immunodétection a été accomplie en utilisant un anticorps anti-myc et 100  $\mu$ g de protéines obtenues à partir des lysats cellulaires et déposées dans chaque puits. (B) Les immunoprécipitations (IP) (panneau de bas à gauche) ont été réalisées en utilisant l'anticorps anti-CDK4 et 1 mg de protéines à partir des lysats cellulaires. L'interaction éventuelle de D2 et D2Trc avec CDK4 a été analysé par l'immunodétection des protéines de fusion avec un anticorps anti-myc. Le panneau de bas à droite montre le degré d'expression du CDK4 endogène dans les différents échantillons de cellules transfectées utilisées pour l'immunoprécipitation. N=1

### Légende

- 1 : Mock
- 2 : pCMV-myc
- 3 : D2-myc
- 4 : D2Trc-myc
- 5 : D2 $\Delta$ 157à289-myc
- 6 : D2Trc $\Delta$ 151à156-myc
- 7 : D2Trc $\Delta$ 147à156-myc
- 8 : D2Trc $\Delta$ 137à156-myc
- M (NEB) : Marqueurs (Prestained protein marker de New England Biolabs)
- M (INV) : Marqueurs (Bench Mark pre-Stained protein ladder de Invitrogen)
- X : vide

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

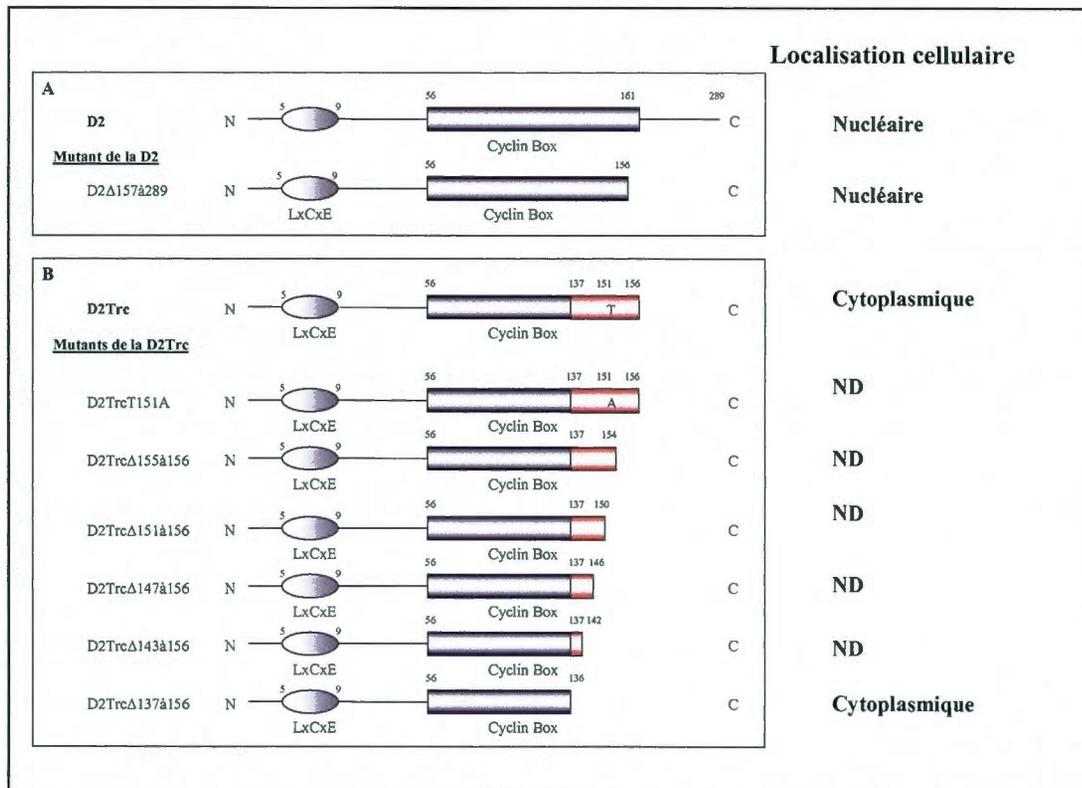
#### 4.1. Localisation cellulaire

Les cyclines D s'accumulent dans le noyau durant la phase G1. Une fois liées à leurs CDKs correspondantes, elles déclenchent la phosphorylation de pRB, permettant la progression du cycle cellulaire vers la phase de synthèse (S). Il a été démontré que la cycline D2 tronquée (D2Trc) se localise exclusivement dans le cytoplasme des cellules NIH/3T3 (Denicourt, 2002). Étant donné que la D2Trc n'est formée que de 156 acides aminés, la région C-terminale de l'isoforme longue (a.a. 157 à 289 de la D2) était soupçonnée d'être impliquée dans la localisation nucléaire de ces protéines.

Pour ce faire, nous avons produit par PCR des ADNc de protéines mutées (D2 $\Delta$ 157à289 et D2Trc $\Delta$ 155- 151- 147- 143- 137- à156) auxquelles la EGFP a été fusionnée. Ainsi, nous avons pu discerner la région impliquée dans la localisation nucléaire des protéines. Comme le résume la figure 4.1, la D2 $\Delta$ 157à289-GFP se localise dans le noyau comparativement à la D2Trc qui se localise dans le cytoplasme. De plus, la D2Trc $\Delta$ 137à156 se localise dans le cytoplasme. Donc, en comparant ces résultats, il nous est maintenant possible d'arriver à la conclusion que ce sont les 20 derniers acides aminés de la région C-terminale de la boîte cycline de l'isoforme longue (a.a. 137 à 156 de la D2) qui sont nécessaires à la localisation nucléaire des protéines. En conséquence, la région C-terminale de la protéine normale (a.a. 157 à 289 de la D2) n'est pas impliquée dans la localisation nucléaire de ces protéines. Ne sachant pas au départ quelle région y était impliquée, plusieurs délétions de la région C-terminale de la D2Trc ont été créées par PCR. Or, suite aux résultats de la localisation cellulaires des protéines D2 $\Delta$ 157à289-GFP et D2Trc $\Delta$ 137à156-GFP, le test de localisation cellulaire des autres protéines (D2Trc $\Delta$ 155- 151- 147- 143- à156) est devenu superflus.

Maintenant, il devient intéressant de connaître quel(s) résidu(s) de cette région confère la propriété aux cyclines D de rester dans le noyau. Il a été démontré que le mutant de la cycline D1, D1T156A, garde sa capacité à se lier à CDK4 et se retrouve uniquement dans le cytoplasme des cellules NIH/3T3 (Diehl et Sherr, 1997). L'équipe de Diehl (1997) a proposé que le résidu Thr-156 de la D1 soit important pour la localisation nucléaire de cette protéine. Son homologue chez la cycline D2 est le résidu Thr-154. Or, ce résidu n'est pas conservé chez la D2Trc, ce qui pourrait expliquer en partie sa localisation cytoplasmique. Il serait intéressant de vérifier la localisation cellulaire d'une protéine mutante de la D2Trc dont le résidu proline 154 (Pro-154) serait changé pour la thréonine originale. On obtiendrait la D2TrcP154T en utilisant la technique de mutagenèse dirigée par PCR. Cette protéine conserverait à la fois les trois derniers acides aminés de la boîte cycline (dont la T154) et par ce fait, éliminerait une proline.

La localisation cellulaire de la protéine mutée D2TrcT151A serait toute aussi intéressante à vérifier. En effet, sachant que l'expression et la stabilité de la D2Trc sont influencées par l'interleukine 3 (IL-3) dans la lignée cellulaire 32Dcl3 alors que le résidu Thr-282 est absent de la D2Trc, le résidu T151 pourrait être responsable de la localisation cytoplasmique de la protéine ainsi que de sa dégradation protéosomale. Il serait donc très intéressant de vérifier la localisation cellulaire de la protéine D2TrcT151A.



**Figure 4.1 : Compilation des résultats de la localisation cellulaire des différentes isoformes (normale et tronquée) du gène de la cycline D2 et celle des protéines mutantes créées par PCR. Voir description de la figure 3.1 pour détails. ND (non-disponible).**

Les mécanismes qui coordonnent la localisation cytoplasmique de la D2Trc sont un autre aspect intéressant à comprendre.

Il a été démontré que les Cip/Kip facilitent l'accumulation nucléaire de la cycline D1 en inhibant la liaison entre CRM1 et le complexe cycline D1/CDK4. Pour se faire par contre, p21<sup>cip1</sup> doit se lier aux deux sous-unités du complexe. Dans le cas contraire, c'est-à-dire qu'une ou l'autre des liaisons est manquante (p21<sup>cip1</sup>-cycline D ou p21<sup>cip1</sup>-CDK4), p21<sup>cip1</sup> est incapable d'inhiber la liaison du CRM1 entraînant l'export nucléaire du complexe cycline D/CDK4 (Alt *et al.*, 2002).

La D2Trc garde sa capacité à se lier à CDK4 et se localise dans le cytoplasme (Denicourt, 2002). La région C-terminale de la boîte cycline de la D2Trc pourrait ne pas être favorable à la liaison de p21<sup>cip1</sup> l'empêchant ainsi d'inhiber l'export nucléaire du complexe D2Trc/CDK4.

#### 4.1.1. Propriétés oncogéniques reliées

Nous savons que la D2Trc a des propriétés oncogéniques plus élevées que l'isoforme normale et que les phénotypes suivants sont observés lorsque les MEFs primaires sont transfectés par la D2Trc et Ha-Ras (Denicourt 2002):

- mitogènes dépendantes
- haut pourcentage de cellules multi-nucléées
- perte de l'inhibition de contact
- de forme allongée
- adhésion cellulaire moindre

Il est alors indispensable de comprendre les interactions protéiques, directes ou indirectes, de la D2Trc dans le cytoplasme. Si elles étaient impliquées par exemple, l'activité des Cip/Kip (p21<sup>cip1</sup> et p27<sup>kip1</sup>) et de CDK5 permettraient de mieux comprendre la capacité oncogénique de la D2Trc.

#### 4.1.1.1. Cip/Kip

Bien que les Cip/Kip soient considérées comme des inhibiteurs du cycle cellulaire en empêchant l'activité des complexes cyclines/CDK2, plusieurs études montrent que p21<sup>cip1</sup>/p27<sup>kip1</sup> auraient des fonctions indépendantes à la progression du cycle cellulaire lorsque situées dans le cytoplasme (Besson *et al.*, 2004; Coqueret, 2003; Lee et Helfman, 2004; McAllister *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2002). Il a été observé dans des NIH/3T3 transformées par Ras, que p21<sup>cip1</sup>/p27<sup>kip1</sup> se localisent dans le cytoplasme sous l'influence de MEK et de PI3K (Lee et Helfman, 2004). En fait, PI3K/AKT phosphoryle la Thr-145 du NLS de p21<sup>cip1</sup>, ce qui lui enlève la possibilité d'entrer dans le noyau (Zhou *et al.*, 2001). Une fois dans le cytoplasme, p21<sup>cip1</sup> interagirait comme inhibiteur de Rho-kinase (ROCK) ce qui contribuerait à la perte de l'adhérence focale en compromettant la voie de signalisation ROCK/LIMK/cofiline (Lee et Helfman; Tanaka *et al.*, 2002). De son côté, p27<sup>kip1</sup> serait liée à la dynamique de l'actine et de la migration cellulaire en activant Rac (Nagahara *et al.*, 1998; McAllister *et al.*, 2003; Besson *et al.*, 2004). Celui-ci est responsable de l'extension des lamellipodes. Donc, dans le cytoplasme, ces protéines favoriseraient la prolifération et la migration cellulaire.

Supposons que la région C-terminale de la boîte cycline de la D2Trc soit défavorable à sa liaison avec les Cip/Kip, le complexe D2Trc/CDK4- p21<sup>cip1</sup>/p27<sup>kip1</sup> serait alors soumis à l'export nucléaire par CRM1. Ajouté à ceci l'export nucléaire des Cip/Kip par Ras, p21<sup>cip1</sup>/p27<sup>kip1</sup> localisées dans le cytoplasme, ne pourraient plus exercer leur rôle d'inhibiteur du cycle cellulaire sur CDK2, favorisant alors la prolifération cellulaire. Connaissant l'implication des Cip/Kip dans la migration cellulaire, ça expliquerait les phénotypes observés chez les MEFs primaires transformées par D2Trc et Ha-Ras. Deux évènements distincts seraient alors impliqués dans la capacité de transformation cellulaire des deux isoformes du gène *CCND* : la liaison avec les Cip/Kip et la localisation cytoplasmique des Cip/Kip par Ha-Ras.

La Cycline D2 surexprimée avec un Ha-Ras activé dans des MEFs primaires induit la formation de foyers de transformation (Denicourt, 2002). Par contre, en comparant le nombre de foyers transformés, Denicourt (2002) est arrivé à la conclusion que la D2 est moins

transformante que la D2Trc lorsque soumise aux mêmes conditions expérimentales (Denicourt, 2002). Ha-Ras permettrait à la fois la surtranscription de la D2 (oncogène) et la localisation cytoplasmique de p21<sup>cip</sup>/p27<sup>kip</sup>. Par contre, contrairement à la D2Trc, la D2 se localise dans le noyau i.e. p21<sup>cip</sup>/p27<sup>kip</sup> se lie aux deux sous-unités du complexe cycline D-CDK4/6 incapable alors d'inhiber l'export nucléaire du complexe par CRM1. D2 localisée dans le noyau contrebalancerait une partie de l'export nucléaire des Cip/Kip vers le cytoplasme, les séquestrant alors dans le noyau. Cette population de Cip/Kip pourrait ainsi inhiber la progression du cycle résultant alors en une capacité de transformation inférieure à celle de la D2Trc. Ce qui ajoute de la crédibilité à cette hypothèse est que, la surexpression de l'oncogène Ras dans des fibroblastes embryonnaires de rat (REF) induit l'expression de p21<sup>cip</sup>, le faisant intervenir dans la transformation cellulaire (Land *et al.*, 1986).

#### 4.1.1.2. CDK5

CDK5 fait partie du groupe des kinases cyclines dépendantes qui joue un rôle important dans le positionnement neuronal et dans la dynamique du cytosquelette durant l'expansion des axones (Dhavan et Tsai, 2001). Par contre, contrairement aux autres CDKs, elle n'est pas activée par des cyclines mais, son activité peut quand même être influencée par la cycline D2 (Guidato *et al.*, 1998; Knockaert et Meijer, 2002). La cycline D2 régule négativement CDK5 en permettant aux Cip/Kip de se lier au complexe ainsi formé *in vitro* (Guidato *et al.*, 1998).

Puisque la D2Trc s'exprime majoritairement dans le cerveau (Denicourt, 2002), il est possible qu'elle puisse interagir avec CDK5 en inhibant son action et en modulant ainsi l'adhésion cellulaire médiée par le cytosquelette.

#### 4.2. Régions de la boîte cycline responsables de la liaison de CDK4 chez les deux types d'isoformes (normale et tronquée) du gène *CCND2*.

Pour déterminer la ou les région(s) de la D2Trc impliquée(s) dans sa liaison avec CDK4, les constructions suivantes ont été transfectées dans des NIH/3T3 : D2 $\Delta$ aa289à157-myc, D2Trc $\Delta$ 151À156-myc, D2Trc $\Delta$ 147À156-myc et D2Trc $\Delta$ 137À156-myc.

La co-immunoprécipitation ne semble pas avoir fonctionné. En effet, la protéine immunodétectée apparaissant dans chaque puit semble non spécifique puisque nous la retrouvons également dans nos contrôles négatifs (mock et pCMV-myc). Il est difficile de déterminer à quoi elle correspond. Pourrait-elle correspondre à une protéine ressemblant à c-myc, de poids moléculaire correspondant à 30-40 Kda? Comme nous avons vérifié que les protéines construites étaient bien produites et que le CDK4 endogène est bien présent dans les cellules NIH/3T3 car reconnu par son anticorps spécifique (anti-CDK4), il faut seulement optimiser le protocole pour que cela marche. Ces difficultés avaient été reportées par C. Denicourt (2002) et pourraient être dues au fait que les cyclines D sont difficiles à extraire et à manipuler. Il faudra refaire cette expérience en prenant bien soin de tout garder à 4°C, pour s'assurer d'obtenir un meilleur rendement. Alternativement, le poids moléculaire de cette protéine suggère qu'elle correspond à la chaîne légère des IgG qui ont servis à immunoprécipiter la protéine CDK4. En traitant un échantillon mock avec le protocole d'immunoprécipitation mais en absence d'anticorps anti-CDK4, cela permettrait de vérifier cette possibilité.

## CHAPITRE 5

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES

L'activation de proto-oncogènes cellulaires par mutagenèse insertionnelle est un élément clé dans le processus leucémogène. Le rétrovirus murin Graffi représente un outil important de recherche (Denicourt *et al.*, 1999) et a permis d'identifier un nouveau site commun d'intégration rétroviral, Gris 1 (Graffi insertion site 1), qui influence l'expression du gène de la cycline D2 (Denicourt *et al.*, 2003). Les intégrations en Gris 1 activent à la fois l'expression de la cycline D2 normale (D2) et l'expression de la cycline D2 tronquée (D2Trc). Étant donné que la D2Trc semble avoir un rôle cellulaire important et qu'elle présente un pouvoir transformant plus élevé que la D2, il devient très intéressant de caractériser les fonctions de cette nouvelle isoforme.

Bien qu'elle soit capable de se lier à la kinase CDK4, la D2Trc se localise exclusivement dans le cytoplasme des cellules NIH/3T3. Dans ce projet, nous avons tout d'abord cherché à déterminer quelle région de la D2Trc est impliquée dans cette localisation cytoplasmique. Les ADNc des protéines D2 $\Delta$ 157à289 et D2Trc $\Delta$ 137à156, obtenus par PCR et fusionnés à la EGFP, nous ont permis de constater que la région comprenant les derniers 20 acides aminés de sa boîte cycline (a.a. 137 à 156 de la D2Trc) n'a pas l'information nécessaire à la localisation nucléaire de cette protéine. En effet, la D2 $\Delta$ 157à289-GFP se localise dans le noyau. Subséquemment, il a donc été possible de mettre en évidence l'importance des 20 derniers acides aminés de la boîte cycline de la D2 (a.a. 137 à 156 de la D2) dans la localisation nucléaire des protéines. Reste maintenant à cerner le ou les résidus de cette région qui y sont impliqué(s). Un candidat potentiel serait la Thr-154 de la D2. En effet, l'homologue chez la D1, Thr-156, semble impliqué dans la localisation nucléaire de celle-ci puisque la D1T156A se localise dans le cytoplasme (Diehl et Sherr, 1997). De plus, le fait que la D1T156A garde sa capacité à se lier aux CDK4/6 (Diehl *et al.*, 1997) renforce l'hypothèse i.e. D2Trc garde sa capacité à se lier à la kinase CDK4 malgré l'absence de cette thréonine. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait obtenir par PCR la protéine D2TrcP154T,

auquel on fusionnerait la EGFP. Si cette construction se localise dans le noyau des cellules NIH/3T3, la thréonine 154 manquante serait alors responsable de la localisation nucléaire de la D2Trc.

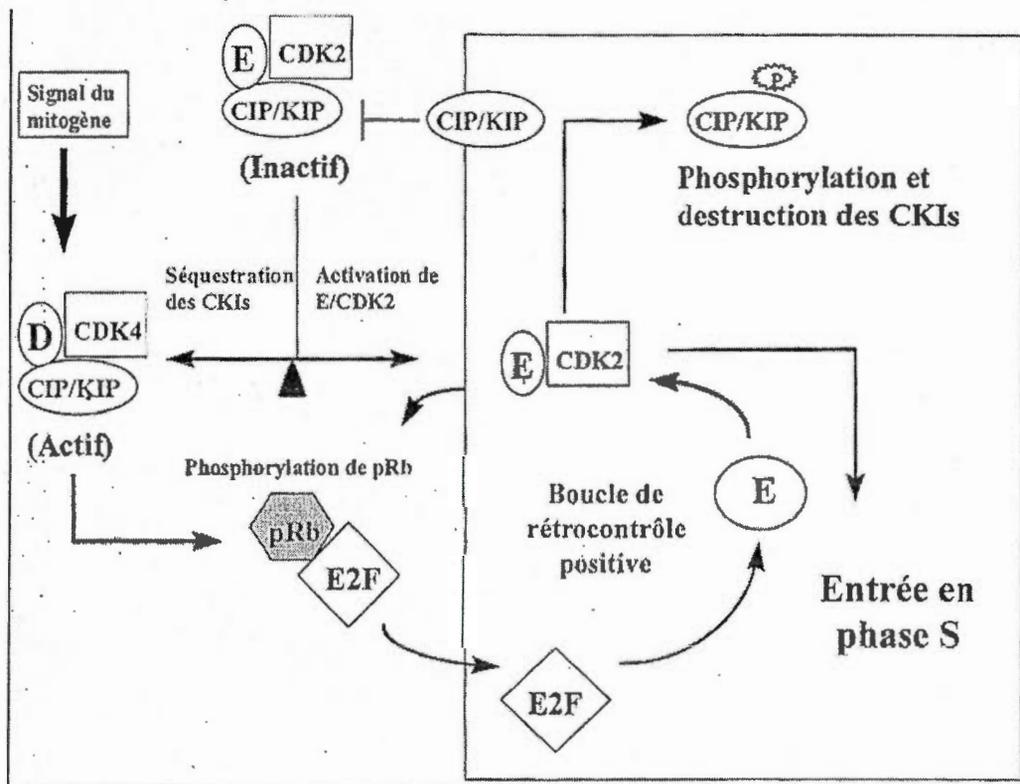
De plus, sachant que l'expression et la stabilité de la D2Trc dépendent de la présence de stimuli mitogène IL-3 dans la lignée cellulaire 32Dcl3, il serait intéressant de déterminer quel résidu de la D2Trc est ciblé par la GSK3 $\beta$ . Ainsi, étudier si l'expression de la protéine D2TrcT151A fluctue selon la présence de IL-3 dans cette lignée cellulaire nous permettrait de vérifier si la Thr-151 est ciblée par la GSK3 $\beta$ .

La D2Trc semble importante dans la progression du cycle cellulaire et dans l'induction de la tumorigenèse. Il devient alors tout aussi intéressant de comprendre ses interactions protéiques (directs ou indirects) pour comprendre ses effets biologiques via sa localisation cytoplasmique. Étant donné que les Cip/Kip détiennent des fonctions à l'extérieur du noyau, soit dans la migration et la prolifération cellulaire, il pourrait être intéressant de vérifier s'il y a bel et bien présence de ces protéines dans le cytoplasme des MEFs primaires transfectées par la D2Trc avec un Ha-Ras activé. D'autant plus que la D2Trc semble avoir une co-localisation partielle avec le cytosquelette d'actine (majoritairement dans la région périnucléaire de la cellule) (Denicourt, 2002). Pour ce faire, on pourrait utiliser un anticorps à fluorescence anti-p21<sup>cip</sup>/p27<sup>kip</sup>, ce qui nous permettrait de vérifier rapidement et efficacement la présence de ces protéines dans le cytoplasme.

Il faudrait vérifier également la capacité de transformation des protéines D2 $\Delta$ 157à289 et D2Trc $\Delta$ 137à156, transfectées dans des MEFs primaire avec un Ha-Ras activé, ce qui indiquerait l'importance des 20 derniers acides aminés de la D2Trc (a.a. 137 à 156 de la D2Trc) dans la tumorigenèse.

Il reste maintenant à réessayer l'immunoprécipitation des constructions (D2 $\Delta$ 157à289-myc, D2Trc $\Delta$ 151à156-myc, D2Trc $\Delta$ 147à156-myc, D2Trc $\Delta$ 137à156-myc) en comparaison avec les contrôles positifs (D2-myc, D2Trc-myc) et négatifs (mock, pCMV-myc), pour vérifier la région de la D2Trc responsable de sa liaison avec la kinase CDK4. Les résultats

non concluant peuvent être expliqués entre autres par le fait que l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.



ANNEXE A : Régulation de la transition G1/S lors de la progression du cycle cellulaire. Voir texte pour description (tiré de la revue de Sherr et Robert, 1999; traduit par Viillard *et al.*, 2001).

## RÉFÉRENCES

- Ajchenbaum, F., Ando, K., DeCaprio, J.A., Griffin, J.D. (1993). Independent Regulation of Human D-type Cyclin Gene Expression during G1 Phase in Primary Human T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 268: 4113-4119.
- Aktas, H., Cai, H., and Cooper, G. M. (1997). Ras links growth factor signalling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and CDK inhibitor p27<sup>KIP1</sup>. *Mol Cell Biol* 17: 3850-3857.
- Alt, J. R., Gladden, A. B., Diehl, J. A. (2002). p21 (Cip1) promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem* 277: 8517-8523.
- Andersen, G., Busso, D., Porterszman, A., Hwang, J. R., Wurtz, J. M., Ripp, R., Thierry, J. C., Egly, J. M., and Moras, D. (1997). The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features. *Embo J* 16: 958-967.
- Appleman, L. J., Berezovskaya, A., Grass, I., Boussiotis, V. A. (2000). CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J. Immunol.* 164: 144-151.
- Assoian, R. K. (1997). Control of the G1 phase cyclin-dependent kinases by mitogenic growth factors and the extracellular matrix. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8: 165-170.
- Bailly, E., Pines, J., Hunter, T. and Bornens, M. (1992). Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells: association with a detergent-resistant compartment within the centrosome. *J. Cell Sci.* 101: 529-545.
- Baker, G. L., Landis, M. W., Hinds, P. W. (2005). Multiple functions of D-type cyclins can antagonize pRb-mediated suppression of proliferation. *Cell Cycle.* 4 : 330-8.
- Banerji, L., Glassford, J., Lea, N. C., Thomas, N. S., Klaus, G. G., Lam, E. W. (2001). BCR signal target p27 (Kip1) and cyclin D2 via P13-K signaling pathway to mediate cell cycle arrest and apoptosis of WEH1 231 B cells. *Oncogene* 20: 7352-7367.
- Bensson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A., and Roberts, J. M. (2004). p27Kip 1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes and Dev.* 18: 862-876.
- Betticher, D. C., Thatcher, N., Altermatt, H. J., Hoban, P., Ryder, W. D., Heighway, J. (1995). Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 11: 1005-1011
- Blain, S. W., Montalvo, E., and Massague, J. (1997). Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J. Biol. Chem.* 272, 25863-25872.

- Bromberg, J., Wrzeszczynska, M., Devgan, G., *et al.* (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* 98: 295-303.
- Cardoso, M. C., Leonhardt, H., Nadal-Ginard, B. (1993). Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication : cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* 74: 979-92.
- Chan, H. M., Smith, L., and La Thangue, N. B. (2001). Role of LXCXE motif-dependent interactions in the activity of the retinoblastoma protein. *Oncogene* 20: 6152-6163.
- Chen, J., Jackson, P.K., Kirschner, M.W., Dutta, A. (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*. 374: 386-388.
- Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C.J., and Roussel, M. F. (1998) Assembly of cyclin D-dependant kinase and tritration of p27<sup>Kip1</sup> regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95: 1091-1096.
- Ciemerych, M., Kenney, A., Sicinska, E., Kalaszczyńska, I., Bronson, R., Rowitch, D., Gardner, H., and Sicinski, P. (2002). Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev.* 16, 3277-3289.
- Connell-Crowley, L., Harper, J. W., and Goodrich, D., W. (1997). Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol Biol Cell*. 8: 287-301.
- Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors : A function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.* 13: 65-70.
- den Elzen, N. and Pines, J. (2001) Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol* 153: 121-36.
- Denicourt, C. (2002). Identification d'un nouvel isoforme de la cycline D2 activée dans des leucémies induites par le retrovirus murin Graffi. Thèse de doctorat.
- Denicourt, C., Kozak, C. A., and Rassart, E. (2003). Gris 1, a new common integration site in Graffi murine leukemia virus-induced leukemia: Overexpression of a truncated cyclinD2 due to alternative splicing. *J. Virol.* 77: 37-44.
- Devault, A., Martinez, A. M., Fesquet, D., Labbe, J. C., Morin, N., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Cavadore, J. C., Doree, M. (1995). MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK. *EMBO J.* 14 : 5027-36.
- Dhavan, R., and Tsai, L. H. (2001). A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 749-759.

- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M F., and Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12: 3499-3511.
- Diehl, J. A., and Sherr, C. J. (1997). A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase. *Mol cell Biol*. 17: 7362-7374.
- Donnellan, R., Chetty, R. (1998). Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol* 51: 1-7.
- Donzelli, M., Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalia checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep*. 4: 671-7
- Dowdy, S. F., Hinds, P.W., Louie, K., Reed, S. I., Arnold, A., and Weinberg, R. A. (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*. 73: 499-511
- Erlandsson, F., Linnman, C., Ekholm, S., Bengtsson, E., Zetterberg, A. (2000). A detailed analysis of cyclin A accumulation at the G(1)/S border in normal and transformed cells. *Exp Cell Res* 259: 86-95.
- Fisher, R. P., Jin, P., Chamberlin, H. M., Morgan. (1995). Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell* 83:47-57.
- Fisher, C. L., Pei, G. K. (1997). Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Biotechniques*. 23:570-1 et 574.
- Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J. M., Hunt, T. (2001). Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 153: 137-48.
- Gillett, C., Fantl, V., Smith, R., Fisher, C., Bartek, J., Dickson, C., Barnes, D., Peters, G. (1994). Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 54: 1812-17.
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., Lamb, N. J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67: 1169-79.
- Glassford, J., Holman, M., Banerji, L., Clayton, E., Klaus, G. G., Turner, M., and Lam, E. W.-F. (2001). Vav is required for cyclin D2 induction and proliferation of mouse B lymphocytes activated via the antigen receptor. *J. Biol. Chem*. 276: 41040-41048.
- Glotzer, M., Murray, A. W., Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-8.
- Gramlich, T. L., Fritsch, C. R., Maurer, D., Eberle, M., Gansler, T. S. (1994). Differential polymerase chain reaction assay of cyclin D1 gene amplification in esophageal carcinoma. *Diagn Mol Pathol*, 3: 255-259

- Guidato, S., McLoughlin, D. M., Grierson, A. J., Miller, C. C. (1998). Cyclin D2 interacts with cdk-5 and modulates cellular cdk-5/p35 activity. *J. Neurochem.* 70 : 335– 340.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G. and Baldwin, A.S., Jr. (1999). NFkappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5785–5799
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., Pines, J. (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* 9 : 680-9.
- Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., Pines, J. (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J* 17: 4127-38.
- Hanna, Z., Jankowski, M., Tremblay, P., Jiang, X., Milatovich, A., Francke, U., Jolicoeur, P. (1993). The Vin-1 gene, identified by provirus insertional mutagenesis, is the cyclin D2. *Oncogene* 8: 1661-6 .
- Harbour, J. W., and Dean, D. C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14: 2393-2409.
- Hellmich, M. R., Pant, H. C., Wanada, E., and Battey, J. F. (1992). Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10867-19871.
- Hershko, A., Ganoth, D., Pehrson, J., Palazzo, R. E., Cohen, L. H. (1991). Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts. *J Biol Chem* 266: 16376-9.
- Hinz, M., D. Krappmann, A. Eichten, A. Heder, C. Scheidereit, and M. Strauss. (1999). NF-kB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2690–2698.
- Hirama, T., Koeffler, H. O. (1995). Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood.* 86: 841-54.
- Hirano, T., Kobayashi, R., Hirano, M. (1997). Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. *Cell* 89: 511-521.
- Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E. and Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* 12: 53-63.
- Holley, S. L., Heighway, J., Hoban, P. R. (2005). Induced expression of human CCND1 alternative transcripts in mouse *Cyl-1* knockout fibroblasts highlights functional differences. *Int J Cancer* 114: 364-70.

- Huang, S., Chen, C. S., and Ingber, E. D. (1998). Control of cyclin D1, p27<sup>kip</sup>, and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol Biol Cell* 9: 3179-3193.
- Huard, J., Forster, C., Carter, M., Sicinski, P., and Ross, M. (1999). Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *126*, 1927-1935.
- Humbert, P. O., Verona, R., Trimarchi, J. M., Rogers, C., Dandapani, S., Lees, J. A. (2000). E2f3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev* 14: 690-703.
- Hunt, T. (1991). Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol.* 2: 213-222.
- Jeffrey, P.D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., *et al.* (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376 : 313-320.
- Jiang, H., Chou, H. S., Zhu, L. (1998). Requirement of cyclin E-Cdk2 inhibition in p16(INK4a)-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol.* 18:5284-90.
- Johnson, L. N., O'Reilly, M. (1996). Control by phosphorylation. *Curr Opin Struct Biol* 6 : 762-769.
- Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., *et al.* (1997). Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through an NF-kB-dependent pathway. *J Biol Chem* 274: 25245-9.
- Kaelin, W.G., Jr. (1999) Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 21 : 950-958
- Kim, K. K., Chamberlin, H. M., Morgan, D. O., Kim, S. H. (1996). Three-dimensional structure of human cyclin H, a positive regulator of the CDK-activating kinase. *Nat Struct Biol* 3: 849-855.
- Kitagawa, M., Higashi, H., Jung, H.K., Suzuki-Takahashi, I., Ikeda, M., Tamai, K., Kato, J., Segawa, K., Yoshida, E., Nishimura, S., and Taya, Y. (1996) The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *EMBO J.* 15: 7060-7069
- Knockaert, M., Meijer, L. (2002). Identifying in vivo targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography. *Biochem Pharmacol.* 64: 819-25.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J. P., Gannon, J., Hunt, T. (1992) Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* 3 : 1279-94.

Koff, A., Cross, F., Fisher, A., Schumacher, J., Lguellec, K., Philippe, M., *et al.*, (1991). Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 66: 1217-1228.

Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J. W., Elledge, S., *et al.* (1992). Formation and activation of cyclin-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257 : 1689-94.

Kozar, k., Ciemerych, m. A., Rebel, v. i., Shigematsu, h., Zagozdzon, A Sicinska, E., Geng, Y, Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R. T., Akashi, K., and Sicinski, P. (2004). Mouse Development and Cell Proliferation in the Absence of D-Cyclins. *Cell*, 118 : 477-491,

Krude, T., Jackman, M., Pines, J., Laskey, R. A., (1997). Cyclin/Cdkdependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell* 88: 109-119

LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A., and harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11: 847-862.

Lam, E. W., Glassford, J., Banerji, L., Thomas, N. S., Sicinski, P., Klaus, G. G. (2000). Cyclin D3 compensates for loss of cyclin D2 in mouse B-lymphocytes activated via the antigen receptor and CD40. *J Biol. Chem.* 275: 3479-3484.

Land, H., Chen, A.C., Morgenstern, J. P., Parada, L. F., Weinberg, R.A. (1996). Behavior of myc and ras Oncogenes in Transformation of Rat Embryo Fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 6: 1917-1925

Leach, F. S., Elledge, S. J., Sherr, C. J., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1993). Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Res* 53: 1986-1989.

Lees, E.M., Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol. Cell Biol.* 13: 1194-201.

Leslie, K., Lang, C., Devgan, G., Azare,J., Berishaj, M., Gerald, W., Kim, Y.B., Paz, K., Darnell, J.E., Albanese, C., Sakamaki, T., Pestell, R., Bromberg, J. (2006). Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res.* 66: 2544-2552.

Lew, D. J., Dulic, V., Reed, S. I. (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66: 1197-206.

Li, Y., Dowbenko, D., and Lasky, L. A. (2002). AKT/PKB phosphorylation of p21<sup>Cip/WAF1</sup> enhances protein stability of p21<sup>Cip/WAF1</sup> and promotes cell survival. *J. Biol. Chem.* 277: 11352-11361.

Lolli, G., Lowe, E. D., Brown, N. R., Johnson, L. N. (2004). The crystal structure of human CDK7 and its protein recognition properties. *Cell* 12: 2067-79

Lu, F., Gladden, A. B., Diehl, J. A. (2003). An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res* 63: 7056-61.

Lukas, C., Bartkova, J., Welker, M., Peterson, O. W., Peters, G., Strauss, M., Bartek, J. (1995). Cyclin D2 is a moderately oscillating nucleus protein required for G1 phase progression in specific cell types. *Oncogen* 10: 2125-2134.

Lukas, C., Sørensen, C. S., Kramer, E., Santoni-Rugiu, E., Lindeneg, C., Peters, J. M., Bartek, J., and Lukas, J. (1999). Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* 401: 815-818.

Luo, Y., Hurwitz, J., Massague, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature*. 375: 159-161.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev cancer* 1: 222-231

Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., *et al.* (2004) mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118: 493-504.

Martinez, M. A., Afshar, M., Martin, F., Cavadore, J. C., Labbé, J. C., Dorée, M. (1997). Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J.* 16: 343-354.

Martino, A., Holmes, J. H., Lord, J. D., Moon, J. J., Nelson, B. H. (2001). Stat 5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. *J. Immunol.* 166: 1723-1729.

Martinsson, H. S., Starborg, M., Erlandsson, F., Zetterberg T A. (2005). Single cell analysis of G1 check points—The relationship between the restriction point and phosphorylation of pRb. *Experimental Cell Research* 305: 383- 391

Marshall, C. J. (1994) Hot lips and phosphorylation of protein kinases [letter]. *Nature* 367 : 686.

Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Tanaka, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Downward, J., Pestell, R. G., Kanakura, Y. (1999). Transcriptional regulation of cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J* 18:101-111

- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J., and Kato, J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14: 2066-2076.
- Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A., Sherr, C. J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65 : 701-13.
- McAllister, S. S., Becker-Hapak, M., Pintucci, G., Pagan, M., and Dowdy, S. F. (2003). Novel p27 (Kip1) C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Mol. Cell Biol.* 23: 216-228.
- Minshull, J., Pines, J., Golsteyn, R., Standart, N., Mackie, S., Colman, A., *et al.* (1989). The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci* 12 Suppl : 77-97.
- Mohamedali, A., Soeiro, I., Lea, N. C., Glassford, J., Banerji, L., Mufti, G. J., Lam, E. W., and Thomas. N. S. (2003). Cyclin D2 controls B cell progenitor numbers. *J. Leukoc. Biol.* 74:1139-1143.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A. et Dunphy, W. G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 270: 86-90.
- Muller, H., Lukas, J., Schneider, A., Warthoe, P., Bartek, J., Eilers, M., and Strauss, M. (1994). Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2945-2949.
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E.L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A., and Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat. Med.* 4: 1449-1452.
- Nakamura, S., Yatabe, Y., Seto, M. (1997). Cyclin D1 overexpression in malignant lymphomas. *Pathol Int*, 47:421-429
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344: 503-508.
- Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 21-32.
- Ohi, R., Gould, K. L. (1999). Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 11: 267-73.
- Ohtsubo, M., Roberts, J. M. (1993). Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *259: 1908-12.*

Ortega, S., Malumbres, M., and Babacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602: 73-87.

Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 11: 961-71.

Palmero, I., Holder, A., Sinclair, A. J., Dickson, C., and Peters, G. (1993). Cyclins D1 and D2 are differentially expressed in human B-lymphoid cell lines. *Oncogene* 8: 1049-1054.

Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol.* 287: 821-8.

Pestell, R. G., Albanese, C., Reutens, A. T., Segall, J. E., Lee, R. J., Arnold, A. (1999). The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocrine Rev* 20: 501-34.

Peter, M., Le Pench, C., Labbe, J. C., Meyer, A. N., Donoghue, D. J., Doree, M. (2002). Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. *EMBO Rep.* 3: 551-6

Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C. et Nigg, E. A. (1990). *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61 : 591-602.

Pines, J. (1991). Cyclins: wheels within wheels. *Cell Growth Differ.* 2: 305-310.

Pines, J., Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 346: 760-763.

Pines, J., Hunter, T. (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115: 1-17.

Pines, J., Hunter, T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J* 13: 3772-81.

Planas-Silva, M. D., Weinberg, R. A. (1997). Estrogen-dependent cyclin E-Cdk2 activation through p21 redistribution. *Mol Cell Biol* 17: 4059-4069.

Pommier, Y., and Kohn, K. W. (2003). Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie : nouvelles cibles thérapeutiques. *Médecine/Sciences* 19 : 173-186.

Poon R. Y. C. (2002). Cell cycle control. In: Bertino JR, ed. *Encyclopedia of Cancer*. San Diego: Academic Press 393-404.

- Poon, R. Y. C., Yamashita, K., Howell, M., Ershler, M. A., Belyavsky, A., Hunt, T. (1994). Cell cycle regulation of the p34cdc2/p33cdk2-activating kinase p40MO15. *J Cell Sci.* 107 : 2789-99
- Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J. Y., Bar, S. D., Roussel, M. F. et Sherr, C. J. (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* 7: 1559-1571.
- Reed, S. I., Wittenberg, C., Lew, D. J., Dulic, V. and Henze, M. (1991). G1 control in yeast and animal cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 56 : 61-67.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., Reed, S. I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol.* 14: 1669-1679.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., Massague, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* 9:1831-45.
- Roovers, K., Davey, G., Zhu, X., Bottazzi, M. E., and Assoian, R. K. (1999). Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell* 10: 3197-3204
- Rossig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2001). Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 21: 5644-5657.
- Schulze, A., Zerfass-Thome, K., Berges, J., Middendorp, S., Jansen-Durr, P., and Henglein, B. (1996). Anchorage-dependent transcription of the cyclin A gene. *Mol Cell Biol* 1: 4632-4638.
- Schwartz, M.A., and Assoian, R. K. (2001). Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signalling pathways. *J. Cell. Sc.* 114: 2553-2560.
- Scott, M. T., Morrice, N., Ball, K. L. (2000). Reversible phosphorylation at the C-terminal regulatory domain of p21(Waf1/Cip1) modulates proliferating cell nuclear antigen binding. *J Biol Chem.* 275: 11529-37.
- Shaffer, A. L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E. P., and Staudt, L. M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 13: 199-212.
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell.* 73: 1059-1065.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9:1149-1163.

Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501-1512.

Sicinska, E., Aifantis, I., Le Cam, L., Swat, W., Borowski, C., Yu, Q., Ferrando, A., Levin, S., Geng, Y., von Boehmer, H., and Sicinski, P. (2003). Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell* 4: 451-461.

Sicinski, P., Donaher, J., Parker, S., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S., Bronson, R., Elledge, S., and Weinberg, R. (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 82: 621-630.

Sicinski, P., Donaher, J.L., Geng, Y., Parker, S.B., Gardner, H., Park, M.Y., Robker, R.L., Richards, J.S., McGinnis, L.K., Biggers, J.D., et al. (1996). Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 384: 470-474.

Sobczak, T.J., F. Harper, Y. Florentin, F. Zindy, C. Brechot, and E. Puvion. (1993). Localization of cyclin A at the sites of cellular DNA replication. *Exp. Cell Res.* 206: 43-48.

Solomon, D. A., Wang, Y., Fox, S. R., Lambeck, T. C., Giesting, S., Lan, Z., Senderowicz, A. M., Knudsen, E. S. (2003). Cyclin D1 splice variants: Differential effects on localization, Rb phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem*; 278: 30339-47.

Solvason, N., Wu, W.W., Parry, D., Mahony, D., Lam, E.W., Glassford, J., Klaus, G.G., Sicinski, P., Weinberg, R., Liu, Y.J., et al. (2000). Cyclin D2 is essential for BCR-mediated proliferation and CD5 B cell development. *Int. Immunol.* 12: 631-638.

Stewart, Z.A., Westfall, M. D., Pietenpol, J. A., (2003). Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol. Biol.* 24: 139-145.

Taïeb, F., Jessus, C. (1996). Xenopus cyclin D2: cloning and expression in oocytes and during early development. *Biol. Cell* 88: 99-111.

Takano, Y., Kato, Y., Masuda, M., Ohshima, Y., Okayasu, I. (1999). Cyclin D2, but not Cyclin D1, overexpression closely correlates with gastric cancer progression and prognosis. *J Pathol* 189: 194-200.

Takano, Y., Kato, Y., van Diest, P. J., Masuda, M., Mitomi, H., Okayasu, I., (2000). Cyclin D2 Overexpression and Lack of p27 Correlate Positively and Cyclin E Inversely with a Poor Prognosis in Gastric Cancer Cases. *Am J Pathol.* 156: 585-94.

Tanaka, H., Yamashita, T., Asada, M., Mizutani, S., Yoshikawa, H., and Tohyama, M. (2002). Cytoplasmic p21cip/Waf1 regulates neurite remodelling by inhibiting Rho-kinase activity. *J. Cell. Biol.* 158: 321-329

- Tremblay, P. J., Kozak, C. A., and Jolicoeur, P. (1992). Identification of a novel gene, Vin-1, in murine leukemia virus-induced T-cell leukemias by provirus insertional mutagenesis. *J Virol* 66: 1344-1353.
- Viallard, J. F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin J.L., Reiffers, J. (2001). Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire : aspects fondamentaux et implications en cancérologie. *Cancer/Radiother* 5 : 109-29.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 369: 574-578.
- Watanabe, G., Lee, R.J., Albanese, C., Rainey, W.E., Batle, D., and Pestell, R.G. (1996). Angiotensin II activation of cyclin D1-dependent kinase activity. *J. Biol. Chem.* 271: 22570-22577
- Wells, N. J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M. A., Hunter, T. (1999). The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase MYT1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G2/M progression. *J. Cell Sci.* 112: 3361-3371.
- White, P. C., Shore, A. M., Clement, M., McLaren, J., Soeiro, I., Lam, E. W.-F. and Brennan, P. (2006). Regulation of cyclin D2 and the cyclin D2 promoter by protein kinase A and CREB in lymphocytes. *Oncogene* 25: 2170-2180
- Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinase and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71: 505-514.
- Yam, C. H., Fung, T. K., Poon, R. Y. C. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 59: 1317-26.
- Zarkowska, T., Mitnacht, S. (1997) Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 12738-12746.
- Zhang, H., Hannon, G. J., Beach, D. (1994). p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.* 8, 1751-1758.
- Zhang, X., Zhao, M., Huang, A. Y., Fei, Z., Zhang, W., Wang, X. L. (2005). The effect of cyclin D expression on cell proliferation in human gliomas. *J. Clin. Neurosci* 12: 166-168.
- Zhao, F., Vilardi, A., Neely, R.J., Choi, J.K. (2001). Promotion of cell cycle progression by basic helix-loop-helix E2A. *Mol. Cell. Biol.* 21: 6346-6357.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H., Hung, M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* 3: 245-252.