

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DE MUTATIONS DE L'ARN HÉLICASE DDX10 ASSOCIÉES AU CANCER DU
SEIN

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

OSSAMA MOUJABER

SEPTEMBRE 2013

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

Le projet de maîtrise est réalisé grâce à l'aide de plusieurs personnes que j'aimerais remercier avec honnêteté. D'abord, un très grand merci au Dr François Dragon, mon directeur de recherche, sans qui, je n'aurais jamais eu l'opportunité de travailler sur ce projet. J'apprécie son support et sa patience pendant tout le long de ma maîtrise. J'exprime ma reconnaissance à mes collègues de laboratoire qui m'ont aidé avec leurs petits conseils pour réaliser ce travail. Plus particulièrement Sahar Soltanieh, Ahmed Hossain, Vincent Lemay et Florian Palabaud. J'ai tellement apprécié vos conseils qui m'ont très bien servi pour arriver à ce point. Mes remerciements également au Dr Benoit Barbeau et au Dre Catherine Jumarie, membres de mon comité d'évaluation, pour leurs conseils. Et enfin, merci pour ma femme et mes parents pour leur support durant ma maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DE FIGURES	v
LISTE DE TABLEAUX	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
RÉSUMÉ	VIII
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 État de connaissance.....	1
1.1.1 Nucléole	1
1.1.2 Structure de Miller	2
1.1.3 Biogenèse des ribosomes	3
1.1.4 Ribosome et code génétique.....	4
1.1.5 Les hélicases et la famille «DEAD-Box».....	5
1.1.6 L'ARN hélicase DDX10	8
1.1.7 Le cancer du sein et le marqueur de prolifération.....	9
1.1.8 Che-1/AATF	10
1.2 Hypothèse de travail	11
CHAPITRE II	
MÉTHODOLOGIE	12
2.1 Construction des plasmides.....	12
2.2 Transfection des cellules HeLa avec le plasmide pcDNA3.1.....	15
2.3 Immunofluorescence des cellules HeLa.....	16
2.4 Immunoprécipitation et Western blot.....	17
2.5 Double hybride.....	19
2.6 GST-PullDown	21
2.7 Régulation de la protéine DDX10.....	22
2.8 FACS et prolifération cellulaire.....	24
CHAPITRE III	
RÉSULTATS	26
3.1 Détection de la protéine 3FLAG-DDX10 dans les cellules HeLa par immunomicroscopie ..	26

3.2	Détection de la protéine 3FLAG-DDX10 dans les cellules HeLa par immunobavardage.....	27	
3.3	Étude la lignée stable HeLa-pSH-DDX10 transfectée avec les mutants de DDX10	28	
3.4	Localisation de DDX10 et ses mutants avec Che-1 dans les cellules HeLa	30	
3.5	Étude de l'immunoprécipitation de FLAG-DDX10 avec Che-1/AATF	31	
3.6	Étude du cycle cellulaire des cellules HeLa transfectées avec les mutants de DDX10.....	33	
3.7	Effet des mutants de DDX10 sur la prolifération cellulaire.....	34	
3.8	Étude du marqueur de prolifération cellulaire KI-67 dans les cellules HeLa en présence des mutants de DDX10.....	36	
3.9	Expression de la protéine recombinante GST-DDX10ΔN dans les bactéries Rosetta	38	
CHAPITRE IV			
DISCUSSION			41
4.1	Le plasmide pcDNA3.1-3FLAG est un mauvais choix pour l'étude de DDX10	41	
4.2	Créer une lignée stable avec le plasmide pSH-DDX10 dans les cellules HeLa	42	
4.3	Che-1/AATF est associé à DDX10 dans le nucléole	43	
4.4	Effet des mutations de DDX10 sur la prolifération cellulaire	45	
4.5	Purification de la protéine recombinante GST-DDX10ΔN	47	
4.6	Le système de double hybride n'est pas fonctionnel pour l'étude de l'interaction entre DDX10 et Che-1	49	
CHAPITRE V			
CONCLUSIONS			50
BIBLIOGRAPHIE.....			51

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Schémas de la structure du nucléole et de la chromatine nucléolaire	1
1.2	Les neuf motifs conservés de la famille DEAD-box	7
2.1	Le système de double hybride chez la levure	20
3.1	Immunomicroscopie de la lignée stable possédant la construction FLAG-DDX10	25
3.2	Expression de 3FLAG-DDX10 dans les cellules HeLa en Western blot	27
3.3	Étude de la lignée stable pSH-DDX10 en présence des mutants DDX10	29
3.4	Localisation des mutants de DDX10 dans le nucléole	30
3.5	DDX10 interagit avec le facteur anti-apoptotique Che-1	31
3.6	Effet des mutations de DDX10 sur le cycle cellulaire	33
3.7	Effet des mutations de DDX10 sur la prolifération cellulaire	34
3.8	Étude de la prolifération cellulaire chez les cellules HeLa en Immunomicroscopie	36
3.9	Expression de l'extension C-terminale de la protéine DDX10 <i>in vitro</i> dans les bactéries Rosetta	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
3.1	Valeur moyenne de l'intensité de la fluorescence de chaque cellule exprimant Ki67	36

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
D.O.	densité optique
Xg	force gravitationnelle
g	gramme
kb	kilobase
kD	kiloDalton
ml	millilitre
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PVDF	fluorure de polyvinylidène
RPM	rotation par minute
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS
ul	microlitre
ug	microgramme

RÉSUMÉ

DDX10 est une ARN hélicase de la famille «DEAD-box». Ces enzymes sont caractérisées par la présence de neuf motifs conservés formant un cœur catalytique, lequel est flanqué par des extensions qui varient en longueur et en composition d'acides aminés. Des mutations dans l'extension C-terminale de DDX10 ont été associées au cancer du sein (Sjoblom *et al.*, 2006). Ces deux mutations consistent en une mutation ponctuelle du 566^e acide aminé et une délétion de 25 acides aminés. Pour examiner l'effet de ces mutations sur la fonction de DDX10, nous avons fait des expériences d'immunomicroscopie et d'immunobavardage et les résultats montrent que le plasmide pcDNA3.1 n'est pas un bon choix pour l'expression de la protéine 3FLAG-DDX10, ce qui dirige le travail vers l'utilisation du plasmide pBact-FLAG-DDX10. Pour appuyer le choix de ce dernier, des expériences d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence ont été réalisées et les résultats montrent que les protéines DDX10 et Che-1/AATF interagissent ensemble et qu'elles se co-localisent dans le nucléole. De plus, les deux formes mutées de DDX10 ne semblent pas avoir d'effet sur l'interaction de DDX10 avec Che-1 ainsi que sur leur co-localisation dans le nucléole. Nous avons aussi étudié la prolifération cellulaire à l'aide des expériences de FACS qui ont montrées que la majorité des cellules HeLa se trouvent en phases S et G2/M en présence des deux formes mutées de DDX10 comparé avec la forme sauvage. Par ailleurs, des expériences réalisées par quantification de la fluorescence en immunomicroscopie du marqueur de prolifération Ki-67 ont confirmé que les deux mutants de DDX10 stimulent la prolifération cellulaire. Finalement, nous avons réussi à exprimer la protéine recombinante GST-DDX10 *in vitro* dans les bactéries Rosetta, mais sans être capable de la purifier pour s'en servir pour des expériences de «GST-Pulldown».

Mots clés : Nucléole;biogenèse des ribosomes; cancer du sein ; ARN hélicases; DDX10

CHAPITRE I- INTRODUCTION

1.1. État des connaissances

1.1.1. Le nucléole

Le nucléole est un petit compartiment à l'intérieur du noyau dans lequel se manifestent plusieurs activités biologiques importantes. En effet, ces activités incluent la biogenèse des ribosomes, la sénescence et la régulation de la télomérase, la progression du cycle cellulaire, la suppression de tumeurs, l'activité oncogénique et le contrôle de l'infection virale (Boulon *et al.*, 2010 ; Raska *et al.*, 2006). Le nucléole est composé de plus que 5000 protéines organisées dans trois sous compartiments ; le centre fibrillaire (FC) entouré par la composante fibrillaire dense (DFC) qui sont tous les deux intégrées dans la composante granulaire (GC) (Figure 1.1.A) (Raska, Shaw et Cmarko, 2006).

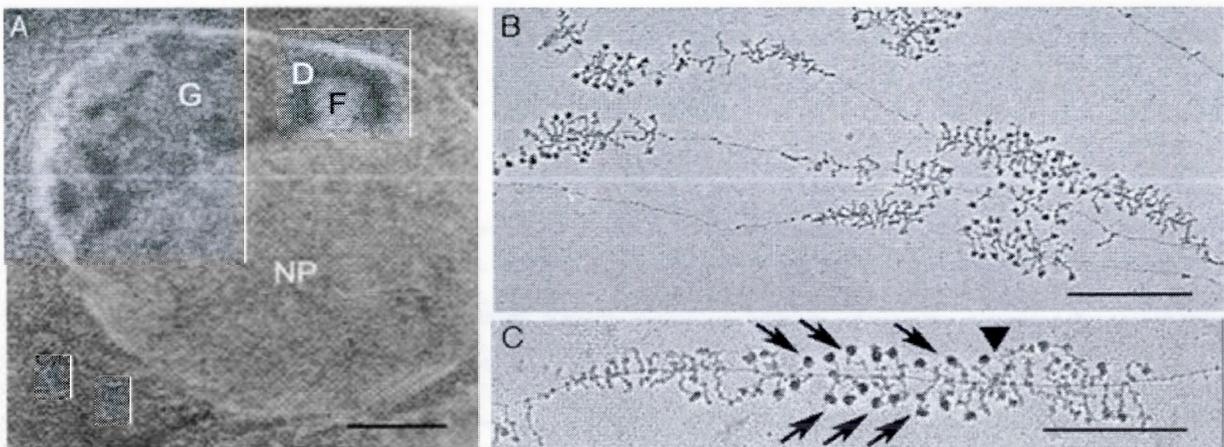


Figure 1.1. Structure du nucléole et de la chromatine nucléolaire. (A) Micrographie électronique de nucléole *in situ*. Le FC, DFC et GC sont respectivement désignés par F, D et G. (B) et (C) Étalement de la chromatine «chromatin spread» dans le nucléole chez la levure sous forme d'arbres de Noël. Les flèches montrent les granules terminaux « terminal knobs». Figures tirée de Raska *et al.*, 2006.

1.1.2. Structure de Miller

La structure de Miller est caractérisée par une bonne visualisation de la transcription des ARN ribosomiques (ARNr) dans le nucléole. Ce modèle présenté par Miller et Beatty (1969) à l'aide du microscope électronique (Figure 1.1.B) montre la transcription des gènes d'ARNr en forme d'arbres de Noël (CT). L'axe (le tronc) d'ADN est composé des gènes d'ARNr et on voit les branches qui sont les ARNr transcrits. Les ARN polymérase I se lient à la molécule d'ADN pour permettre sa transcription en ARN. À l'extrémité 5' des transcrits, la première structure qui apparaît correspond à une large ribonucléoprotéine, composée de molécules d'ARN et de protéines. Avec la continuité de la transcription de l'ARNr, cette structure grossit pour former une structure appelée «SSU processome» (small subunit processome) qui participe à la biogenèse de l'ARNr 18S et correspond au «terminal knob» vu au microscope électronique (Dragon *et al.*, 2002).

On appelle «terminal knob» l'ARNr en cours de transcription associé au snoRNA U3 en complexe avec d'autres protéines, tout cela correspond au SSU processome. Un clivage permet de libérer la petite sous-unité pré-40S pour continuer, par la suite, la transcription en associant d'autres facteurs responsables de la maturation de la grande

sous-unité. Ce complexe est appelé LSU processome (large subunit processome) (Osheim *et al.*, 2004).

1.1.3. Biogenèse des ribosomes eucaryotes

La biogenèse des ribosomes est la principale activité réalisée dans le nucléole. En effet, la génération des ARNr 28S, 18S et 5.8S commence par la synthèse du précurseur commun 45S (pre-ARNr) à l'aide de l'ARN polymérase I. Le pre-ARNr 45S est clivé avec l'assistance de plusieurs facteurs incluant des snoARNs (petits ARN nucléolaires) faisant parties des complexes ribonucléoprotéines (snoRNPs) pour obtenir les précurseurs des ARNr 28S, 18S et 5.8S qui, à leur tour, subiront des méthylations et des clivages puis arriver à leur maturation. Cependant, la synthèse et la maturation du précurseur de l'ARNr 5S est synthétisé par l'ARN polymérase III à l'extérieur du nucléole (Osheim *et al.*, 2004). Ce dernier est subit à plusieurs étapes de maturation pour s'assembler dans la sous-unité pré-60S dans le nucléole. À la toute fin, les trois ARNr 28S, 5.8S et 5S sont assemblés avec 46 protéines ribosomales (RPL) pour former la grande sous-unité ribosomique (60S). De même, la petite sous-unité (40S) combine l'ARNr 18S et 33 autres protéines ribosomales (RPS) et atteint sa maturation (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000) (Ben-Shem *et al.*, 2011). L'assemblage des ribosomes requiert la participation de plusieurs facteurs incluant des snoARNs, des nucléases et d'autres protéines non ribosomales qui recrutent le nucléole (Osheim *et al.*, 2004) (Ben-Shem *et al.*, 2011) (Carmo-Fonseca, Mendes-Soares et Campos, 2000).

1.1.4. Ribosomes et code génétique

Après la transcription, le pré-ARNm subit quelques étapes d'épissage pour arriver à sa maturation. Plusieurs facteurs sont intégrés durant l'exportation nucléocytoplasmique de l'ARNm et sa maturation ainsi que durant la traduction. On trouve parmi ces facteurs des protéines associées à l'ARN, des ARN hélicases, des kinases et des facteurs d'initiation et d'élongation (Andreou et Klostermeier, 2012). Le facteur d'initiation eIF4A est une ARN hélicase qui joue un rôle très important dans l'initiation de traduction et le recrutement de plusieurs autres facteurs participants à l'assemblage des deux sous-unités ribosomiques. En effet, eIF4A s'associe aux protéines eIF4E et eIF4G pour former un complexe qui lie le 5`-cap de l'ARNm suivi par le recrutement de la sous-unité ribosomique 40S (Jackson *et al.*, 2010). La lecture de la région 5`-UTR active le recrutement de la grande sous-unité ribosomique (60S) pour continuer avec l'élongation. Cette dernière est responsable de la synthèse des liens peptidiques entre les acides aminés, tandis que la sous-unité 40S possède un rôle d'initiation et de décodage (Linder et Jankowsky, 2011). Finalement, l'ARNm mal épissé est dirigé vers la dégradation ou la réparation empruntant une des voies de recyclage de l'ARN où beaucoup de facteurs sont intégrés comme les protéines associées aux «processing bodies» ou les ARN hélicases. Les ARNm réparés se dirigent de nouveau vers la traduction (Parsyan *et al.*, 2011).

1.1.5. Les hélicases et la famille «DEAD-box»

Les hélicases sont des enzymes qui utilisent l'énergie dérivée de l'hydrolyse du nucléoside triphosphate (NTP) pour catalyser la séparation des doubles brins d'ADN ou d'ARN (Singleton *et al.*, 2007). Elles sont divisées en six superfamilles (SF1-SF6) dont les plus larges, SF1 et SF2, contiennent le plus de motifs conservés parmi toutes les superfamilles. Elles sont en formes monomères ou dimères dont chaque sous-unité possède deux domaines «RecA-like». Les superfamilles SF3-SF6 possèdent moins de motifs conservés et elles fonctionnent en formes hexamériques ou double hexamériques dont chaque monomère contient un seul domaine «RecA-like» (Byrd et Raney, 2012). La SF2 est parmi les plus larges superfamilles constituée d'au moins dix familles intégrées dans le métabolisme d'ADN et d'ARN. La famille DEAD-box fait partie des plus grandes familles de SF2 et possède au moins 35 membres chez les humains. Elle contribue à plusieurs fonctions biologiques dans la cellule incluant la biogenèse des ribosomes, la transcription, l'épissage de l'ARNm et son transport, la traduction, l'assemblage des complexes ARN/protéines et la dégradation de l'ARN (Byrd et Raney, 2012 ; Montpetit *et al.*, 2012). Ces protéines changent de conformation après la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Ces variations de conformations se manifestent durant la synthèse *de novo* de l'ARN et l'association à des complexes contenant l'ARN (Russell *et al.*, 2012). Les hélicases DEAD-box sont caractérisées par neuf motifs conservés (fig.1.2) participants à la régulation de ses activités et formants le cœur catalytique (Tanner *et al.*, 2003). Le nom de cette famille dérive de la séquence d'acides aminés D-E-A-D (Asp-Glu-Ala-Asp) qui correspond au motif II. Ces protéines sont caractérisées

par deux domaines séparés par un «linker» qui interagissent avec l'ARN et l'ATP. Dans le domaine N-terminal, le motif Q (site de liaison à l'ATP) assure la spécificité pour l'adénine nucléotide (Tanner *et al.*, 2003). Ce domaine contient aussi le motif I (Walker A, liaison à l'ATP), le motif II (Walker B, liaison à l'ATP), le motif III (liaison à l'ATP) et les motifs Ia et Ib (liaison à l'ARN). Le domaine C-terminal comporte le motif IV, qui promeut la liaison à l'ARN, et les motifs V et VI qui coordonnent l'activité ATPasique et séparent le double brin d'ARN (dbARN). Le cœur catalytique des hélicases DEAD-box est flanqué par des extensions N- et C-terminales qui varient en longueur et en constitution d'acides aminés et donnent une fonction spécifique à la protéine. Ainsi, les hélicases DEAD-box possèdent un cœur catalytique hautement similaire avec deux domaines «RecA-like» mais distinguées par leurs extensions N- et C-terminales (Andreou et Klostermeier, 2012). En absence de la liaison d'ARN et d'ATP, le cœur catalytique de l'hélicase est normalement ouvert. Après la liaison des deux molécules, l'hélicase change de conformation pour avoir une forme plutôt fermée permettant d'hydrolyser l'ATP et de catalyser la séparation des deux brins d'ARN. Chez certaines hélicases, la séparation de double brin d'ARN ne nécessite pas l'hydrolyse de l'ATP mais seulement sa liaison; et que l'hydrolyse permet la dissociation des deux simples brins d'ARN (Russell, Jarmoskaite et Lambowitz, 2012). L'étude de Peck et Herschlag (2003) et celle de Theissen *et al.* (2008) montrent que la liaison d'une des trois molécules ATP, ADP ou ARN ne change pas la conformation de l'hélicase, alors que la liaison d'ATP et d'ARN ensemble permet d'activer son activité hélicasique (Peck et Herschlag, 2003 ; Theissen *et al.*, 2008).



Figure 1.2. Les ARN hélicases DEAD-box sont constituées de deux domaines «RecA-like» composés de séquences de motifs conservés formants le cœur catalytique. Les motifs Q, I, Ia, Ib et II font partie du domaine 1, tandis que les motifs IV, V et VI forment le domaine «RecA-like» 2. Le motif II aussi appelé Walker B est constitué des acides aminés (D, E, A et D) générant le nom de cette famille. Tirée de Crodin et al. (2006).

De l'autre côté, l'ARN hélicase DEAD-box peut catalyser la séparation des protéines associées à l'ARN (activité RNPasique). Par exemple, l'ARN hélicase ATP-dépendant Ded1 réarrange l'interaction ARN/protéine indépendamment de la séparation de double brin d'ARN (Fairman *et al.*, 2004). Tout ensemble, les hélicases DEAD-box sont intégrées dans plusieurs aspects du métabolisme de l'ARN incluant la biogenèse des ribosomes, la transcription, la traduction et la dégradation. En effet, l'ARN hélicase DDX31 joue un rôle important pendant la transcription de l'ARNr et inhibe l'activation de la réparation de l'ADN en s'associant à la protéine p53 connue comme suppresseur d'oncogène (Fukawa *et al.*, 2012). De même, d'autres ARN hélicases sont associées à la biogenèse des ribosomes et la prolifération cellulaire comme DDX56, DDX5, DDX3, DDX24 (Bates *et al.*, 2005 ; Chao *et al.*, 2006 ; Kanno *et al.*, 2012 ; Naji *et al.*, 2012 ; Zagulski *et al.*, 2003). D'autre part, certains ARN hélicases agissent dans la régulation du cycle cellulaire comme DDX26, DDX6 et DDX39 (Filleur *et al.*, 2009 ; Thomas *et al.*, 2011 ; Weston et Sommerville, 2006). Plus encore, plusieurs RNA hélicase participent

dans l'exportation de l'ARNm et son épissage ainsi que sa translation incluant des facteurs d'initiations et de transportation (eIF4A, DDX39 et DDX3) (Oshiumi *et al.*, 2010 ; Shibuya *et al.*, 2004 ; Sugiura *et al.*, 2007). D'autres participent aussi dans le métabolisme des médicaments incluant DDX56 agissant au niveau de l'enveloppe nucléaire (Kanno *et al.*, 2012 ; Rajendran *et al.*, 2003). Enfin, l'intérêt de notre recherche est basé sur la protéine DEAD-box DDX10 chez les mammifères.

1.1.6. L'ARN hélicase DDX10

Dans ce mémoire, l'étude est concentrée sur l'ATP-dépendent ARN hélicase putative DDX10 appartenant à la famille DEAD-box. Le gène *DDX10* a été identifié à 400 kb (kilo base) du gène d'ataxia-telangiectasia situé dans le chromosome 11 q22-q23 (Savitsky *et al.*, 1996). Puisque les protéines DEAD-box intégrées dans l'épissage de l'ARN et dans la traduction sont généralement ubiquitinées, il est suggéré que cette protéine ubiquitinée (DDX10) participe dans la biogenèse des ribosomes (Savitsky *et al.*, 1996). La fusion du gène *DDX10* avec le gène *NUP98*, par translocation inversée du chromosome 11 (p15q22), a été trouvée chez des patients sous thérapie contre la myéloïdie maligne (Arai *et al.*, 1997). Il a été montré que cette fusion augmente la prolifération et le propre renouvellement des cellules humaines primaires CD34+. Les motifs de DDX10 responsable de l'association à l'ATP et l'ARN et à l'activité hélicasique donnent la capacité de transformation de la fusion Nup98-DDX10 et indique un rôle important dans la leucémogénèse (Yassin *et al.*, 2010). Dbp4, l'homologue de DDX10 dans la levure, joue un rôle très important dans la biogenèse des ribosomes. Cette

protéine nucléolaire est impliquée dans la libération et le déroulement de plusieurs snoARNs incluant la snoARN U14. Elle peut participer dans le déroulement des séquences pré-ARNr pour permettre la modification. En étant un membre du complexe bUTP et MPP10, Dbp4 est intégrée dans les étapes précoces et tardives de la maturation du pré-ARNr associée avec snoRNA U3 dans le SSU processome. (Turner *et al.*, 2009). Deux mutations du gène *DDX10* ont été trouvées dans des patientes atteintes du cancer du sein (Sjoblom *et al.*, 2006). Ces deux formes consistent en une mutation ponctuelle du 566^{ième} acide aminé (la leucine en valine) et une délétion de 25 acides aminés dont une partie dans le motif «Coiled-Coil» qui à son tour aide à former les interactions entre les protéines.

1.1.7. Le cancer du sein et le marqueur de prolifération Ki67

Le cancer du sein est la maladie la plus commune entre les femmes de toutes les races causant le décès par cancer. Selon le centre de control des maladies (CDC), cette maladie est la deuxième plus fréquente cause du décès de cancer chez les nord-américaines (Kontzoglou *et al.*, 2013). Il existe plusieurs causes du cancer du sein incluant des facteurs risques importants. L'histoire familiale ou hérédité est le facteur risque le plus connus dont l'origine de la maladie vient à partir de l'ADN de la mère ou de la tante. De l'autre côté, la cause de la maladie peut provenir, tout simplement, d'un changement protéomique de certains facteurs participants à la prolifération cellulaire (Meads *et al.*, 2012). Des études montrent la présence excessive du marqueur de prolifération Ki-67 dans plusieurs types de cancer incluant le cancer du sein. Son rôle

est déterminé surtout dans le cycle cellulaire. Durant la mitose, cette protéine est trouvée à périphérie des chromosomes condensés. Tandis que pendant l'interphase, elle est associée au cortex et à la fibrillaire dense du nucléole. L'inhibition de Ki-67 conduit la cellule vers l'arrêt sa prolifération (Kontzoglou *et al.*, 2013). Bref, Ki-67 est utilisée comme un biomarqueur pour la pronostique du cancer du sein.

1.1.8. Che-1/AATF

Che-1/AATF est une protéine nucléolaire qui interagit avec l'ARN polymérase II (Pol II) participant ainsi à la régulation de la transcription. Elle s'associe à la protéine rétinoblastome (Rb) et inhibe son travail de suppression de la croissance cellulaire (Fanciulli *et al.*, 2000). De plus, l'expression de cette protéine est réduite en apoptose tout en ayant une fonction importante durant la réparation de l'ADN endommagé. Cependant, elle possède parfois une activité anti-apoptotique grâce à son interaction avec les protéines MDM2 et NRAGE qui, tout les deux, jouent un rôle important en réponse de l'ADN endommagé (De Nicola *et al.*, 2007 ; Guo et Xie, 2004). Il a été démontré par l'équipe de Dr Fanciulli (Bruno, T et al. 2010) que Che-1 soutient l'expression de p53 mutée dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et séquestre la forme sauvage de p53 pour accélérer le cycle cellulaire et stimuler la prolifération; et ainsi la diminution de l'expression de Che-1 dans la cellule induit l'apoptose *in vitro* et *in vivo* (Bruno *et al.*, 2006 ; Bruno *et al.*, 2008 ; Page *et al.*, 1999). Comme Che-1 est une protéine nucléolaire anti-apoptotique, il est intéressant d'étudier son interaction avec

l'ARN hélicase DDX10 et de déterminer son effet sur la prolifération et la croissance cellulaire.

1.2. Hypothèses de travail et objectifs

Tout d'abord, DDX10 interagirait avec la protéine Che-1/AATF au niveau du motif «Coiled-Coil» situé entre le 564^{ième} et le 604^{ième} acide aminé. Une délétion de 25 acides aminés touchant une partie du motif «Coiled-Coil» ainsi qu'une mutation ponctuelle substituant le 566^{ième} acide aminé affecteraient l'association entre ces deux protéines. Aussi, DDX10 et Che-1 localiseraient normalement dans le nucléole mais pas pour les deux mutants de DDX10.

Par ailleurs, les mutants de DDX10 accélèrent la prolifération cellulaire. En effet, le marqueur de prolifération (Ki-67) montrerait une accélération du cycle cellulaire avec les mutants de DDX10.

Nos objectifs sont de trouver une interaction directe ou indirecte entre les protéines DDX10 et Che-1 en effectuant des expériences d'immunoprécipitation et d'immunomicroscopie. De plus, nous voulons déterminer l'effet des mutants de DDX10 sur la prolifération cellulaire, réalisé par l'observation du marqueur de prolifération et en analysant le nombre de cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire.

CHAPITRE II- MÉTHODOLOGIE

2.1. Construction des plasmides

Dans le but de créer une lignée stable de cellules HeLa en présence de DDX10 sauvage ou mutées, il est important de choisir un plasmide possédant un gène de sélection, comme la néomycine pour éliminer toutes les cellules dépourvues de notre protéine d'intérêt. Dans notre cas, c'est le plasmide pcDNA3.1 qui a été choisi contenant le site de résistance à la néomycine. Par la suite, trois plasmides pcDNA-3FLAG-DDX10, pcDNA-3FLAG-DDX10 Δ et pcDNA-3FLAG-DDX10-L566V ont été construits pour réaliser les expériences. En effectuant le protocole de ligation «Shot Gun ligation» (Grundstrom *et al.*, 1985), un triple tag FLAG (3FLAG) a été ajouté dans le plasmide pcDNA3.1. Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

Sens:

Top 1 : 5'-TCGAGGCCGCCATGGACTACAAAGAC-3'

Top 2 : 5'-CATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGAC-3'

Top 3 : 5'-TACAAGGATGACGATGACAAGTTAATTAATG-3'

Antisens:

Bottom 1 : 5'-ACCGTCATGGTCTTTGTAGTCCATGGCGGCC-3'

Bottom 2 : 5'-GTAGTCGATGTCATGATCTTTATAATC-3'

Bottom 3: 5'-AATTCATTAATTAACCTTGTCATCGTCATCCTT-3'

Chaque séquence citée est commandée sous forme de trois petites séquences (amorces) pour faciliter la ligation de 6 petites amorces au total. Un groupement phosphate a été ajouté à chaque amorce à l'aide de la T4 polynucléotide kinase durant 30 minutes à 37°C. Cela a été suivi par l'ajout de la spermidine pour garder le tout à 37°C pendant une heure. Cette étape sert à hybrider les amorces ensemble. Enfin, on a ligué les amorces hybridées à notre plasmide (pcDNA3.1) entre les sites XhoI et EcoRI en utilisant la T4 DNA ligase pour 1 heure à 16°C. Pour vérifier cette insertion du triple FLAG, on a transformé ce nouveau plasmide dans les bactéries compétentes DH10B. En effet, 10 µl du mélange total de ligation (20 µl) ajoutés à 50 µl de bactéries compétentes pendant 30 minutes sur la glace permettent d'amplifier ce plasmide. Ensuite, un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes excite les bactéries. Puis, 1 ml de milieu LB (L-Broth, extrait de levure 5 g/l, trypton 10 g/l et chlorure de sodium 5 g/l, Wisent Inc.) est ajouté sur le mélange pour incuber le tout à 37°C avec agitation pendant 1 heure. Par la suite, étalées sur une plaque contenant du LB agar (milieu de croissance solide) et de l'ampicilline (antibiotique de sélection), les bactéries croissent de 16 à 20 heures à 37°C. Le plasmide est purifié, après avoir sélectionné des colonies isolées, à l'aide du kit «mini-prep» de la compagnie Feldan. Le séquençage à (Génome Québec) a confirmé la ligation du triple FLAG au plasmide pcDNA3.1. Et ainsi, le plasmide pcDNA-3FLAG a été bien obtenu.

Il a fallu, tout d'abord, sortir les inserts DDX10, DDX10 Δ et DDX10-L566V qui sont initialement clonés dans le plasmide pBluescript. Les mutations de DDX10 ont été préalablement réalisées par PCR en utilisant des amorces contenant la mutation ponctuelle permettant de substituer la leucine en valine ou des amorces avec 75 paires de base de moins pour avoir une délétion de 25 acides aminés de DDX10. En effet, on a digéré pBluescript à l'aide de l'enzyme EcoRI pour une heure à 37°C pour sortir l'insert et avec PvuI durant le même temps pour couper le reste du plasmide en deux et ne pas nuire à l'isolement de la bande. Le mélange a été mis sur gel d'agarose 1% pour pouvoir isoler la bande autour de 2600 pb (DDX10). À l'aide du kit de «gel extraction kit» de la compagnie Feldan, les bandes demandées ont été purifiées.

Pour ajouter les gènes DDX10, DDX10 Δ ou DDX10-L566V dans le plasmide pcDNA-3FLAG, ce dernier a été digéré avec l'enzyme EcoRI pendant une heure à 37°C, suivi d'une ligation de 10 minutes à la température de la pièce. Les séquences DDX10, DDX10 Δ ou DDX10-L566V isolés du plasmide pBluescript sont trouvées liguées au plasmide pcDNA-3FLAG catalysés par la T4 DNA ligase. Par la suite, pour amplifier le plasmide construit, le produit de ligation a été transformée dans des bactéries compétentes DH10B et étaler sur des plaques de gélose contenant (100 μ g/ml) d'ampicilline (voir méthode à la page 13). Le gène de résistance à l'ampicilline est activé par un promoteur procaryote pour permettre sa purification à partir des bactéries résistantes à cet antibiotique et qui sont présentes en majorité sur la gélose. Cependant le gène de résistance à la néomycine est activé par un promoteur eucaryote pour servir comme sélection dans les cellules HeLa.

2.2. Transfection des cellules HeLa avec le plasmide pcDNA-3FLAG-DDX10

Les cellules HeLa ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) et 1% de Pen/Strep (Penicilline et Streptomycine) et incubées à 37°C avec un environnement humide contenant 5% de CO₂.

D'abord, la transfection transitoire est l'insertion d'un plasmide quelconque dans les cellules au hasard pour une courte durée de temps. Pour le réaliser, des cellules HeLa ont étéensemencées dans une plaque à 6 puits contenant déjà des lamelles carrées stériles. Le lendemain, 2 µg de chaque plasmide construit (pcDNA-3FLAG-DDX10, pcDNA-3FLAG-DDX10Δ et pcDNA-3FLAG-DDX10-L566V) est mélangé avec du milieu DMEM sans antibiotique pour un volume total de 100 µl et 6 µl de l'agent de transfection FUGENE HD (Roche) est ajouté sur le mélange et incubé pendant 15 minutes sous la hotte. Pendant ce temps, les cellules HeLa sur la plaque sont lavées avec du PBS. Par la suite, le mélange de transfection est ajouté sur les cellules HeLa et incubé pendant 48 heures dans l'incubateur de culture cellulaire. De l'autre côté, pour créer des lignées stables de cellules HeLa possédantes un des plasmides construits plus haut, le protocole pour la transfection transitoire a été utilisé sauf que plusieurs détails y sont ajoutés. Les cellules HeLa incubées pendant 48 heures sont lavées avec du PBS et le milieu est remplacé par un autre plus frais et contenant 500 µg/ml de généticine (G418) pour sélectionner les cellules transfectées. Les cellules ont été gardées pour deux semaines dans l'incubateur en lavant les cellules au deux jours et en ajoutant le milieu de sélection. Une fois rendue à 70-80% de confluence, les cellules

sont diluées 10 fois et placées dans une plaque de 10 cm. Les cellules ont été incubées pour plusieurs jours jusqu'à formation de colonies isolées. Par la suite, six clones de ces derniers ont été isolés individuellement puis cultivés dans des puits d'une plaque à 24 puits avec le même milieu de sélection jusqu'à se rendre à confluence. Ces différents clones ont été testés, plus tard, par western blot et par immunofluorescence pour vérifier si les protéines 3FLAG-DDX10, 3FLAG-DDX10 Δ et 3FLAG-DDX10-L566V sont bien exprimées. Des cellules HeLa non transfectées ont été utilisées comme contrôle négatif.

2.3. Immunofluorescence des cellules HeLa.

Après avoir effectué la transfection transitoire des cellules HeLa avec les plasmides pcDNA-3FLAG-DDX10, pcDNA-3FLAG-DDX10 Δ et pcDNA-3FLAG-DDX10-L566V, elles sont rincées trois fois avec du PBS. Deux millilitres de paraformaldéhyde (3.7%) ont été ajoutés sur les lamelles pendant 20 minutes, cela a permis de fixer les cellules. Ensuite, les cellules ont été rincées avec du PBS puis 2 ml de Triton X-100 (0.5%) est ajouté pendant 10 minutes. Par la suite, on a enlevé le Triton et on a bloqué les sites non spécifiques avec 100 μ l de BSA (3%) dans du PBS. Un microgramme d'anticorps primaire (anti-FLAG de souris, Sigma) pour 1 à 2 heures avec un autre anticorps primaire (1/1000 anti-Che1 lapin, (Bruno *et al.*, 2010)). Dans le cas du control positif FLAG-DDX10, un puits additionnel a été incubé avec les anticorps primaires (anti-FLAG de lapin et 1/1000 anti-Fibrillarine de souris). Après l'incubation, la solution de blocage est utilisée pour le laver les lamelles trois fois pendant 10 minutes. Par la suite, on a

ajouté 1/2000 de l'anticorps secondaire (Alexa-488 anti-lapin, Invitrogen) et 1/1500 de l'anticorps secondaire (Alexa-555 anti-souris, Invitrogen) pendant une heure dans la chambre noir et humide puis on a rincé 2 fois avec la solution de blocage et une fois au PBS pendant 10 minutes. Enfin, le colorant nucléaire (DAPI, 4',6'-diamidino-2-phénylindole) a été ajouté en dilution de 1/1000 pendant 20 minutes suivi par le rinçage trois fois avec du PBS. On a monté les lamelles sur des lames à l'aide d'une goutte de la solution de montage (Prolong, Invitrogen) puis, le lendemain, elles sont scellées avec du vernis à ongle pendant 30 minutes pour, plus tard, analyser les cellules en microscopie à fluorescence.

2.4. Immunoprécipitation et Western Blot

Après avoir transfecté les cellules HeLa pendant deux jours avec les plasmides construits (pcDNA-3FLAG-DDX10, pcDNA-3FLAG-DDX10 Δ et pcDNA-3FLAG-DDX10-L566V), elles ont été lavées avec du PBS puis le fond des pétris a été gratté pour récupérer le maximum de cellules. Ces dernières resuspendues dans 3 ml de PBS ont été transférées dans des tubes de 15 ml et centrifugées pendant 10 minutes à une vitesse de 500 xg. Les culots ont été lavés 3 fois avec 3 ml de PBS et ils ont été resuspendus avec 1 ml de NET-2 (20 mM Tris, 150 mM NaCl et 0.05% NP-40, pH 7.5) contenant du «Complete cocktail» (inhibiteur de protéase, Roche) et du RNasin (inhibiteur de RNase, Promega). Les solutions ont été soniquées 6 fois durant 15 secondes à l'aide du sonicateur puis elles sont centrifugées pendant 10 minutes à une vitesse de 15000 xg à 4°C. Pour garder un contrôle positif constitué de protéines

totales, 50 μ l est extrait de chaque solution. Les protéines totales ont été dosées puis 350 μ g d'extrait protéique a été incubé avec les billes d'agarose anti-FLAG (M2, Sigma) déjà lavées 3 fois avec du NET-2. Le mélange de billes et d'extrait protéique a été incubé dans le Nutator (agitateur) pendant une heure à 4°C. Ensuite, les billes ont été lavées 3 fois avec 1 ml de NET-2 et centrifugées pendant une minute à une vitesse de 500 xg. Pour analyser les protéines liées aux billes, 30 μ l de tampon SDS 2X a été mélangé par inversion avec les billes et 5 μ l de SDS 6X pour les extraits totaux puis ils ont été incubés à 95°C pendant 5 minutes. Les billes ont été centrifugées à une vitesse de 500 xg pendant 5 minutes et les surnageant et les extraits protéiques ont été installés sur le gel SDS-PAGE (gel d'acrylamide de 8%). Après la migration, les bandes de protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF pendant 30 minutes. Ensuite, la membrane a été traitée avec le rouge de ponceau pour visualiser les bandes et l'état de transfert puis la membrane a été séchée dans un papier Whatman pendant toute la nuit. Le lendemain la membrane a été bloquée pendant 30 minutes avec 5% de lait dans du PBS. Par la suite, on a ajouté l'anticorps primaire (anti-FLAG, souris) dans la solution de blocage pendant une heure avec agitation suivi par le rinçage 3 fois avec du PBS puis l'incubation avec l'anticorps secondaire (anti-souris d'une dilution 1/20000) couplé à la peroxidase (HRP) pendant une heure avec agitation. La membrane a été lavée 4 fois pendant 5 minutes avec du TBS-Tween et incubée avec la solution de chemiluminescence (Millipore) pendant 5 minutes. Dans la chambre noire, la membrane a été exposée à un film autoradiographique dans une cassette protégeant contre la lumière pendant une durée spécifique selon l'intensité du signal. Le lendemain, la

membrane a été lavée fortement avec du TBS-Tween pendant une à deux heures et le même processus est répété en bloquant la membrane 30 minutes avec 5% de lait dans du PBS mais cette fois l'anticorps primaire anti-Che1 lapin et l'anticorps secondaire anti-lapin (1/100000) sont ajoutés pour la détection de la protéine Che1.

Pour comparer l'expression de FLAG-DDX10 dans deux différents plasmides, les cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides pBact-FLAG-DDX10 (construit à partir de pBact-Myc) ou pcDNA-3FLAG-DDX10 pendant deux jours. Pour construire le plasmide pBact-FLAG-DDX10, le vecteur pBact-FLAG est linéarisé à l'aide de l'enzyme de restriction EcoRI et le fragment de DDX10 amplifié par PCR est ligué au vecteur. De même, les cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides pcDNA-3FLAG-DKC1 (exprimant la protéine Dyskérine taguée à 3FLAG) ou pBact-FLAG-DKC1 (Pogacic *et al.*, 2000) utilisés comme contrôles positifs. Cette transfection a été suivie par l'extraction protéique et 10 µg de protéines de chaque extrait ont été ajoutés dans un gel d'acrylamide. En immunobavardage, des anticorps anti-FLAG ont été utilisés pour détecter l'expression de FLAG-DDX10 en utilisant le même protocole de celui à la page précédente.

2.5. Double Hybride

Le système de double hybride est utilisé pour déterminer une interaction directe entre deux protéines. Pour évaluer l'interaction entre DDX10 et Che-1, la souche de levure AH109 a été employée dans laquelle les deux protéines mammifères sont exprimées. Cette souche contient trois gènes rapporteurs (ADE2, HIS3 et MEL1), qui peuvent être

activés par l'interaction des deux protéines (proie et appât) (Fig.2.1). Le cadre de lecture ouvert (ORF) de la protéine «appât» a été clonée dans le plasmide pGBKT7 de Clontech qui contient le gène de résistance à la kanamycine et le marqueur *TRP1*. La protéine «proie» a été clonée dans le plasmide pGADT7 contenant le gène de résistance à l'ampicilline et le marqueur *LEU2*. Les deux gènes (ORF) *DDX10* et *Che-1* ont été respectivement clonés entre les sites de restriction *Xma*I et *Sal*I des plasmides pGBKT7 et pGADT7 après avoir amplifié les séquences par PCR.

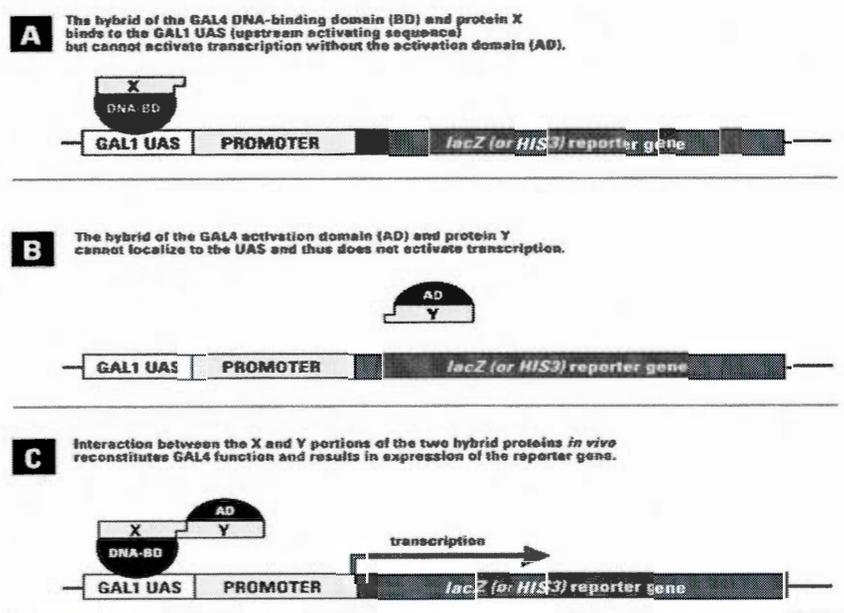


Figure 2.1. Le système de double hybride chez la levure. A) La protéine «bait» fusionnée au domaine de liaison de l'ADN (DNA-binding domain) qui se lie à GAL1 UAS. Mais cela ne peut pas activer la transcription sans le domaine d'activation. B) et C) La protéine «prey» associée au domaine d'activation se lie à la protéine «bait» pour permettre d'activer la transcription. Tirée du manuel de Clontech.

Les deux plasmides pGBK-DDX10 et pGAD-Che-1 sont co-transformés dans la souche AH109. Le traitement chimique LiOAc a été utilisé avec la recommandation de la compagnie «Clontech» (Gietz *et al.*, 1992). Ensuite, les cellules ont été resuspendues dans le tampon TE (Tris et EDTA) puis étalées sur des plaques SD-Leu-Trp (milieu

contenant des acides aminés en absence de la leucine et le tryptophane) et incubées pour plusieurs journées à 30°C. Quatre colonies de chaque plaque ont été sélectionnées et étalées de nouveau sur le même type de milieu (SD-Leu-Trp) pendant quelques jours à 30°C. Par la suite, un amas de colonies a été prélevé et étalé sur un milieu SD-Leu-Trp-His (milieu contenant des acides aminés à l'exception de la leucine, tryptophane et histidine). Si les colonies poussent dans le milieu dépourvu d'histidine, donc l'interaction entre les deux protéines est présente. (Réf. Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual de Clontech (Maple et Moller, 2007)).

2.6. GST-PullDown

Cette technique permet de vérifier une interaction directe entre les protéines DDX10 et Che-1. Tout d'abord, il a fallu cloner le gène *DDX10-ΔN* (portion C-terminal de DDX10) et ses mutants dans le plasmide pGEX-4T-1 entre les sites de restriction Xmal et XhoI en aval du gène *gst* (Glutathione S-Transferase), pour finalement obtenir le plasmide pGEX-DDX10-ΔN. Par la suite, ce plasmide a été transformé dans les bactéries E. coli «Rosetta, Novagen) pour l'expression des protéines recombinantes et étalé sur une plaque de gélose en présence d'ampicilline et de chloramphénicol à 37°C toute la nuit. Une colonie a été sélectionnée le lendemain et incubée dans 3 ml de LB avec ampicilline et chloramphénicol à 37°C avec agitation afin d'obtenir une densité optique d'environ 0.5. Une solution de 1 mM d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) a été ajoutée dans le milieu pour continuer l'incubation pendant une heure à 30°C. Les

bactéries ont été installées sur la glace et soniquées 5 fois pendant 15 secondes. Ensuite, elles ont été centrifugées pendant 10 minutes à 8000 rpm et le surnageant a été récupéré contenant les protéines recombinantes. L'extrait protéique contenant GST-DDX10 a été ajouté aux billes de glutathione-sépharose (Pharmacia) préalablement lavées avec du NET-2 à 4°C pendant une heure sur le Nutator. Cette étape a été suivie par un lavage avec du NET-2 et l'ajout de l'extrait protéique sur les billes pendant une heure à 4°C sur le Nutator. On a élué avec le tampon d'éluion (50 mM Tris-HCl, 10 mM reduced glutathione, pH 8.0) et l'éluât a été déposé sur un gel de protéine pour vérifier la qualité de purification en ayant un contrôle négatif d'extrait protéique de bactéries «Rosetta» non induites. (GST Gene Fusion System, Amersham Biosciences) (Klinga-Levan *et al.*, 1993).

2.7. Régulation de l'expression de la protéine DDX10

Dans le but de réguler l'expression de la protéine DDX10, la séquence correspondante à siRNA5 «small interfering RNA» (Qiagen) dirigé contre l'ARNm de DDX10 a été clonée dans le plasmide pSingle-tTS-shRNA (Clontech) en digérant avec l'enzyme de restriction HindIII pour obtenir la séquence en aval du promoteur pTRE-U6. La production du siRNA5 se manifeste seulement en ajoutant la doxycycline ou la tétracycline (0.5-2 µg/ml) dans le milieu. Cela permet de contrôler la suppression de DDX10 dans la cellule. Cependant, siRNA5 a été dirigé seulement envers la séquence 3'UTR de l'ARNm DDX10 endogène. Théoriquement, l'ARNm DDX10 exogène ne devrait pas être altéré parce qu'il contient une séquence 3'UTR différente de celle de

l'endogène. Ainsi, une lignée stable de cellules HeLa a été créée (selon le protocole de la section 2.2) à partir du plasmide construit (pSH-DDX10) contenant le marqueur à la néomycine (neo^r) et code pour le suppresseur tTS. En parallèle, une lignée stable a été créée à partir du plasmide pSingle-tTS-shRNA utilisée comme contrôle négative.

Pour étudier les mutants de DDX10, cette lignée stable dérivée de cellules HeLa (HeLa-pSH-DDX10) a été transfectée avec les plasmides (pcDNA-3FLAG-DDX10, pcDNA-3FLAG-DDX10 Δ et pcDNA-3FLAG-DDX10-L566V) et incubée pendant 48 heures avec 1 μ g/ml de doxycycline. Des cellules non transfectées ont été utilisées comme contrôles induites ou non à la doxycycline. Par la suite, on a trypsinisé les cellules et centrifugé à 1500 rpm pendant 10 minutes. Les culots ont été lavés avec du PBS et resuspendus dans du Trizol (Invitrogen) (1 ml pour 10 million de cellules) puis incubés pendant 5 minutes à la température de la pièce. Ensuite, 0.2 ml de chloroforme ont été ajoutés à chaque ml de Trizol. Après quelques minutes d'incubation, les échantillons ont été centrifugés pendant 10 minutes à une vitesse de 15000 xg à 4°C. La phase aqueuse (surnageant) est mélangée avec de l'isopropanol (0.2 ml par ml de Trizol) et centrifugée pendant 10 minutes à une vitesse de 12000 xg à 4°C. Le culot a été lavé avec de l'éthanol et resuspendu dans de l'eau (RNase free). On a procédé, par la suite, avec une RT-PCR aléatoire en utilisant un «Master Mix» du kit «TaqMan» de la compagnie Invitrogen contenant l'enzyme reverse transcriptase (RT) pour obtenir des séquences d'ADN à partir d'ARN. Par la suite, un PCR a été réalisé en utilisant des amorces dirigées contre *DDX10* en amont de l'extension C-terminale. Des amorces dirigées contre *GAPDH* ont été utilisées dans le but d'avoir un contrôle de chargement sur gel.

Aussi, un contrôle sans RT est utilisé pour déterminer si une contamination d'ADN a eu lieu dans l'échantillon d'ARN.

2.8. FACS et prolifération cellulaire

Des cellules HeLa ont étéensemencées dans une plaque de six puits (100000 cellules/puit) et transfectées, le lendemain, avec les constructions pBact-FLAG-DDX10, pBact-FLAG-DDX10 Δ , pBact-FLAG-DDX10-L566V et le plasmide EGFP en utilisant l'agent de transfection Fugene HD (voir méthode section 2.2). Deux jours plus tard, les cellules ont été comptées à l'hématimètre et centrifugées à 1500 rpm pendant 10 minutes. Le culot a été resuspendu dans 200 μ l de PBS froid ajouté par 4 ml d'éthanol 70% froid pour les garder réfrigérées pour une durée de 24 à 72 heures. Ensuite, les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 1000 rpm et le culot a été resuspendu avec 1 ml de solution de Propidium (40 μ g/ml de Propidium Iodide et 10 μ l de RNase A /950 μ l de PBS). On a incubé pour une durée de 30 minutes à 3 heures et on a lu les échantillons au FACS «Fluorescence-activated cell sorting».

Finalement, la prolifération cellulaire a été étudiée en immunofluorescence à l'aide de la protéine Ki-67. Cette dernière, trouvée majoritairement dans le nucléole, est utilisée comme un marqueur de prolifération. Des cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions pBact-FLAG-DDX10, pBact-FLAG-DDX10 Δ et/ou pBact-FLAG-DDX10-L566V et incubées pendant 2 jours (voir méthode de la section 2.2). Par la suite, des expériences d'immunomicroscopie ont été réalisées en utilisant l'anticorps anti-Ki-67 comme anticorps primaire et un anticorps secondaire (alexa 488) anti-lapin selon le

protocole de la section 2.3. Des quantifications, avec le programme ImageJ, ont été effectuées pour calculer la quantité de fluorescence sur chaque lamelle et faire la comparaison avec les différentes constructions utilisées.

CHAPITRE III: RÉSULTATS

3.1. Détection de la protéine 3FLAG-DDX10 dans les cellules HeLa par immunomicroscopie.

Le but de l'expérience suivante est de déterminer la distribution de la protéine DDX10 dans les cellules HeLa.

Après avoir obtenu la lignée stable de cellules HeLa possédant la protéine 3FLAG-DDX10wt, 3FLAG-DDX10 Δ et/ou 3FLAG-DDX10-L566V, les cellules ont été installées sur des lamelles et gardées pendant 48 heures à 37°C. Par la suite, les lamelles ont été révélées en immunomicroscopie en utilisant l'anticorps anti-FLAG de lapin et anti-Fibrillarine de souris (contrôle pour le nucléole). Dans la Figure 3.1, on observe seulement quelques nucléoles en vert (DDX10) comparativement au contrôle positif (rouge, Fibrillarine). Ce résultat était surprenant compte tenu qu'il est attendu d'avoir tous les nucléoles en vert dans la lignée stable possédant la construction 3FLAG-DDX10 résistante à la néomycine.

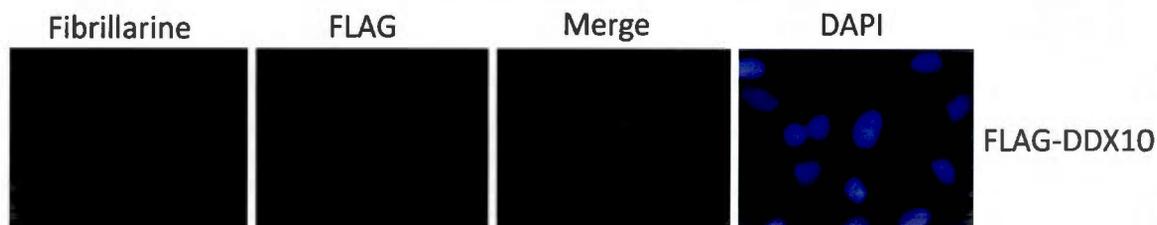


Figure 3.1. Immunomicroscopie de la lignée stable possédant la construction FLAG-DDX10. Les anticorps anti-FLAG (vert) et anti-Fibrillarine (rouge) ont été utilisés respectivement pour la détection de FLAG-DDX10 et du marqueur de nucléole (Fibrillarine). Le bleu représente DAPI colorant les noyaux.

3.2. Détection de la protéine 3FLAG-DDX10 exprimée dans les cellules HeLa par immunobavardage.

Dans l'objectif d'analyser l'expression de DDX10 en provenance des deux plasmides pBact-FLAG et pcDNA3.1, des cellules HeLa ont été transfectées transitoirement avec les plasmides pcDNA-3FLAG-DDX10wt, pBact-FLAG-DDX10wt, pcDNA-3FLAG-DKC1 et/ou pBact-FLAG-DKC1 dont les deux derniers encodent pour la Dyskérine. Les plasmides d'origine pcDNA3.1 possèdent un promoteur CMV différent de celui dans le plasmide pBact. Dans la figure 3.2, on remarque l'absence de la bande correspondant à Dyskérine, lorsqu'on transfecte les cellules avec le plasmide pcDNA-3FLAG-DKC1. Tandis qu'elle est présente dans le cas de la transfection avec le plasmide pBact-FLAG-DKC1. Aussi, on observe que DDX10 est beaucoup moins exprimée lorsqu'on transfecte les cellules avec le plasmide pcDNA-3FLAG-DDX10wt comparativement à la transfection avec le plasmide pBact-FLAG-DDX10wt. L'expression de FLAG-DDX10wt est présentée par une bande autour de 105 kDa et celle de la protéine FLAG-dyskérine est à l'entour de 60 kDa.

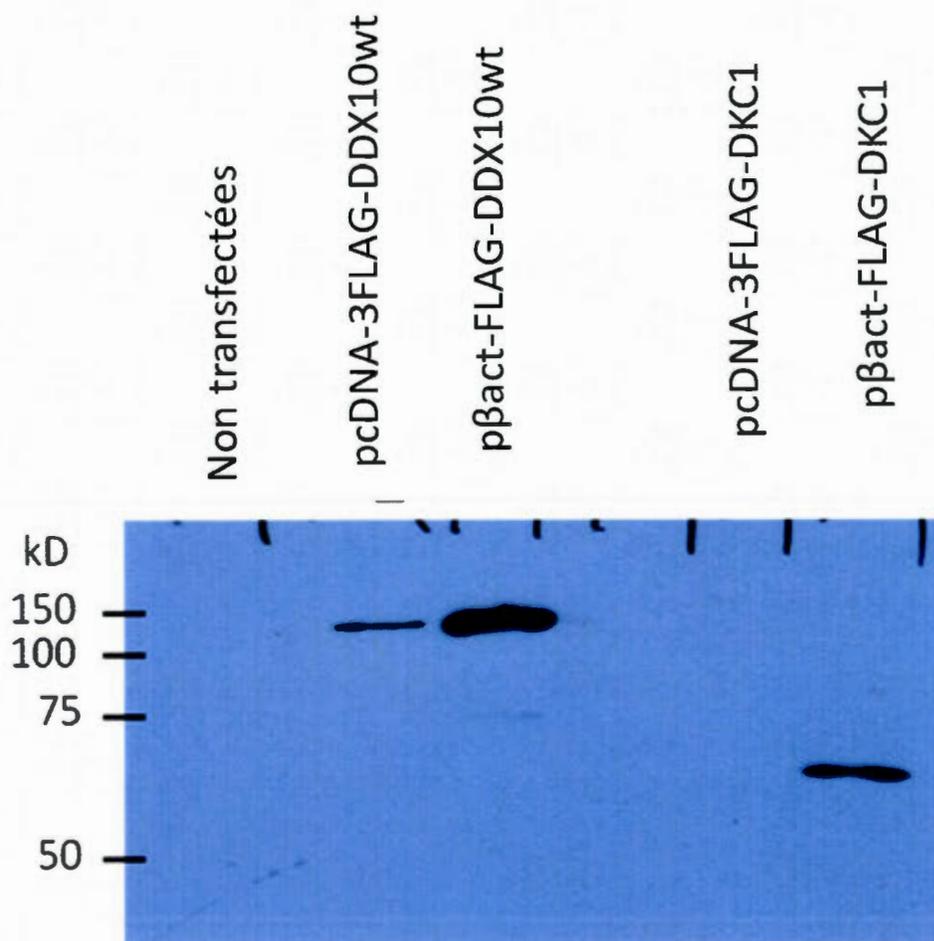


Figure 3.2. Expression de la protéine 3FLAG-DDX10 dans les cellules HeLa. Immunobavardage montrant l'expression de la protéine 3FLAG-DDX10 en provenance des plasmides pcDNA-3FLAG-DDX10 et pBact-FLAG-DDX10 dans les cellules HeLa. La protéine Dyskérine (DKC1) est exprimé similairement en utilisant les mêmes plasmides pcDNA-3FLAG et pBact-FLAG.

3.3. Étude de la lignée stable HeLa-pSH-DDX10 transfectée avec les mutants de DDX10.

Le but de cette expérience est de tester l'effet de l'induction de la lignée stable (HeLa-pSH-DDX10) à la doxycycline sur l'expression de DDX10. Aussi, on veut observer l'effet de sauvetage des mutants de DDX10 lorsque l'expression de DDX10 endogène est bloquée. La lignée stable pSH-DDX10 est transfectée avec les constructions pBact-FLAG-DDX10wt, pBact-FLAG-DDX10 Δ et/ou pBact-FLAG-DDX10-L566V pendant 48 heures en ayant des cellules contrôles non transfectées. Dans toutes les conditions, les cellules sont induites avec 1 μ g/ml de doxycycline sauf la moitié des cellules non transfectées. Dans la Figure 3.3, on analyse la quantité d'ARNm de DDX10 en effectuant un RT-PCR avec des amorces dirigées contre la partie codante de DDX10. Deux clones de la lignée stable HeLa-pSH-DDX10 sont analysés en RT-PCR dont un exemple est celui de la figure 3.3. L'ARNm de la GAPDH est utilisée comme contrôle de chargement pour normaliser les bandes de DDX10. Aussi, les contrôles négatifs (-RT) sont utilisés pour observer le taux de contamination de l'échantillon d'ARN du départ avec de l'ADN. Pour bien analyser les résultats, il faut soustraire la bande négatif (-RT) de la bande positif (+RT) et normaliser la dernière avec la bande de GAPDH. Il est très clair que les échantillons d'ARN du départ sont contaminés avec de l'ADN, ceci est observé dans les puits -RT. Après la normalisation des deux bandes de DDX10 dans les cellules non transfectées induites ou non, il est remarquable que les bandes ont presque la même intensité. De plus, les bandes correspondantes aux mutants de DDX10 sont plus intenses comparé à DDX10wt ou les non transfectées, surtout la bande du mutant DDX10-L566V une fois normalisée avec la bande de GAPDH.

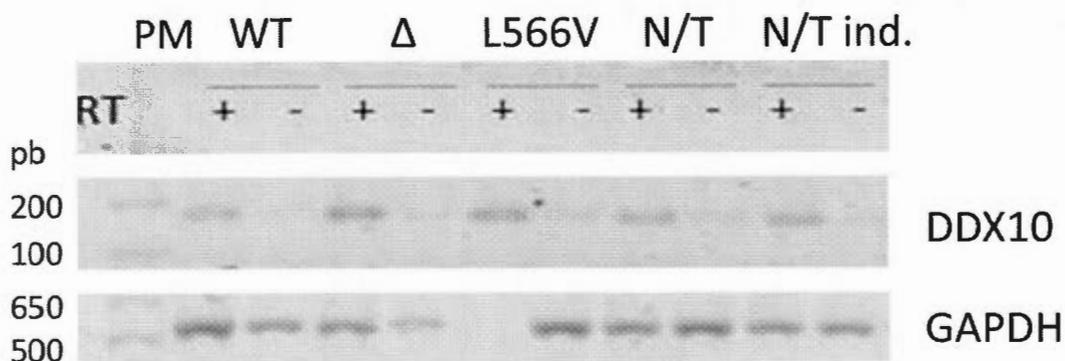


Figure 3.3. Étude de la lignée stable HeLa-pSH-DDX10 en présence des mutants de DDX10. Comparaison de la quantité de l'ARNm de DDX10 dans la lignée stable HeLa-pSH-DDX10 transfectée avec les constructions DDX10wt, DDX10Δ et/ou DDX10-L566V étudié en RT-PCR. L'analyse de l'ARNm de GAPDH est utilisée comme un contrôle de chargement. Des amorces dirigées contre DDX10 et contre GAPDH ont été utilisées pour effectuer cette expérience. Toutes les conditions sont induites à la doxycycline à l'exception d'un des contrôles non transfectée (N/T).PM (poids moléculaire), N/T (non transfectée), N/T ind. (non transfectée et induite à la doxycycline), WT (pcDNA-3FLAG-DDX10wt), Δ (pcDNA-3FLAG-DDX10Δ), L566V (pcDNA-3FLAG-DDX10-L566V) et RT (reverse transcriptase).

3.4. Localisation de DDX10 et de ses mutants avec Che-1 dans les cellules HeLa.

Dans le but d'étudier la co-localisation de DDX10 et ses deux formes mutées avec Che-1, des cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions pBact- FLAG-DDX10, pBact-FLAG-DDX10Δ et/ou pBact-FLAG-DDX10-L566V et analysées par immunofluorescence en utilisant les anticorps anti-FLAG et anti-Che-1. Le colorant bleu (DAPI) est utilisé comme marqueur du noyau. Dans la figure 3.4, on observe que FLAG-DDX10 co-localise avec Che-1 dans les nucléoles des cellules transfectées. De

plus, cette co-localisation des deux protéines apparaît aussi avec les deux mutants de DDX10. Cette co-localisation est indiquée par la couleur jaune (Merge).

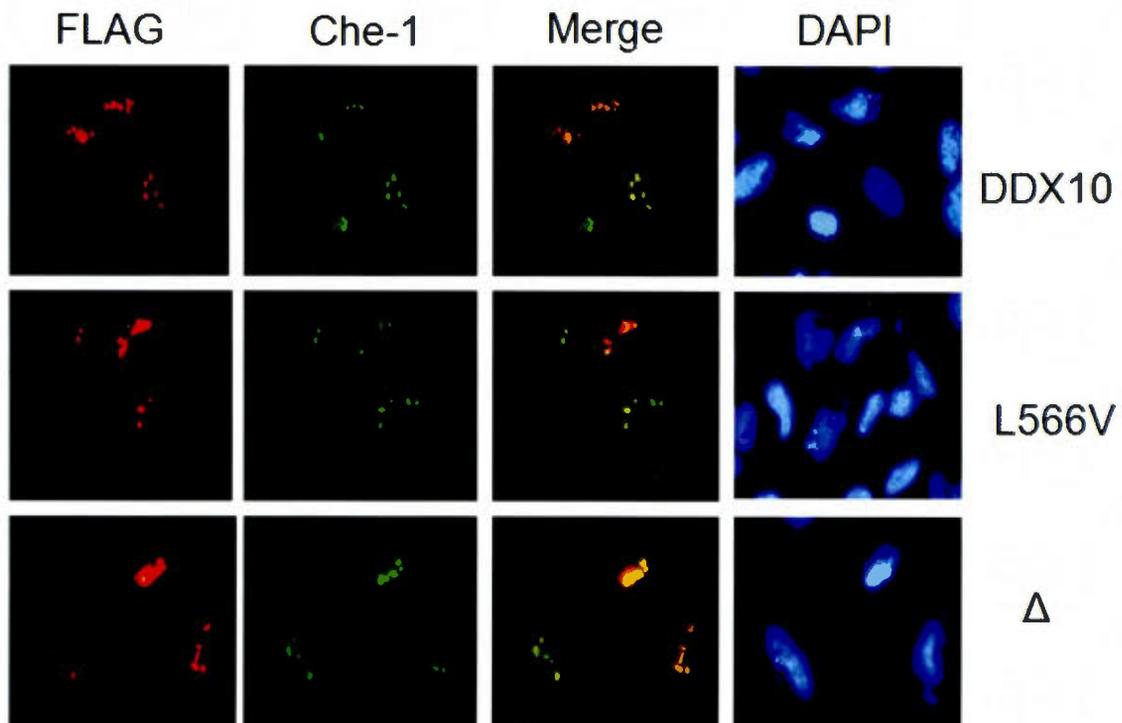


Figure 3.4. Immunomicroscopie des cellules HeLa transfectées avec les constructions pBact-FLAG-DDX10 et les mutants. Les protéines FLAG-DDX10 wt, FLAG-DDX10-L566V et FLAG-DDX10 Δ sont indiquées en rouge, Che-1 en vert et la co-localisation des deux protéines en jaune (Merge). Les noyaux sont colorés en bleu avec le DAPI.

3.5. Étude de l'immunoprécipitation de FLAG-DDX10 avec Che-1/AATF.

L'objectif de la prochaine expérience est d'analyser l'interaction entre DDX10 et ses deux formes mutées avec Che-1 en immunoprécipitation. Des cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions pBact-FLAG-DDX10, pBact-FLAG-DDX10 Δ et/ou pBact-FLAG-DDX10-L566V pendant 48 heures à 37°C. Les extraits protéiques sont, ensuite, incubés avec des billes d'agarose couplées à des anticorps anti-FLAG. Les protéines immunoprécipitées avec les billes sont chargées sur un gel de protéine et transférées sur une membrane de PVDF. Cette dernière a été analysée par immunobavardage (Western blot) à l'aide des anticorps anti-Che-1/AATF ou anti-FLAG. Dans la Figure 3.5, Che-1 est présent dans tous les puits sauf dans celui des cellules HeLa non transfectées (N/T) incubées avec des billes anti-FLAG. L'anticorps anti-FLAG est utilisé comme contrôle positif pour confirmer la présence de FLAG-DDX10. On remarque la présence de cette dernière dans tous les puits sauf dans ceux qui correspondent aux cellules HeLa non transfectées.

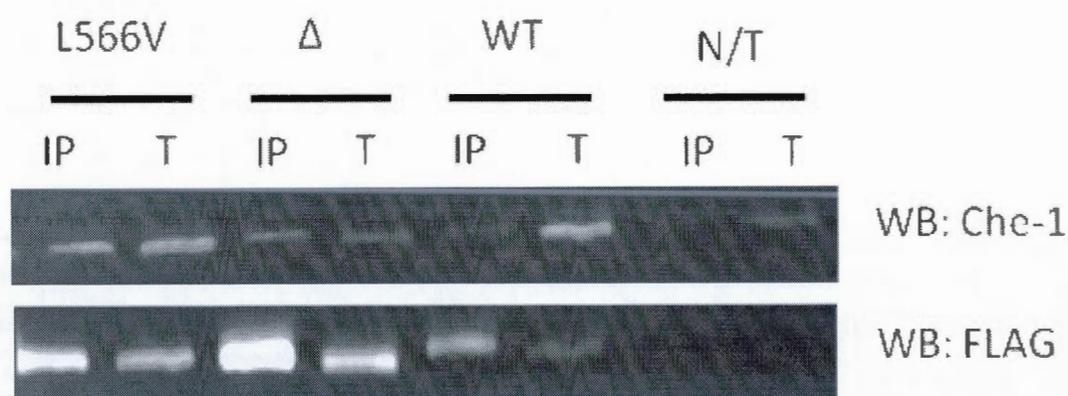


Figure 3.5. Immunobavardage de l'interaction entre FLAG-DDX10 et Che-1. Un extrait de cellules HeLa exprimant FLAG-DDX10wt, FLAG-DDX10 Δ et FLAG-DDX10-L566V a été utilisé pour des Immunoprécipitations (IP) anti-FLAG. Che-1 est présent dans tous les puits sauf dans celui correspondant à l'extrait protéique dépourvu de FLAG-DDX10 et incubé avec les billes. Western blot (WB), extrait total (T), immunoprecipitation (IP) et extrait des cellules non transfectées (N/T).

3.6. Étude du cycle cellulaire des cellules HeLa transfectées avec les mutants de DDX10.

Des cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions pBact-FLAG-DDX10wt, pBact-FLAG-DDX10 Δ et/ou pBact-FLAG-DDX10-L566V pendant 48 heures suivies par une analyse par FACS «Fluorescence-activated cell sorting». Cette expérience a permis d'étudier les différentes phases du cycle cellulaire et de déterminer la proportion de cellules dans chacune des phases et conclure l'état de la cellule (sénescence, division, etc.). Dans la Figure 3.6, on voit qu'avec le mutant DDX10-L566V, plus de cellules sont présentes en phase G2/M et en phase S. Un cas un peu différent est celui du mutant DDX10 Δ : la présence des cellules en phase S est plus grande qu'en phase G1 ou G2, mais cela n'est pas très significatif. Ces données ne sont pas considérables parce que la différence entre les colonnes n'est pas assez grande. Des cellules HeLa transfectées avec les plasmides EGFP et pBact-FLAG-DDX10wt sont utilisées comme contrôles. Il est évident de voir le chevauchement des résultats entre les colonnes, surtout en

présences des barres d'erreurs; ce qui est difficile de tirer une conclusion après l'analyse.

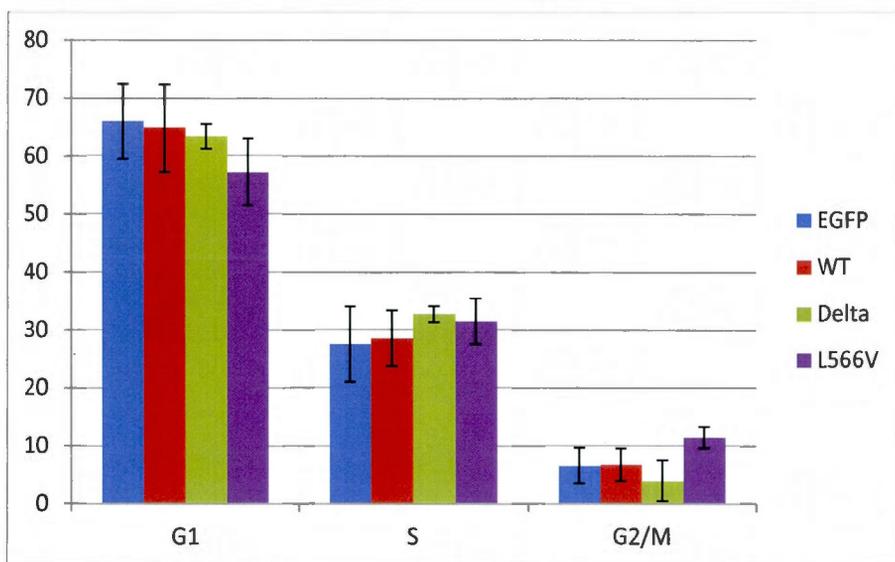


Figure 3.6. Effet des mutations de DDX10 sur le cycle cellulaire. Les cellules HeLa ont été transfectées avec différents plasmides pendant 48 heures. Elles sont ensuite fixées et colorées avec le propidium iodide (PI) et analysées en «Fluorescence-activated cell sorting» (FACS). Les cellules HeLa transfectées avec pBact-FLAG-DDX10-L566V se trouvent plus en phase G2/M et en phase S (violet). Tandis que les cellules transfectées avec pBact-FLAG-DDX10 Δ (vert) accumulent légèrement en phase S, comparés à des cellules HeLa transfectées avec les plasmides EGFP ou pBact-FLAG-DDX10wt (bleu et rouge, respectivement). WT : pBact-FLAG-DDX10wt, Delta : pBact-FLAG-DDX10 Δ , L566V : pBact-FLAG-DDX10-L566V. (n=3)

3.7. Effet des mutants de DDX10 sur la prolifération cellulaire.

Des cellules HeLa (100 mille cellules/puits) ont été transfectées avec les constructions pBact-FLAG-DDX10wt, pBact-FLAG-DDX10 Δ ou pBact-FLAG-DDX10-L566V et elles sont incubées pendant 2 jours. Les cellules vivantes sont comptées avec l'hématimètre sous le microscope pour étudier le taux de prolifération des cellules transfectées avec les différents plasmides. Dans la Figure 3.7, le nombre de cellules HeLa transfectées avec EGFP et FLAG-DDX10wt diminue, probablement, à l'agent de transfection qui est légèrement toxique pour la cellule. Malgré cette mortalité, les cellules HeLa transfectées avec FLAG-DDX10 Δ prolifèrent 1.6 fois plus que les cellules HeLa contrôles. De même, les cellules HeLa transfectées avec FLAG-DDX10-L566V accélèrent leur prolifération de 1.8 fois comparativement aux cellules HeLa contrôles. Cependant, il aurait été préférable de réaliser un test d'efficacité de la transfection des différents plasmides en utilisant un plasmide codant pour lacZ.

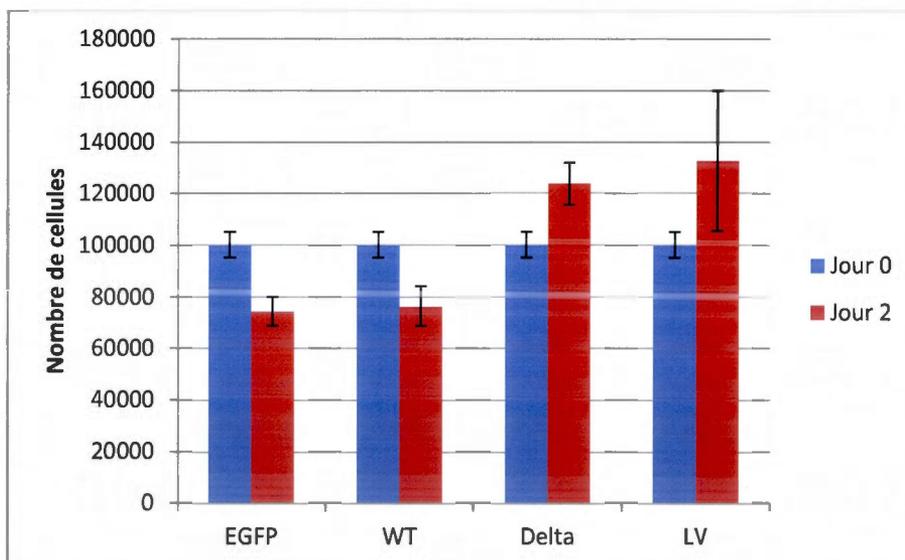


Figure 3.7. Effet des mutations de DDX10 sur la prolifération cellulaire. Des cellules HeLa transduits avec les constructions EGFP, pBact-FLAG-DDX10 (WT), pBact-FLAG-DDX10 Δ (delta) ou/et pBact-DDX10-L566V (LV) ont été compté deux jours après la transfection. Le bleu de trypan a été utilisé pour colorer en bleu les cellules mortes et pouvoir compter les cellules blanches. Le nombre de cellules HeLa transfectées avec DDX10 Δ ou DDX10-L566V est plus grand comparé à celui des cellules contenant les plasmides EGFP ou FLAG-DDX10. Après avoir répété l'expérience trois fois (n=3), la moyenne des valeurs obtenues montre que les cellules possédant DDX10-L566V sont 1.8 fois plus nombreuses que les cellules contrôles. De même, les cellules avec DDX10 Δ sont présentes 1.6 fois plus comparativement aux contrôles.

3.8. Étude du marqueur de prolifération cellulaire (Ki-67) dans les cellules HeLa transfectées avec les mutants de DDX10.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions pBact-FLAG-DDX10, pBact-FLAG-DDX10 Δ et/ou pBact-FLAG-DDX10-L566V et analysées par immunofluorescence. L'anticorps anti-Ki-67 détecte le marqueur de prolifération cellulaire localisé majoritairement dans le nucléole. Un anticorps anti-fibrillarine est utilisé comme marqueur du nucléole. Le but de cette expérience est de détecter la fluorescence moyenne de plusieurs champs microscopiques et de pouvoir comparer les valeurs entre autres. La figure 3.8 est une image exemple parmi plusieurs utilisées pour faire la quantification de la fluorescence; on observe ainsi la protéine Ki-67 en vert et fibrillarine en rouge. La co-localisation des deux protéines est représentée par la couleur jaune (Merge). Le Tableau 3.1 représente la quantification moyenne de la fluorescence en couleur vert de cinq champs microscopiques. Les valeurs ci-dessous représentent celles mesurées dans toutes les cellules incluant celles dépourvu de

plasmide. La valeur la plus élevée est celle des cellules transfectées avec le mutant DDX10-L566V (21.91), comparativement aux cellules HeLa transfectées avec FLAG-DDX10 (9.15). Cependant, en ce qui concerne le mutant DDX10 Δ , la valeur moyenne est de 14.79, indiquant deux fois plus d'intensité comparativement aux cellules transfectées avec DDX10 sauvage. Les cellules HeLa transfectées avec FLAG-DDX10 sont utilisées comme contrôle. Pour améliorer l'expérience, on aurait pu utiliser des anticorps anti-FLAG pour identifier les cellules ayant reçu le plasmide et ainsi faire la quantification sur ces cellules en particulier.

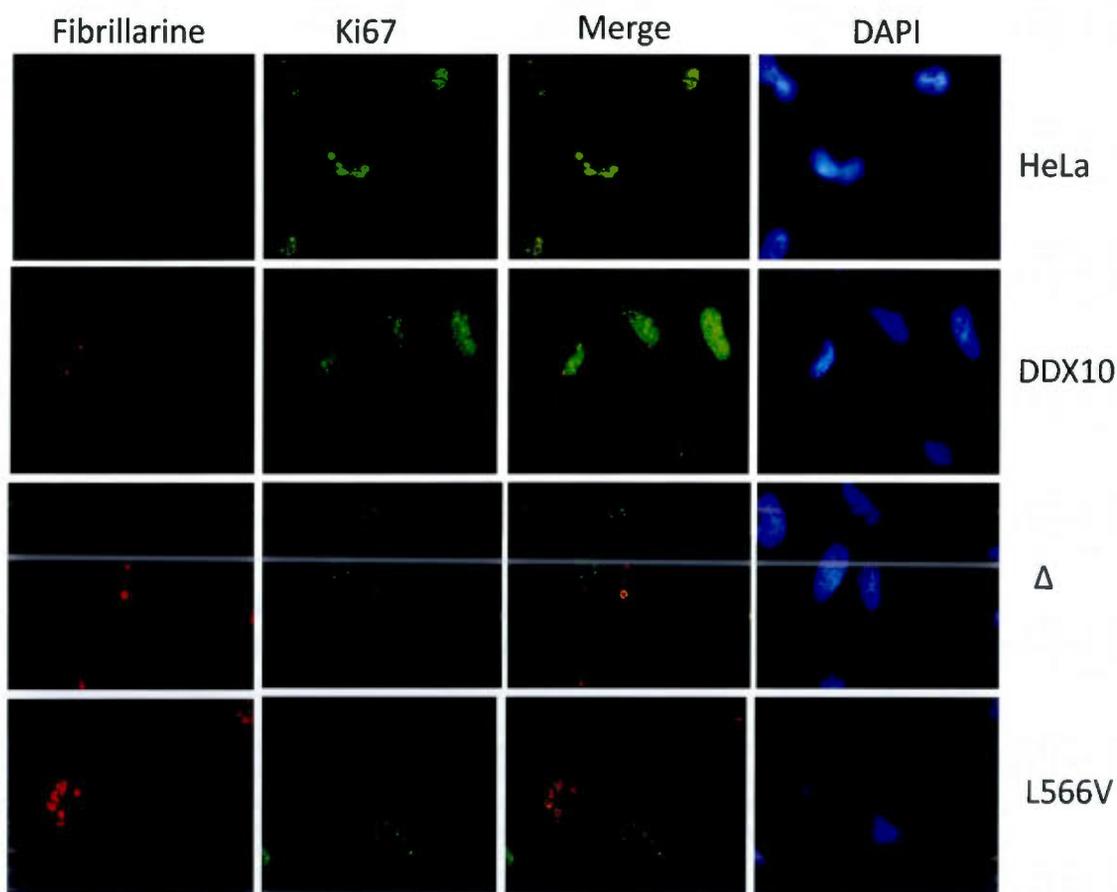


Figure 3.8. Étude de la prolifération cellulaire chez les cellules HeLa en immunofluorescence. Des anticorps anti-Ki-67 (facteur de prolifération) ont été utilisés en immunofluorescence des cellules HeLa transfectées avec des constructions DDX10wt, DDX10 Δ et/ou DDX10-L566V.

Tableau 3.1. Valeur moyenne de l'intensité de la fluorescence de chaque cellule exprimant Ki67.

	DDX10wt	DDX10 Δ	DDX10-L566V	incertitude
Moyenne	9.15	14.79	21.91	(+/-) 2.8

3.9. Expression de la protéine recombinante GST-DDX10 Δ N dans les bactéries Rosetta.

Le but de cette expérience est de déterminer la température et le temps d'incubation convenables de l'induction de la protéine recombinante GST-DDX10 par l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) et avoir la meilleure expression dans les bactéries *E.coli* «Rosetta». La température est variée de 30°C à 37°C en changeant aussi le temps d'incubation de 0, 30, 60 et 120 minutes et pour permettre d'analyser laquelle des conditions est la meilleure pour obtenir une expression maximale et le minimum de dégradation. Cinq μ g d'extrait de protéines obtenu pour chaque condition a été chargé dans le gel d'acrylamide et détecté par immunoblotage en utilisant l'anticorps anti-GST. Dans la Figure 3.9, on observe la bande la plus haute autour de 95 kDa qui représente la protéine de fusion GST-DDX10 Δ N. Le reste des bandes sont des

dégradations de cette protéine. On remarque qu'après une heure d'incubation, l'expression de la protéine recombinante est maximale, mais les dégradations sont très importantes. La condition idéale est celle de 2 heures d'induction à 30 °C, pour laquelle le ratio (expression/dégradation) est au maximale comparativement à toutes les pistes. Un contrôle de Rosetta dépourvue de plasmide pGEX-DDX10ΔN est utilisé comme contrôle négatif.

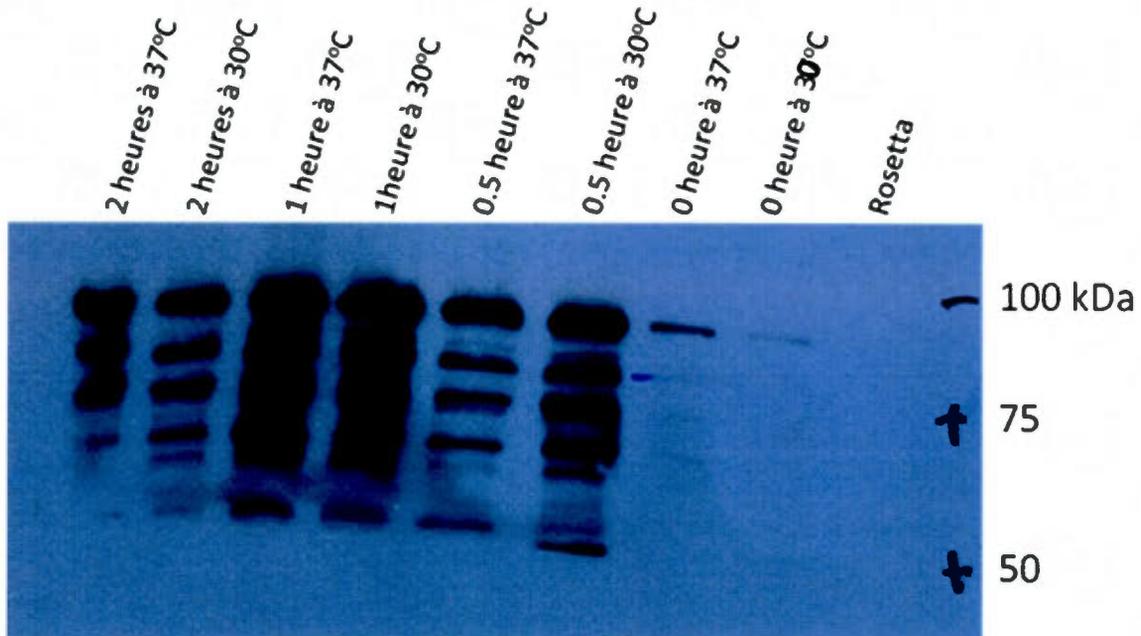


Figure 3.9. Expression de la protéine DDX10 dans les bactéries Rosetta. Ces dernières ont été transformées avec le plasmide pGEX-DDX10 Δ N et induites avec l'IPTG sous différentes conditions en alternant la température entre 30 °C et 37 °C. Le temps d'incubation est varié de 0 à un maximum de deux heures. L'extrait bactérien de chaque condition est chargé sur gel d'acrylamide et détecté par un immunobavardage en utilisant l'anticorps anti-GST. Les bandes autour de 95 kDa représentent la protéine recombinante GST-DDX10- Δ N. Des bactéries Rosetta non induites ont été utilisées comme contrôle négatif.

CHAPITRE IV- DISCUSSION

4.1. Le plasmide pcDNA-3FLAG est un mauvais choix pour l'étude de DDX10.

Le plasmide pcDNA3.1 possède le gène de résistance à la néomycine. Le choix de ce plasmide a permis de créer une lignée stable avec les constructions pcDNA3.1-3FLAG-DDX10, pcDNA3.1-3FLAG-DDX10 Δ et/ou pcDNA3.1-3FLAG-DDX10-L566V. Aussi, la lignée stable permet de compter les cellules pour évaluer la prolifération. Un des clones de cellules HeLa pcDNA-3FLAG-DDX10 est étudié en immunofluorescence en utilisant les anticorps anti-FLAG et anti-fibrillarine (Fig. 3.1). On s'attendait à observer des nucléoles en vert qui co-localisent avec la fibrillarine. Cependant, en ignorant le bruit de fond, on remarque que la plupart des nucléoles ne sont pas colorés. Ces cellules prolifèrent dans un milieu contenant de la néomycine, ce qui montre que les cellules ont reçu le gène de résistance. Mais la protéine DDX10 n'est pas exprimée, vu en microscopie, ce qui suggère le fait que le gène de cette protéine a été intégré dans le génome dans un mauvais endroit empêchant son expression. Aussi, il se peut que le promoteur CMV soit méthylé inhibant ainsi l'expression de FLAG-DDX10 dans la lignée stable. Tout cela suggère que pcDNA3.1 n'est pas un bon choix pour exprimer DDX10.

Lorsqu'on procède avec la transfection transitoire avec le plasmide pcDNA3.1-3FLAG-DDX10 et/ou ses mutants, la présence de FLAG-DDX10 est clairement détectée dans le nucléole par immunofluorescence à l'aide de l'anticorps anti-FLAG (données non présentées). En utilisant l'agent de transfection FuGENE HD, 55% des cellules HeLa

reçoivent le plasmide. Des résultats presque similaires sont obtenus en transfectant les cellules HeLa avec le plasmide pBact-FLAG-DDX10. On voit que FLAG-DDX10 est présente dans le nucléole d'environ 65% des cellules (Fig. 3.4). Après avoir effectué l'immunobavardage avec l'anticorps anti-FLAG, les résultats montrent que FLAG-DDX10 et FLAG-dyskérine (FLAG-DKC1) sont exprimées fortement avec les plasmides pBact-FLAG-DDX10wt et pBact-FLAG-DKC1, tandis que l'expression de FLAG-DDX10 avec le plasmide pcDNA-3FLAG-DDX10 est beaucoup plus faible (Fig. 3.2) ou parfois inexistante (données non présentées). De même, l'expression de FLAG-dyskérine dans les cellules avec le plasmide pcDNA-3FLAG-DKC1 est toujours absente. Tout cela permet de confirmer que le plasmide pcDNA3.1 n'est probablement pas un bon choix pour l'expression de FLAG-DDX10. Ceci nous a obligés à continuer le projet de recherche avec le plasmide pBact-FLAG-DDX10.

4.2. Créer une lignée stable avec le plasmide pSH-DDX10 dans les cellules HeLa.

Dans le but de réguler l'expression de DDX10 d'une manière constante et contrôlable, une lignée stable a été créée à partir du plasmide pSH-DDX10 qui code pour un siRNA dirigé contre l'ARNm de DDX10. Lorsqu'on ajoute la doxycycline dans le milieu, le promoteur est induit et permet la production du siRNA-DDX10. Cependant, le pSH-DDX10 construit n'est pas assez efficace pour produire des siRNA contre DDX10. Ceci est observé dans la figure 3.3 qui montre qu'en présence de la doxycycline, (induction du promoteur et production de siRNA), l'ARNm de DDX10 est produit en quantité égale comparable au non induit (N/T ind. et N/T, respectivement). Les bandes du bas

représentent l'ARNm de GAPDH utilisé comme contrôle de chargement. De plus, la lignée transfectée avec la construction FLAG-DDX10wt devrait donner une bande beaucoup plus intense car le siRNA-DDX10 est dirigé contre l'ARNm de DDX10 endogène en ciblant seulement la région 3'UTR. De plus, le contrôle de chargement indique un signal fort, et donc, on s'attendait à voir une bande plus intense que le non transfectée induit (N/T ind.). C'est le principe de sauvetage «rescue» qui permet de produire la même quantité d'ARNm de DDX10 perdue lors de l'induction. Pour les deux mutants de DDX10, le cas est différent. En se basant sur le contrôle de chargement, les bandes qui représentent les ARNm de DDX10 Δ et DDX10-L566V sont plus intenses que le contrôle (N/T ind.). Le DDX10-L566V attire l'attention parce qu'on a chargé une quantité minime puis la bande sort d'une intensité assez forte. Donc le principe de sauvetage fonctionne pour les deux mutants de DDX10. Des contrôles négatifs ont été utilisés dans chaque cas, réaction sans la reverse transcriptase (RT), indiquant ici la contamination des échantillons d'ARN de départ en ADN. En conclusion, cette lignée n'est pas fiable puisqu'en cas d'induction de la production de siRNA, la quantité d'ARNm DDX10 ne semble pas d'avoir diminuée. Malgré l'effet de sauvetage du cas du mutant DDX10-L566V, il est évident de se baser sur une lignée stable assez solide dans le contexte de la réduction de l'expression de DDX10.

4.3. Che-1/AATF est associé à DDX10 dans le nucléole.

Chez la levure, il a été démontré en co-immunoprécipitation que l'homologue de DDX10 (Dbp4) et l'homologue de Che-1 (Bfr2) sont associées (données non présentées). Le but de cette expérience est de déterminer si cette association existe aussi chez les mammifères et d'étudier si les mutations de DDX10 affecteraient cette association. Dans la Figure 3.4, des cellules HeLa sont transfectées avec les constructions FLAG-DDX10wt, FLAG-DDX10 Δ et/ou FLAG-DDX10-L566V. Des expériences d'immunofluorescence ont été faites après 2 jours de transfection en utilisant les anticorps anti-FLAG (rouge) et anti-Che-1 (vert). Dans le «Merge» la couleur jaune indique une co-localisation de DDX10 et Che-1. Les images montrent que DDX10 et Che-1 co-localisent dans le nucléole. Aussi, la même chose est observée chez les deux mutants de DDX10, ce qui indique que la présence des mutations ne change pas le fait que DDX10 co-localise avec Che-1 dans le nucléole.

Les expériences d'immunoprécipitation sont effectuées pour déterminer l'association entre les deux protéines. On remarque que les bandes autour de 95 kDa sont présentes dans toutes les pistes sauf dans celle de l'IP avec de l'extrait provenant des cellules non transfectées. Donc, Che-1 est associée à la forme sauvage de DDX10 de même qu'avec les formes mutées. Ainsi, les mutations de DDX10 dans l'extension C-terminale n'affectent pas l'association de DDX10 avec Che-1. L'anticorps anti-FLAG est utilisé pour confirmer les données et démontrer la présence de FLAG-DDX10 autour de 105 kDa. Le signal fort dans l'IP DDX10 Δ et du faible signal de Che-1 comparativement aux autres IP suggère une diminution de l'association entre les deux protéines en cas de ce mutant là. Enfin, il est très remarquable le signal fort dans les IP comparativement aux

extraits totaux «input» avec l'anticorps anti-FLAG, qui peut s'expliquer par le fait que la protéine recombinante est plus pure dans les IP, ce qui permet une meilleure liaison de l'anticorps sur la protéine. Il aurait été idéal d'employer des anticorps IgG non-spécifiques pour déterminer la spécificité du signal. Ceci aurait pu améliorer la qualité de l'expérience.

4.4. Effet des mutations de DDX10 sur la prolifération cellulaire.

Les deux mutations de DDX10 ont été trouvées chez des patientes atteintes du cancer du sein. Des expériences de FACS «Fluorescence-activated cell sorting» ont été faites pour déterminer l'effet des deux mutations de DDX10 sur le cycle cellulaire. Dans la Figure 3.6, les cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions FLAG-DDX10wt, FLAG-DDX10 Δ et/ou FLAG-DDX10-L566V ainsi que le plasmide EGFP puis on a procédé avec le FACS après 2 jours. Dans la population de cellules transfectées avec DDX10 Δ , le pourcentage de cellules en phase G1 diminue de 2.27% et de 40.7% en G2/M, et augmente de 14.8% en phase S et diminue comparativement au contrôle DDX10wt. Ces résultats suggèrent que la présence de DDX10 Δ dans la cellule permet sa rentrée en phase S. Pour DDX10-L566V, le cas est un peu différent; le pourcentage de cellules diminue de 11.7% en G1, augmente de 10.5% en S et de 68.5% en G2/M. Cela nous permet de suggérer que la mutation ponctuelle conduit les cellules vers la phase S et vers la phase G2/M du cycle cellulaire. Ces derniers résultats sont plus significatifs que ceux obtenus avec la transfection au DDX10 Δ parce que les cellules ont tendances à se trouver plus dans la phase de division cellulaire.

Le test de comptage cellulaire est effectué en parallèle avec l'expérience de FACS. Il permet de comparer le nombre de cellules de chaque population étudiées et de voir si les mutations de DDX10 affectent le nombre de cellules. Comme pour le FACS, au jour 0, les cellules ont étéensemencées et au jour 1, les cellules HeLa ont été transfectées avec les trois constructions de DDX10 et/ou le plasmide EGFP (Fig. 3.7). Deux jours après, les cellules possédant la mutation DDX10 Δ prolifèrent 1.6 fois plus rapidement que les cellules possédant DDX10 sauvage ou EGFP. La mortalité cellulaire est prise en considération puisque l'agent de transfection est légèrement toxique. De plus, les cellules possédant la mutation DDX10-L566V poussent en moyenne 1.8 fois plus vite que les cellules exprimant DDX10 sauvage. Toutes ces données montrent que les mutations jouent un rôle important dans la croissance cellulaire et dans l'accélération de la prolifération cellulaire. Cependant, les deux expériences précédentes ne sont pas suffisantes pour permettre de faire le lien direct avec la prolifération. Nous avons réalisé l'immunofluorescence pour vérifier la présence du marqueur de prolifération (Ki67) qui est plus présent lorsque la cellule est en division. Dans la Figure 3.8, les cellules HeLa sont toujours transfectées avec les trois constructions de DDX10. En immunofluorescence, l'anticorps anti-Ki-67 (vert) et l'anticorps anti-fibrillarine (rouge) sont utilisés. L'image montre que Ki-67 et la fibrillarine sont co-localisés dans le nucléole et que le premier se trouve aussi en minorité dans le cytoplasme. Cependant, à l'œil, cette image ne permet pas de montrer clairement la différence de fluorescence entre les différentes constructions jusqu'à la quantification du signal. Le tableau 3.1 montre la fluorescence moyenne de Ki-67 de 5 champs microscopiques de chaque

construction. La fluorescence moyenne de Ki-67 dans les cellules possédant FLAG-DDX10wt (9.15) est plus faible de celle de DDX10 Δ (14.79) qui, à son tour est inférieur à celle de DDX10-L566V (21.91). Ceci permet de conclure que les cellules avec le mutant DDX10-L566V prolifèrent presque deux fois plus rapidement que les cellules contrôle. Ce résultat concorde avec les deux images précédentes (3.6 et 3.7) qui montrent que la mutation ponctuelle accélère la prolifération cellulaire. Aussi, la délétion de 25 acides aminés de DDX10 semble avoir un effet sur la prolifération avec une accélération de presque 1.5 fois comparativement au contrôle. Tout cela confirme l'effet des mutations sur la prolifération cellulaire et surtout la mutation ponctuelle du 566^e acide aminé.

4.5. Purification de la protéine recombinante GST-DDX10 Δ N.

Après avoir déterminé l'interaction entre DDX10 et Che-1, il est intéressant de voir si cette interaction est directe ou indirecte. Aussi, dans le but de produire des anticorps dirigés contre l'extension C-terminale de DDX10 et dans l'objectif de réaliser des expériences de GST «pull-down» étudiant ainsi l'interaction des deux protéines, la protéine recombinante GST-DDX10 Δ N est exprimée dans les bactéries Rosetta. Les bactéries sont induites avec l'IPTG en changeant le temps d'incubation ainsi que la température (Fig. 3.9). L'extrait bactérien de chaque condition est préparé puis les protéines sont chargées dans un gel d'acrylamide suivi d'un transfert sur une membrane puis d'un immunobavardage en utilisant l'anticorps anti-GST. Le but de cette manipulation est de déterminer le ratio (expression/dégradation) le plus élevé. Les

bandes autour de 95 kDa représentent la protéine recombinante GST-DDX10 Δ N, et les bandes en dessous sont des dégradations. Un extrait protéique de Rosetta non induit est utilisé comme contrôle négatif. On remarque qu'après 1 heure, l'expression de la protéine recombinante est maximale ainsi que la dégradation. Le meilleur ratio (expression/dégradation) est obtenu après 2 heures d'incubation à 30°C, la bande autour de 95 kDa est assez intense et les dégradations sont plus minimales. La prochaine étape est de répéter cette expérience avec une induction à l'IPTG pendant 2 heures à 30°C mais avec un volume beaucoup plus grand. Une grande quantité «Large Scale» de bactéries est induite sous les mêmes conditions trouvées plus haut puis l'extrait protéique a été installé sur une colonne GSTrap contenant des billes d'agarose liant la protéine GST. L'extrait purifié sur colonne est ensuite mis sur gel d'acrylamide puis coloré avec du bleu de Coomassie. À la suite de l'analyse, aucune bande n'est apparue dans les pistes représentant le produit purifié final, ce qui montre que la purification de la protéine recombinante n'a pas fonctionné (données non présentées) et on ne peut pas procéder à l'immunisation de lapins pour pouvoir produire des anticorps anti-DDX10. De même, ces résultats ralentissent l'étude de l'interaction directe entre DDX10 et Che-1. D'autre part, lorsqu'on procède avec un immunobavardage en utilisant l'anticorps anti-GST, on trouve que GST-DDX10 Δ N n'est pas exprimée (données non présentées). Cette purification a été répétée deux fois sans obtenir de bandes. À cause du manque de temps, l'expérience n'a pas pu être modifiée en utilisant une autre protéine recombinante comme MBP-DDX10 Δ N.

4.6. Le système de double hybride n'est pas fonctionnel pour l'étude de l'interaction entre DDX10 et Che-1

Les plasmides pGBKT7-DDX10 et pGADT7-Che-1 ont été transformés dans la souche de levure AH109. Par la suite, les levures ont été étalées sur un milieu SD dépourvu de leucine (Leu) et de tryptophane (Trp). Après avoir réalisé cette expérience, la souche transformée avec les plasmides pGBKT7-DDX10 et pGADT7-Che-1 a été incubée à 30°C pendant 3 jours (données non présentées). Les levures n'ont pas poussé même après deux semaines d'incubation dans un milieu SD-Leu-Trp-His (données non présentées). Nous avons répété l'expérience 3 fois mais les levures ne poussent pas lorsque le milieu est dépourvu d'histidine. Pour confirmer l'interaction entre DDX10 et Che-1, les levures doivent pousser dans un milieu SD-Leu-Trp-His, qui n'est pas le cas ici. On peut déduire de ces résultats ne confirment pas l'interaction entre DDX10 et Che-1 dans le système de double hybride chez la levure. Aussi, il se peut que cette interaction ait de la difficulté à se manifester une fois les protéines exprimées dans la levure. Pour améliorer cette expérience, il est suggéré de tester le système de double hybride mais cette fois dans les cellules mammifères.

CHAPITRE V-CONCLUSIONS

DDX10 est une ARN hélicase putative localisée dans le nucléole. Elle co-localise et interagit avec le facteur anti-apoptotique Che-1/AATF dans le nucléole. Les deux mutations de DDX10 (délétion de 25 acides aminés (Δ) et la mutation ponctuelle (L566V)) semblent accélérer la prolifération cellulaire, surtout la mutation ponctuelle qui permet l'accumulation des cellules HeLa en phases S et G2/M. Aussi, le marqueur de prolifération est présent davantage dans la cellule possédant la mutation ponctuelle de DDX10, ce qui indique que cette mutation a un rôle important dans la prolifération cellulaire. De plus, les mutations de DDX10 n'affectent pas l'interaction ou la co-localisation de DDX10 avec Che-1. Malgré que le système de double hybride chez la levure n'ait pas fonctionné, la méthode de «GST-Pull down» pourrait être une bonne méthode pour déterminer l'interaction directe entre DDX10 et Che-1. Dans le futur, il sera intéressant d'utiliser un autre système pour purifier la protéine DDX10. Cela peut se faire en utilisant la protéine recombinante MBP-DDX10 qui pourrait être plus compatible pour DDX10. Aussi, il sera intéressant de déterminer quel fragment de DDX10 interagit avec Che-1. En somme, les mutations jouent un rôle dans l'accélération de la prolifération cellulaire mais elles n'ont aucun effet sur l'interaction entre DDX10 et Che-1.

Bibliographie

- Andreou, A. Z., et D. Klostermeier. 2012. «The DEAD-box helicase eIF4A: Paradigm or the odd one out?». *RNA Biol*, vol. 10, no 1.
- Arai, Y., et al. 1997. «The inv(11)(p15q22) chromosome translocation of de novo and therapy-related myeloid malignancies results in fusion of the nucleoporin gene, NUP98, with the putative RNA helicase gene, DDX10». *Blood*, vol. 89, no 11, p. 3936-3944.
- Bates, G. J., et al. 2005. «The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor». *EMBO J*, vol. 24, no 3, p. 543-553.
- Ben-Shem, A., et al. 2011. «The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution». *Science*, vol. 334, no 6062, p. 1524-1529.
- Boulon, S., et al. 2010. «The nucleolus under stress». *Mol Cell*, vol. 40, no 2, p. 216-227.
- Bruno, T., et al. 2006. «Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint». *Cancer Cell*, vol. 10, no 6, p. 473-486.
- Bruno, T., et al. 2010. «Che-1 promotes tumor cell survival by sustaining mutant p53 transcription and inhibiting DNA damage response activation». *Cancer Cell*, vol. 18, no 2, p. 122-134.
- Bruno, T., et al. 2008. «Che-1 activates XIAP expression in response to DNA damage». *Cell Death Differ*, vol. 15, no 3, p. 515-520.
- Byrd, A. K., et K. D. Raney. 2012. «Superfamily 2 helicases». *Front Biosci*, vol. 17, p. 2070-2088.
- Carmo-Fonseca, M., et al. 2000. «To be or not to be in the nucleolus». *Nat Cell Biol*, vol. 2, no 6, p. E107-112.

- Chao, C. H., et al. 2006. «DDX3, a DEAD box RNA helicase with tumor growth-suppressive property and transcriptional regulation activity of the p21waf1/cip1 promoter, is a candidate tumor suppressor». *Cancer Res*, vol. 66, no 13, p. 6579-6588.
- De Nicola, F., et al. 2007. «The prolyl isomerase Pin1 affects Che-1 stability in response to apoptotic DNA damage». *J Biol Chem*, vol. 282, no 27, p. 19685-19691.
- Dragon, F., et al. 2002. «A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis». *Nature*, vol. 417, no 6892, p. 967-970.
- Fairman, M. E., et al. 2004. «Protein displacement by DExH/D "RNA helicases" without duplex unwinding». *Science*, vol. 304, no 5671, p. 730-734.
- Fanciulli, M., et al. 2000. «Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb». *FASEB J*, vol. 14, no 7, p. 904-912.
- Filleur, S., et al. 2009. «INTS6/DICE1 inhibits growth of human androgen-independent prostate cancer cells by altering the cell cycle profile and Wnt signaling». *Cancer Cell Int*, vol. 9, p. 28.
- Fukawa, T., et al. 2012. «DDX31 Regulates the p53-HDM2 Pathway and rRNA Gene Transcription through Its Interaction with NPM1 in Renal Cell Carcinomas». *Cancer Res*, vol. 72, no 22, p. 5867-5877.
- Gietz, D., et al. 1992. «Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells». *Nucleic Acids Res*, vol. 20, no 6, p. 1425.
- Grundstrom, T., et al. 1985. «Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis». *Nucleic Acids Res*, vol. 13, no 9, p. 3305-3316.
- Guo, Q., et J. Xie. 2004. «AATF inhibits aberrant production of amyloid beta peptide 1-42 by interacting directly with Par-4». *J Biol Chem*, vol. 279, no 6, p. 4596-4603.
- Jackson, R. J., et al. 2010. «The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 11, no 2, p. 113-127.

- Kanno, Y., et al. 2012. «DP97, a DEAD box DNA/RNA helicase, is a target gene-selective co-regulator of the constitutive androstane receptor». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 426, no 1, p. 38-42.
- Klinga-Levan, K., et al. 1993. «Mapping of glutathione transferase (GST) genes in the rat». *Hereditas*, vol. 119, no 3, p. 285-296.
- Kontzoglou, K., et al. 2013. «Correlation between Ki67 and Breast Cancer Prognosis». *Oncology*, vol. 84, no 4, p. 219-225.
- Linder, P., et E. Jankowsky. 2011. «From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 12, no 8, p. 505-516.
- Maple, J., et S. G. Moller. 2007. «Yeast two-hybrid screening». *Methods Mol Biol*, vol. 362, p. 207-223.
- Meads, C., et al. 2012. «A systematic review of breast cancer incidence risk prediction models with meta-analysis of their performance». *Breast Cancer Res Treat*, vol. 132, no 2, p. 365-377.
- Montpetit, B., et al. 2012. «Analysis of DEAD-box proteins in mRNA export». *Methods Enzymol*, vol. 511, p. 239-254.
- Naji, S., et al. 2012. «Host cell interactome of HIV-1 Rev includes RNA helicases involved in multiple facets of virus production». *Mol Cell Proteomics*, vol. 11, no 4, p. M111 015313.
- Osheim, Y. N., et al. 2004. «Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol Cell*, vol. 16, no 6, p. 943-954.
- Oshiumi, H., et al. 2010. «Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN-beta induction». *PLoS One*, vol. 5, no 12, p. e14258.
- Page, G., et al. 1999. «AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis». *FEBS Lett*, vol. 462, no 1-2, p. 187-191.
- Parsyan, A., et al. 2011. «mRNA helicases: the tacticians of translational control». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 12, no 4, p. 235-245.

- Peck, M. L., et D. Herschlag. 2003. «Adenosine 5'-O-(3-thio)triphosphate (ATP γ S) is a substrate for the nucleotide hydrolysis and RNA unwinding activities of eukaryotic translation initiation factor eIF4A». *RNA*, vol. 9, no 10, p. 1180-1187.
- Pogacic, V., et al. 2000. «Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10». *Mol Cell Biol*, vol. 20, no 23, p. 9028-9040.
- Rajendran, R. R., et al. 2003. «Regulation of nuclear receptor transcriptional activity by a novel DEAD box RNA helicase (DP97)». *J Biol Chem*, vol. 278, no 7, p. 4628-4638.
- Raska, I., et al. 2006. «Structure and function of the nucleolus in the spotlight». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 18, no 3, p. 325-334.
- Russell, R., et al. 2012. «Toward a molecular understanding of RNA remodeling by DEAD-box proteins». *RNA Biol*, vol. 10, no 1.
- Savitsky, K., et al. 1996. «A human gene (DDX10) encoding a putative DEAD-box RNA helicase at 11q22-q23». *Genomics*, vol. 33, no 2, p. 199-206.
- Shibuya, T., et al. 2004. «eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay». *Nat Struct Mol Biol*, vol. 11, no 4, p. 346-351.
- Singleton, S. F., et al. 2007. «Probing the structure of RecA-DNA filaments. Advantages of a fluorescent guanine analog». *Tetrahedron*, vol. 63, no 17, p. 3553-3566.
- Sjoblom, T., et al. 2006. «The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers». *Science*, vol. 314, no 5797, p. 268-274.
- Sugiura, T., et al. 2007. «DDX39, upregulated in lung squamous cell cancer, displays RNA helicase activities and promotes cancer cell growth». *Cancer Biol Ther*, vol. 6, no 6, p. 957-964.
- Tanner, N. K., et al. 2003. «The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis». *Mol Cell*, vol. 11, no 1, p. 127-138.
- Theissen, B., et al. 2008. «Cooperative binding of ATP and RNA induces a closed conformation in a DEAD box RNA helicase». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no 2, p. 548-553.

- Thomas, M., et al. 2011. «The cellular DExD/H-box RNA-helicases UAP56 and URH49 exhibit a CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling activity». *PLoS One*, vol. 6, no 7, p. e22671.
- Turner, A. J., et al. 2009. «A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4». *Mol Cell Biol*, vol. 29, no 11, p. 3007-3017.
- Weston, A., et J. Sommerville. 2006. «Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation». *Nucleic Acids Res*, vol. 34, no 10, p. 3082-3094.
- Yassin, E. R., et al. 2010. «Effects of the NUP98-DDX10 oncogene on primary human CD34+ cells: role of a conserved helicase motif». *Leukemia*, vol. 24, no 5, p. 1001-1011.
- Zagulski, M., et al. 2003. «Mak5p, which is required for the maintenance of the M1 dsRNA virus, is encoded by the yeast ORF YBR142w and is involved in the biogenesis of the 60S subunit of the ribosome». *Mol Genet Genomics*, vol. 270, no 3, p. 216-224.