

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PROPRIÉTÉS ANTI-APOPTOTIQUES DE LA PROTÉINE L-ISOASPARTYL
MÉTHYLTRANSFÉRASE INDUITE PAR L'ACIDE VALPROIQUE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

KHADI DJOUMEL KANE

AOÛT 2014

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 à remercier mon Directeur de recherche Dr Richard Desrosiers qui a su m'accorder sa confiance tout au long de ma recherche. Son assistance et sa rigueur scientifique furent inestimables.

Aucun mot ne peut suffire pour remercier ma famille et surtout mon père qui en plus d'avoir été un soutien moral, a été mon soutien financier sans qui je n'aurais pu faire cette maîtrise. Mes parents, mes frères et soeurs et mon mari n'ont cessé de m'encourager dans toutes mes démarches. Et pour cela, je leur en serais toujours reconnaissante.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de travail Amira Ouanouki et Dahmane Ouazia qui m'ont assisté durant les nombreuses heures passées au laboratoire. Grâce à eux régnait une ambiance chaleureuse dans le laboratoire.

Plus particulièrement, je voudrais remercier Dahmane qui a non seulement été mon mentor durant mon stage effectué au laboratoire du professeur Desrosiers, mais n'a cessé depuis lors de répondre à tous mes questionnements.

Pour finir, je tiens à remercier toute personne qui de près ou de loin a contribué à la réussite de ce projet.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vi
RÉSUMÉ	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Les enzymes de réparation.....	1
1.2 Les méthyltransférases.....	2
1.3 La protéine L-isoaspartyl méthyltransférase (PIMT)	3
1.3.1 Historique de la PIMT	3
1.3.2 Formation des résidus aspartyls anormaux	5
1.3.3 Caractéristiques et expression tissulaire de la PIMT	8
1.3.4 Réparation des résidus L-isoaspartyls par la PIMT	11
1.3.5 Rôles biologiques de la PIMT	16
1.3.6 La régulation de la PIMT	20
1.4 Acide valproïque.....	21
1.4.1 Historique et propriétés	21
1.5 Apoptose et signalisation cellulaire.....	22
1.5.1 La voie mitochondriale ou voie intrinsèque.....	24
1.5.2 La voie des récepteurs de la mort (Fas, TNF-RI, TRAMP...) ou voie extrinsèque	25
1.5.3 La voie du stress du réticulum endoplasmique (RE).....	27
1.5.4 Régulation de l'apoptose par cascade de signalisation.....	28
1.5.5 Rôle anti-apoptotique de la PIMT	31
1.6 Objectif de la recherche	32
CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	33

2.1	Matériels	33
2.2	Méthodes.....	34
2.2.1	Culture cellulaire	34
2.2.2	Traitement des cellules avec l'acide valproïque et la roténone.	34
2.2.3	Transfection des cellules avec un ARNi contre la PIMT	34
2.2.4	Détachement, rattachement des cellules puis mesure de l'activité de la caspase 3	35
2.2.5	Mesure de l'activité des caspases 3 ou 9	35
2.2.6	Mesure de la prolifération cellulaire	35
2.2.7	Lyse cellulaire	36
2.2.8	Électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.....	36
2.2.9	Immunodétection.....	37
2.2.10	Analyses densitométriques et statistiques	38
CHAPITRE III		
RÉSULTATS		39
3.1	Un pré-traitement des cellules avec l'acide valproïque les protège contre l'action cytotoxique de la roténone.....	39
3.2	L'acide valproïque protège contre les changements induits par la roténone au niveau des protéines apoptotiques	40
3.3	L'action protectrice de l'acide valproïque contre l'activation de la caspase 3 par la roténone est dépendante de la PIMT	42
3.4	La surexpression de la PIMT inhibe l'activité de la caspase 3 et 9 induite par la roténone	43
CHAPITRE IV		
DISCUSSION		55
CONCLUSION.....		63
BIBLIOGRAPHIE		64

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Voie de dégradation, de réparation et de remplacement de protéines vieillissantes.....	2
1.2 Formation des résidus isoaspartyls provenant des acides aminés asparagines ou aspartates des protéines (Modifiée de Reissner et Aswad, 2003)	6
1.3 Conformation des quatre résidus aspartyls différents reconnus ou non par la PIMT (Adaptée de Clarke, 2003).....	12
1.4 Mécanisme de réparation des protéines par la PIMT (Tirée d'Angelo et al. 2013)	13
1.5 Comparaison des structures cristallines de la PIMT humaine (a) avec celle de <i>T. maritima</i> et <i>P. furiosus</i> (b) (Ryttersgard et al. 2002)	16
1.6 Voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque (Paoli et al. 2013).....	27
1.7 Schéma général de l'apoptose (adapté de Pallapati et Averil Bates, 2011) ...	29
3.1 Un pré-traitement des cellules avec VPA les protège contre l'action cytotoxique de la roténone.	47
3.2 VPA protège contre les changements induits par la roténone au niveau des protéines apoptotiques.	49
3.3 L'action protectrice du VPA contre l'activation de la caspase 3 par la roténone est dépendante de la PIMT.....	51
3.4 La surexpression de la PIMT inhibe l'activité de la caspase 3 et de la caspase 9 induite par la roténone.	53

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AdoHcy	S-adénosyl-L-homocystéine
AdoMet	S-adénosyl-L-méthionine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	<i>Apoptosis induction factor</i>
APP	Amyloid precursor protein
APS	Persulfate d'ammonium
ARE	<i>Antioxydant response element</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Acide ribonucléique interférent
BSA	Albumine sérique bovine
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CRE	<i>Cyclic AMP response element</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DED	<i>Death effector domain</i>
DISC	Complexe de signalisation d'induction de la mort
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ERE	<i>Estrogen response element</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>

FADD	Protéine adaptatrice associée au domaine de la mort
FBS	Sérum bovin fœtal
FHP	Filaments hélicaux pairés
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GSK-3	Glycogene synthase kinase-3
Hsp	Protéine de choc thermique
MAP 1B	<i>Microtubule-associated protein 1B</i>
MOM	<i>Mitochondrial outer membrane</i>
PBS	Solution saline phosphate tamponnée
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIMT	Protéine-L-isoaspartyl-méthyltransférase
PNF	Plaques neurofibrillaires
PVDF	Fluorure de polyvinylidène
RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RSK-1	90 kDa Ribosomal S6 kinase-1
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate-gel électrophorèse polyacrylamide
TBS	Tampon Tris salin
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TM	Trans-membranaire
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VPA	Acide valproïque

XRE *Xenobiotic response element*

RÉSUMÉ

Les protéines sont continuellement affectées par certains facteurs internes et externes. Certains parmi ceux-ci peuvent les endommager et influencer les voies de signalisation. Cela entraîne bien souvent de nombreux dommages biochimiques et des maladies. La Protéine L-Isoaspartyl Méthyltransférase (PIMT) convertit les résidus L-isoaspartyls atypiques en L-aspartyls empêchant ainsi l'accumulation de protéines anormales dans la cellule. Il a été démontré dans notre laboratoire que l'expression de la PIMT était induite par l'acide valproïque, un médicament antiépileptique, via la voie de signalisation glycogène-synthase-kinase-3 (GSK-3)/ β caténine. De plus, la PIMT est aussi connue pour avoir des propriétés antiapoptotiques. En effet, elle protégerait contre l'apoptose induite par les lipoprotéines sanguines glycosylées ou gly-LDL et contre celle induite par un stress oxydatif dans les cellules épithéliales. Dans cette étude, nous nous proposons d'étudier les propriétés antiapoptotiques de la PIMT induite par l'acide valproïque contre l'apoptose causée par la roténone. Les résultats ont montré dans un premier temps qu'un prétraitement des cellules de neuroblastomes humains SH-SY5Y avec l'acide valproïque protégeait contre la diminution du niveau de la PIMT par la roténone, et que ce prétraitement protégeait contre la mort cellulaire induite par ce produit toxique. Aussi, la PIMT exprimée après un prétraitement de 24 h avec l'acide valproïque protégeait contre les changements induits par la roténone au niveau des protéines apoptotiques notamment Bcl-x1 (antiapoptotique), la caspase 3 et p53 (proapoptotiques). L'inhibition de la PIMT par un ARNi dirigé contre celle-ci montre une augmentation de l'activité de la caspase 3, caspase effectrice de l'apoptose, suggérant que la PIMT est bien nécessaire pour la protection contre cette dernière. Ce résultat est confirmé en montrant que des cellules qui surexpriment le gène de la PIMT active sont protégées en partie contre l'activation des caspases 3 et 9. Cette activation est plus élevée dans les cellules qui expriment soit une forme mutée de la PIMT dans son site actif (D83V), la rendant inactive, soit qui ont été transfectées avec un plasmide pCMV6 vide sans le gène effectif de la PIMT. Ces dernières sont donc plus exposées à la mort cellulaire par apoptose. Ainsi nos résultats démontrent que la PIMT a bien des propriétés antiapoptotiques contre la mort cellulaire induite par la roténone.

Mots clés: Protéines endommagées, L-isoaspartyl méthyltransférase, acide valproïque, neuroprotection, apoptose, roténone, cellules SH-SY5Y

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les enzymes de réparation

Les protéines jouent un rôle très important dans l'organisation et le bon fonctionnement physiologique. De ce fait, il est essentiel de maintenir leur intégrité, étant donné les nombreuses modifications dommageables que celles-ci peuvent subir. Parmi celles-ci, on peut citer l'oxydation, la glycation, etc..(Gomord et Faye 2004). Dans le but de réparer les protéines, les cellules expriment en leur sein des enzymes capables de remédier aux différents dommages. En effet, il existe trois types d'enzymes de réparation à savoir les prolines isomérases qui transforment les résidus cis-proline en résidus trans-proline, les enzymes impliquées dans la conversion des résidus méthionines sulfoxydes oxydés en résidus normaux, et la protéine isoaspartyl méthyltransférase qui transforme de manière spécifique les résidus L-isoaspartyls anormaux (Clark, 2003, Desrosiers et Fanelus, 2011). Le schéma ci-dessous (Figure 1.1) présente les différentes modifications, on remarque que les protéines natives peuvent être altérées de manière covalente par de nombreuses voies (flèches bleues). Dans certains cas, les enzymes peuvent directement réparer certains dommages (flèches rouges), dans d'autres, les protéines altérées peuvent être dégradées de manière protéolytique en acides aminés libres (flèche verte). Cette dernière méthode conduit à la régénération de nouvelles protéines par la voie de biosynthèse ribosomique (Clark, 2003, Desrosiers et Fanelus, 2011).

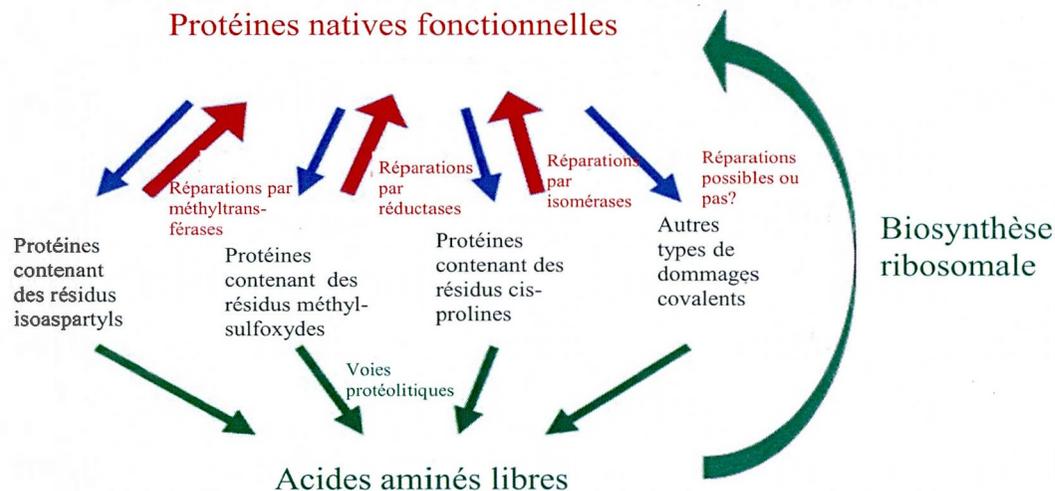


Figure 1.1 Voie de dégradation, de réparation et de remplacement de protéines vieillissantes

1.2 Les méthyltransférases

La méthylation est une modification post-traductionnelle qui est catalysée par des méthyltransférases dépendantes de la S-adenosyl-L-méthionine (AdoMet), un donneur de groupement méthyle. Les méthyltransférases protéiques se divisent en deux groupes, soient les protéines N-méthyltransférases et les protéines carboxyl méthyltransférases.

Dans le cas des protéines N-méthyltransférases, elles méthylent les groupements amines des acides aminés arginine et lysine (Pail et Kim, 1990). Les N-méthyltransférases modifient par exemple les histones, les protéines ribonucléaires et les protéines basiques de la myéline (Boulanger et al. 2004). La méthylation par ces enzymes joue un rôle dans certaines fonctions comme la régulation de la

transcription, la signalisation cellulaire, la localisation cellulaire de certaines protéines etc. (Boisvert et al. 2003)

Les carboxyl méthyltransférases quant à elles, catalysent des réactions de méthylation sur les groupements carboxyles libres des acides aminés. Ces enzymes sont classées selon quatre groupes en fonction de la nature du résidu qu'elles modifient. Parmi ces groupes, nous avons d'abord les L-glutamyl-méthyltransférases chez les bactéries, qui jouent un rôle au niveau de la méthylation des résidus glutamates des protéines chémoréceptrices (Stock, 1990). Ensuite on retrouve les L-isoaspartyl méthyltransférases qui méthylent les résidus L-isoaspartyls anormaux des protéines (Galleti et al. 1995). On peut également citer les isoprényl-L-cystéines-méthyltransférases que l'on retrouve seulement au niveau de la membrane cellulaire. Celles-ci méthylent les résidus cystéines isoprénylés en position C-terminale des protéines (Gingras et al. 1994). Pour finir, les protéines leucine-méthyltransférases qui catalysent la méthylation du groupement α -carboxyl des résidus leucine en position C-terminal des protéines cytosoliques (Xie et Clarke, 1994). Les résultats présentés dans ce mémoire mettront l'accent sur la classe des L-isoaspartyl méthyltransférases.

1.3 La protéine L-isoaspartyl méthyltransférase (PIMT)

1.3.1 Historique de la PIMT

En 1965, deux scientifiques du nom d'Axelrod et Daley ont remarqué que l'ajout du (^3H)-S-adénosyl-L-méthionine ou (^3H)AdoMet à des extraits hypophysaires entraînait une production de méthanol radioactif (Axelrod et Daley 1965). Ils remarquèrent alors une réaction de méthylation *in vivo*, mais n'identifièrent aucune enzyme. Deux ans plus tard, une autre équipe rapporta la méthylation de l'ovalbumine et de l'albumine humaine dépendante de l'AdoMet par une enzyme purifiée de rat (Liss et Edelstein, 1967, Liss et Maxam, 1967). En 1970, une troisième équipe publia la purification à partir du thymus de rats d'une enzyme de méthylation utilisant

l'AdoMet qui fut nommée protéine méthylase II (Kim et Paik, 1970). Le scientifique Kim a aussi démontré que la protéine méthylase II était présente dans l'hypophyse et qu'une fois purifiée, celle-ci correspondait à l'enzyme qui génère du méthanol. Cette méthylase était capable de modifier une grande variété de protéines tout en gardant son activité de production de méthanol. Par la suite une activité carboxyl méthyltransférase hypophysaire de l'enzyme fut confirmée et il fut démontré que certaines hormones hypophysaires étaient des accepteurs de groupements méthyles beaucoup plus efficaces que l'ovalbumine (Diliberto et Axelrod, 1974). Plusieurs années plus tard une conclusion fut émise stipulant que l'enzyme rapportée par l'équipe de Lis-Kim et Paik était la même que celle d'Axelrod et Daley (Aswad, 1995).

Une soixantaine d'articles furent alors publiés portant sur les carboxyl méthyltransférases chez les eucaryotes. Ceux-ci portaient principalement sur les propriétés et les fonctions de ces enzymes. Certaines de ces publications portaient sur les fonctions possibles de la protéine dans le relargage du contenu des vésicules, l'entreposage des hormones, la régulation de l'activité de la calmoduline et dans la chimiotaxie des leucocytes (Clarke, 1985, Barten et O'Dea, 1990).

En 1984, l'équipe de Aswad réussit à démontrer que le groupement carboxyl libre sur le résidu L-isoaspartyl de l'hormone adrénocorticotrope était un excellent site de méthylation pour l'enzyme (Aswad, 1984). Dans la même période, une étude menée par l'équipe de Clarke montra qu'un intermédiaire imide cyclique se formait lors de la réaction et que l'hydrolyse de ce dernier conduisait à la formation d'un mélange de lien α -aspartyls et β -aspartyls. Cette enzyme fût alors nommée protéine L-isoaspartyl méthyltransférase (PIMT). Ils démontrèrent alors que l'enzyme méthylait sélectivement les résidus L-isoaspartyls de l'adrénocorticotropine désamidée (Murray et Clarke, 1984). En tenant compte de la configuration optique (L ou D) de ces groupements, quatre structures furent observées soient L- α , L- β , D- α , et

D-β. Ces quatre variantes furent soumises à la méthylation par la PIMT et seule la variante L-isoaspartyl (L-β) fut un substrat efficace pour l'enzyme. Cette découverte permit d'expliquer l'instabilité et la faible stœchiométrie de la réaction de méthylation par la PIMT. À la suite de ces publications, l'hypothèse de la possible responsabilité de la PIMT dans la réparation des résidus aspartyls endommagés fut de plus en plus évidente.

1.3.2 Formation des résidus aspartyls anormaux

De nombreuses modifications post-traductionnelles des protéines peuvent intervenir durant la vie des organismes vivants. Ces modifications entraînent généralement des changements de conformation, modifiant ainsi la structure et donc le plus souvent la fonction de la protéine (Robinson et Robinson, 2004). La désamidation des acides aspartiques est un exemple qui illustre bien les modifications qui peuvent affecter les protéines. Cette réaction mène à la formation et à l'accumulation de résidus aspartyls anormaux. La désamidation des résidus asparagines survient lors d'une attaque nucléophile de l'atome d'azote de l'acide aminé adjacent en position C-terminal et génère un intermédiaire cyclique instable, le L-succinimide (Figure 1.2).

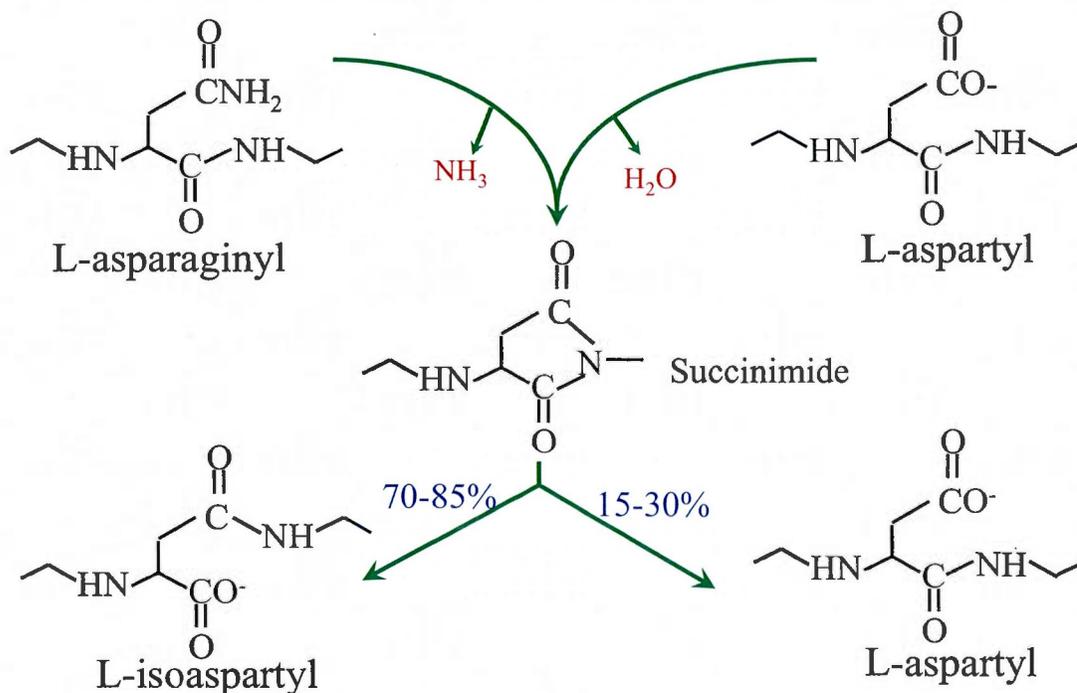


Figure 1.2 Formation des résidus isoaspartyls provenant des acides aminés asparagines ou aspartates des protéines (Modifiée de Reissner et Aswad, 2003)

Comme le montre la Figure 1.2, un intermédiaire imide cyclique nommé succinimide est formé. Cet intermédiaire très instable, subit une hydrolyse spontanée et produit un mélange de 70 à 85% de résidus L-isoaspartyls anormaux, et de 15 à 30% de résidus L-aspartyls normaux. Dans les résidus anormaux, le lien peptidique est formé par le groupement carboxyle de la chaîne latérale de l'acide aminé au lieu du groupement α -carboxyle (Reissner et Aswad, 2003). Le pourcentage élevé de résidus L-isoaspartyls formés s'explique par la forme asymétrique de l'intermédiaire succinimide. En parallèle de cette réaction, une racémisation de l'intermédiaire succinimide entraîne la formation de faibles quantités de résidus D-aspartyls et D-isoaspartyls mais à des proportions négligeables.

Les résidus aspartates ou asparagines d'une protéine ne sont pas tous susceptibles d'être modifiés et de former des résidus isoaspartyls. En effet, il a été

démontré que la structure primaire de la protéine jouait un rôle important dans le processus de désamidation. Les résidus L-isoaspartyls sont donc formés dans des séquences où l'acide aminé qui suit immédiatement (N+1) est petit, hydrophile et ne possède pas de chaîne latérale encombrante (Johnson et Aswad, 1995). La présence d'une glycine en position N+1 conduit à la formation de résidus L-isoaspartyls 70 à 100 fois plus rapidement que des acides aminés possédant une chaîne latérale hydrophobe et ramifiée (Brennan et Clarke, 1995). Cela montre donc que la taille de la chaîne latérale de l'acide aminé en position N+1 joue un rôle dans la vitesse de formation de l'intermédiaire instable.

Les acides aminés qui joueraient de façon favorable sur la formation de résidus isoaspartyls sont la glycine, la sérine et l'histidine. Ceux-ci accélèrent la déprotonation de l'azote du lien peptidique et favorisent ainsi l'attaque nucléophile de la chaîne latérale de l'aspartate ou de l'asparagine pour former l'intermédiaire succinimide (Reissner et Aswad, 2003). Un autre facteur qui influence la formation de résidus isoaspartyls est la structure secondaire ou tertiaire de la protéine. On remarque une formation de résidus isoaspartyls anormaux plus souvent dans les régions très flexibles de la protéine, ce qui permet une cyclisation plus facile, et donc une formation de l'intermédiaire succinimide plus rapide (Chazin et Kossiakoff, 1995). Des facteurs tels que la température, le pH peuvent influencer la formation d'isoaspartyls dans les protéines (Brennan et Clarke, 1995). Il a été rapporté que des températures élevées entraînaient la dénaturation de la chaîne polypeptidique. Cette dénaturation conduirait à une augmentation de l'accessibilité de la chaîne qui serait plus enclin à recevoir une attaque nucléophile. Ce phénomène est également observé à des pH basiques, entraînant une hausse de la déprotonation de l'azote du lien peptidique, et accélérant ainsi la formation de résidus isoaspartyls. D'autres facteurs comme les stress liés aux chocs thermiques, le contact avec des agents inducteurs de stress oxydatif (H_2O_2 , t-butyl hydroperoxyde), ou encore le stress hypotonique

favoriseraient la formation de résidus isoaspartyls anormaux (Ladino et O'Connor, 1992, Ingrosso et al. 2000, Ingrosso et al. 1995).

1.3.3 Caractéristiques et expression tissulaire de la PIMT

La PIMT est une enzyme ubiquitaire d'environ 24500 daltons qui a été identifiée chez les bactéries, les plantes, les champignons et les mammifères (Barten et O'Dea, 1990). Chez les mammifères, elle est exprimée dans tous les tissus mais c'est dans le cerveau que son expression est la plus élevée, suivi des testicules et du cœur (Diliberto et Axelrod, 1976, Boivin, Bilodeau et Béliveau, 1995). En effet, des recherches ont montré dès 1976 que le cerveau était le tissu exprimant la plus forte activité catalytique de la PIMT (Diliberto et Axelrod, 1976). De plus, une analyse de type Northern blot a montré que l'ARNm de la PIMT de rats âgés de 150 jours était majoritairement exprimé dans le cerveau et les testicules par rapport aux tissus tels que les muscles (incluant le cœur), et les poumons (Mizobuchi et al. 1994). Ces résultats ont également été confirmés par la suite, au niveau protéique (Boivin et al. 1995).

Les résultats d'analyses immunohistochimiques du cerveau de rats âgés de 8 semaines ont démontré que la PIMT était fortement exprimée dans les neurones tandis que les cellules gliales en avaient un niveau plus faible (Shirasawa et al. 1995). D'autre part, une analyse protéomique a révélé que la PIMT, entre autres, était exprimée dans le cerveau fœtal humain (Fountoulakis et al. 2002). Les auteurs de cette étude avancèrent que l'identification des protéines du cerveau qui sont exprimées au premier stade de la vie permettrait de mieux comprendre les mécanismes associés au développement de maladies neurologiques. De plus, une étude a montré que chez les souris déficientes en PIMT, celles-ci montraient un niveau plus élevé de résidus L-isoaspartyls dans le cerveau, les testicules et le cœur (Lowenson et al. 2001).

La PIMT est classée parmi les protéines impliquées dans la réponse au stress, et représenterait le deuxième plus important groupe de protéines de la substance blanche du cerveau (Mucelli et al. 2006). Un fractionnement biochimique de plusieurs organes a permis d'observer que la PIMT était exprimée particulièrement dans le cytosol (Diliberto et Axelrod, 1976). De plus, elle ne contient pas de séquence signal, une caractéristique propre aux protéines membranaires et aux protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire (Halic et al. 2006). La majorité des études portant sur la PIMT la caractérise ainsi comme une enzyme cytosolique (Desrosiers et Fanéus, 2011).

Malgré le fait que la PIMT soit caractérisée comme enzyme cytosolique, quelques études ont démontré l'existence d'une forme membranaire dans le cerveau, le rein, les testicules et les érythrocytes (Saido et al, 1987, Sellinger et Kramer, 1988, Boivin et al. 1993). La membrane plasmique fait partie d'un réseau membranaire qui comprend le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les lysosomes, les peroxysomes, la membrane nucléaire et les membranes mitochondriales. Des études ont rapporté la purification et la caractérisation de la PIMT au niveau des membranes du cortex rénal de rats (Gingras et al. 1991, Gingras et al. 1994). Selon une autre publication, la structure et les propriétés catalytiques de cette forme membranaire de la PIMT ne diffèrent pas significativement de la forme soluble cytosolique (Boivin et al. 1993). Ainsi, ces données suggèrent que la PIMT serait plutôt liée aux membranes par l'interaction avec une ou plusieurs protéines. Une autre analyse a montré que la PIMT interagit avec le «microtubule-associated protein 1B» (MAP1 B), une protéine du cytosquelette qui contribue au développement cérébral (Cueille et al. 2007; Riederer, 2007). Ces observations pourraient expliquer les changements dans l'organisation du cytosquelette des souris qui n'expriment pas la PIMT (Yamamoto et al. 1998). De plus, il a été démontré que dans le cerveau d'embryons de rats, l'expression de la PIMT augmentait linéairement lors de la maturation de cet organe et que son activité catalytique était plus élevée dans les fractions mitochondriales du

cerveau des rats (Boivin et al. 1995). Chez l'humain, une analyse protéomique a montré que la PIMT était exprimée dans les mitochondries purifiées de tissus cardiaques (Taylor et al. 2003). De plus, lors d'un stress oxydatif la PIMT forme des multimères dans les mitochondries des cellules de neuroblastomes en culture (Fanelus et Desrosiers, 2013).

Une autre publication par immunohistochimie affirme que la PIMT était fortement présente au niveau des neurones (Shirasawa et al. 1995). Deux isoformes majeurs furent alors identifiés et caractérisés dans de nombreux tissus de mammifères notamment le cerveau de bœuf (Aswad et Deight, 1983) et les érythrocytes humains. Chez l'humain, il existe deux isoformes de la PIMT, soient le type I et le type II. Ceux-ci se retrouvent également dans des tissus d'autres espèces comme le rat ou encore le cheval (Ota, Gilbert et Clarke, 1988). L'isoforme I possède 226 acides aminés ainsi qu'une séquence -arginine-tryptophane-lysine- en région C-terminale, tandis que l'isoforme II possède 227 acides aminés et se termine par la séquence -arginine-aspartate-glutamate-leucine (MacLaren, Kagan et Clarke, 1992). Des chercheurs ont prouvé que l'isoforme II par la ressemblance de sa séquence RDEL avec celle du signal de rétention dans le réticulum KDEL, pouvait jouer un rôle réparateur dans celui-ci (Potter et al. 1992). Selon le tissu, on retrouve l'isoforme I ou II dans un ratio 2:1 et 3:2 respectivement dans la plupart des tissus de mammifères (Aswad, 1995). Un troisième isoforme a été découvert, comprenant 224 acides aminés, et se terminant par une séquence -sérine-arginine. Mais, étant donné sa faible abondance peu d'informations concernant celui-ci existe. Le point isoélectrique de ce dernier se situerait à mi-chemin entre les deux isoformes précédentes (MacLaren, Kagan et Clarke, 1992).

Chez l'humain, le gène qui code pour la PIMT se trouve dans la région q24-25 du chromosome 6, et est composé de 8 exons séparés de 7 introns. Il occupe 60 kb et sa séquence dans la région 5' non transcrite révèle la présence de certains éléments

potentiels de réponses incluant les motifs XRE (xenobiotic response element), CRE (cyclic AMP response element), ARE (antioxydant response element), et ERE (estrogen response element) (DeVry, Tsai et Clarke, 1996). Le gène de la PIMT contient des variations alléliques qui suggèrent la présence de plusieurs sites polymorphiques, prouvant ainsi la diversité de celui-ci (Ingrosso et al. 1989; MacLaren, Kagan et Clarke, 1992). Ce polymorphisme se trouve à la surface d'une poche hydrophobe située à l'opposé du site actif sur l'acide aminé 119 (Clarke, 2003). Ce dernier peut subir une substitution de base en troisième position résultant en un résidu isoleucine (Ile) ou valine (Val) (Tsai et Clarke, 1994). Des études ont montré une activité spécifique plus élevée et une meilleure thermostabilité pour la forme Ile-119 alors que la forme Val-119 possède une meilleure affinité pour les protéines endommagées (David et al. 1997, DeVry et Clarke, 1999).

1.3.4 Réparation des résidus L-isoaspartyls par la PIMT

La PIMT, grâce à ses propriétés de méthylation des résidus L-isoaspartyls, joue un rôle très important dans la réparation des protéines endommagées porteuses de résidus aspartyls anormaux dans la cellule. En effet, ce n'est pas la formation de résidus L-isoaspartyls qui est dommageable en tant que tel, mais leur accumulation durant le vieillissement des protéines. En effet, cette accumulation a des conséquences néfastes sur la structure et la fonction biologique de celles-ci. Ce phénomène est observé dans certaines maladies comme celle d'Alzheimer (Clarke, 2003). La PIMT a la capacité de reconnaître et de réparer les résidus L-isoaspartyls et à un moindre degré les résidus D-aspartyls. En effet, la PIMT possède une forte affinité pour les résidus L-isoaspartyls car elle reconnaît ceux-ci avec une affinité de 700 à 10 000 fois plus élevée que pour les résidus D-aspartyls (Lowenson et Clarke, 1992). L'efficacité de méthylation des résidus D-aspartyls est alors très faible et presque négligeable par rapport à celle des L-isoaspartyls. De plus, il est important de noter que les résidus L-aspartyls et D-isoaspartyls ne font pas partie des substrats de la PIMT (Figure 1.3). Cette spécificité de réparation de la PIMT est due à l'orientation

protéines endommagées. L'activité de la PIMT est donc essentielle dans le maintien d'un très faible niveau de protéines anormales dans les cellules.

La réparation des résidus L-isoaspartyls *in vitro* a été démontrée en utilisant de nombreux peptides synthétiques contenant des isoaspartyls ainsi que plusieurs protéines vieilles. Ces travaux ont mis en évidence la capacité de la PIMT à rétablir l'activité d'une protéine endommagée par la présence de résidus isoaspartyls, comme dans le cas de la calmoduline. En effet, la calmoduline perd 82% de sa capacité à activer un de ses effecteurs, la protéine kinase dépendante du calcium (Johnson, Freitag et Aswad, 1985). Toutefois, lorsqu'incubée avec la PIMT et l'AdoMet pendant 72 heures, la calmoduline retrouve 68% de sa capacité à activer la protéine kinase effectrice (Johnson, Langmack et Aswad, 1987).

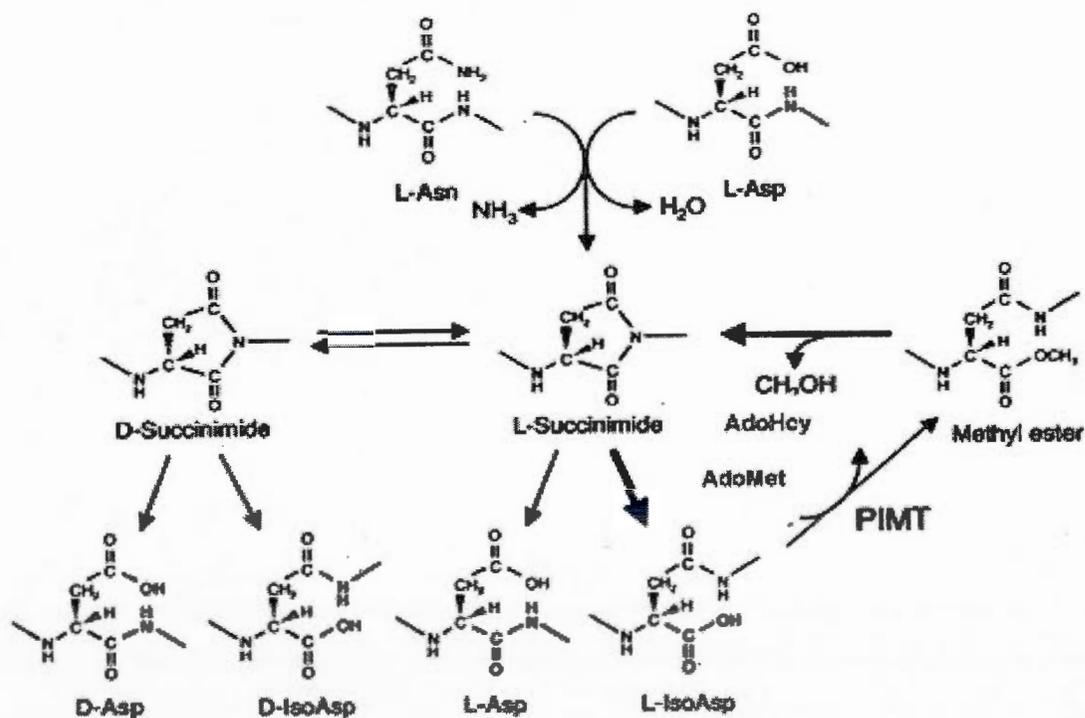


Figure 1.4 Mécanisme de réparation des protéines par la PIMT (Tirée d'Angelo et al. 2013)

Ce n'est que dans les années 2000 que la détermination de la structure cristalline de la PIMT a été possible chez des bactéries thermophiles (Skinner et al. 2000), chez la drosophile (Bennett et al. 2003) et enfin chez l'humain (Ryttersgaard et al. 2002, Smith et al. 2002). Ces études ont permis d'obtenir plus de renseignements concernant le fonctionnement de la PIMT et en particulier concernant son site de liaison. Il a été montré que ce dernier était enfoui profondément à l'intérieur de la protéine, suggérant une étape limitante de la réaction enzymatique. L'AdoHcy étant complètement enfermé dans la PIMT humaine, un changement de conformation doit impérativement se produire pour permettre l'échange avec l'AdoMet. De ce fait, un mécanisme enzymatique séquentiel est pris en charge parce que les résidus C-terminaux impliqués dans la liaison à l'AdoHcy forment également le site de liaison avec le peptide isoaspartyl. Un changement de conformation permet donc à l'AdoHcy de s'échapper et empêche ainsi la liaison aux peptides (Smith et al. 2002).

La structure cristalline de l'enzyme humaine contenant un lien au cofacteur AdoHcy est rapportée à une résolution de 2,1 Å (Figure 1.5). Une comparaison de l'enzyme humaine avec ces homologues de deux autres espèces révèle des structures similaires, mais également des différences significatives. Dans les trois structures, on remarque trois résidus chargés conservés enfouis à l'intérieur de la protéine à proximité du site actif. Des calculs électrostatiques suggèrent que ces charges pourraient apporter des contributions significatives au potentiel énergétique de la liaison du cofacteur chargé AdoMet. Une vue globale du repliement de PIMT humaine peut être observée dans la Figure 1.5 a présentée ci-dessous. Le cofacteur AdoHcy est représenté en modèle de bâton. Le point b de la figure illustre une comparaison structurelle de la PIMT humaine avec les structures de *T. maritima* et *P. furiosus* découvertes antérieurement (Skinner et al. 2000). La structure humaine est représentée en orange, la structure de *P. furiosus* en bleue, et celle de *T. maritima* en vert. Dans un souci de clarté, le domaine N-terminal dans la structure de *T. maritima*

n'a pas été représenté. Le cofacteur de AdoHcy et les résidus Val-Leu-119 et 130 de la PIMT humaine sont présentés dans les modèles de bâton (Ryttersgard et al. 2002).

D'autres travaux ont également permis de déterminer la présence de deux acides aminés chargés négativement à l'intérieur de la PIMT dans le site de liaison avec l'AdoMet, qui sont conservés d'une espèce à l'autre. Chez l'humain, ces résidus sont Asp-83 et Asp-109 et sont essentiels pour la liaison de l'AdoMet. Ainsi, la chaîne latérale du groupement carboxyle du résidu Asp-83 interagit avec le groupement amine du carbone- α de l'AdoMet, alors que la chaîne latérale du résidu Asp-109 forme des ponts hydrogènes avec les groupements hydroxyles du ribose (Kindrachuk et al. 2003). La PIMT de mammifère a un K_m pour les peptides possédant un résidu L-isoaspartyls d'environ 0,5 à 10 μM et son V_{max} est de 15 à 30 nmol/min/mg à 37°C (Johnson et Aswad, 1995). Une à trois minutes sont donc nécessaires pour que chaque molécule de PIMT catalyse le transfert d'un groupement méthyle (Aswad, 1995).

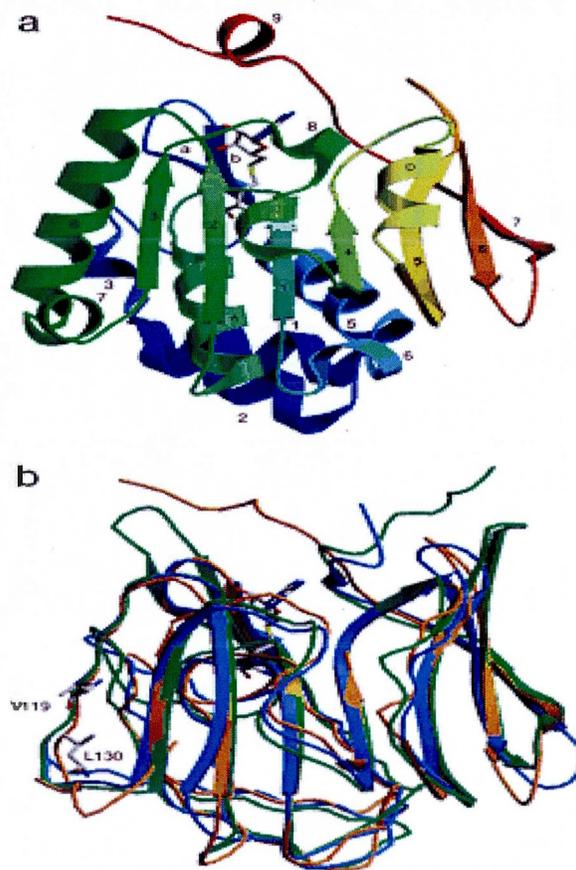


Figure 1.5 Comparaison des structures cristallines de la PIMT humaine (a) avec celle de *T. maritima* et *P. furiosus* (b) (Ryttersgard et al. 2002)

1.3.5 Rôles biologiques de la PIMT

Le cerveau est le tissu dans lequel la PIMT est majoritairement exprimée et, c'est dans ce dernier que l'on détecte sa plus forte activité catalytique. En se basant alors sur ce point et sur le fait que la formation des résidus isoaspartyls serait essentiellement limitée par l'activité de la PIMT, on pourrait se demander si une déficience en PIMT aurait des conséquences dommageables sur les fonctions cérébrales. En effet, des études d'immunohistochimie ont montré que la PIMT était plus fortement exprimée dans les neurones des régions affectées du cerveau et que

cette dernière était principalement localisée au niveau des plaques neurofibrillaires (PNF) (Shimizu et al. 2000). Un des rôles physiologiques de la PIMT a récemment été découvert grâce à des souris déficientes en PIMT (PIMT^{-/-}). Les données ont en effet démontré que ces souris présentaient une forte accumulation de résidus isoaspartyls dans le cerveau, de même que dans les fractions cytosoliques des érythrocytes, du foie et du cœur. En fait, dans le cerveau, les résidus isoaspartyls étaient présents à un niveau neuf fois plus élevé dans les souris (PIMT^{-/-}) que dans les fractions de souris normales (Kim et al. 1997, Yamamoto et al. 1998).

Ensuite, des études comme celle de Yamamoto et al. en 1998 ont démontré un lien entre la PIMT et l'épilepsie. Suite à l'accumulation de résidus anormaux, il a été démontré que les souris PIMT^{-/-} présentaient un énorme retard de croissance et mourraient des suites de convulsions épileptiques fatales entre 22 et 60 jours après la naissance (Kim et al. 1997, 1999, Yamamoto, Takagi et Kitamura, 1998). De plus, Yamamoto et son équipe ont observé que les neurones pyramidaux du cortex cérébral des souris PIMT^{-/-} possédaient des dendrites déformées ainsi que des microtubules désorganisés par rapport à ceux des souris normales (Yamamoto et al. 1998). Ces études appuyèrent le fait que la réparation des protéines ayant des résidus L-isoaspartyls par la PIMT dans le cerveau était essentielle non seulement pour le bon fonctionnement du système nerveux central, mais aussi pour la croissance normale des souris.

Une autre équipe a ensuite affirmé que les souris PIMT^{-/-} présentaient une neurotransmission aberrante dans les synapses de la région CA3 de l'hippocampe par rapport à celle des souris normales. Cette même équipe a aussi montré par microscopie électronique une distribution anormale des vésicules synaptiques et une dégénérescence des vacuoles des axones neuronales de la région CA3 de l'hippocampe des souris PIMT^{-/-} (Ikegaya et al. 2001). Cette publication démontre que cette région du cerveau est particulièrement vulnérable à la présence de résidus

isoaspartyls et confirme encore une fois l'importance du système de réparation dépendante de la PIMT pour son bon fonctionnement. Dans la même portée, un autre écrit a rapporté que chez les souris PIMT^{-/-}, des niveaux plus élevés d'AdoMet et plus faibles d'AdoHcy étaient mesurés dans le cerveau (hippocampe) (Farrar et Clarke, 2002). Un ratio AdoMet/AdoHcy anormal dans le cerveau pourrait être impliqué dans l'altération de l'état d'excitation neuronale et jouer un rôle dans le développement de l'épilepsie chez les souris PIMT^{-/-}. Pour finir, des études dans notre laboratoire ont prouvé que l'expression réduite de la PIMT dans les hippocampes d'humains atteints d'épilepsie était associée à l'accumulation de résidus L-isoaspartyls dans différentes protéines, notamment la tubuline (Lanthier et al. 2002).

Afin de montrer encore plus l'importance de la PIMT au niveau biologique, des équipes ont produit des souris transgéniques qui possédaient le gène de la PIMT sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux neurones. Ils ont ainsi montré qu'en exprimant la PIMT, les souris PIMT^{-/-} étaient protégées contre les crises d'épilepsie (Shimizu et al. 2002), et que celles-ci pouvaient vivre jusqu'à cinq fois plus longtemps que des souris non traitées (Lowenson et al. 2001). Ces découvertes ont poussé la recherche sur cette voie entraînant ainsi d'autres séries de publications impliquant des souris transgéniques. Ainsi, ils ont développé des souris mutées déficientes en PIMT, mais exprimant de manière distincte des gènes qui codent spécifiquement pour les isoformes I et II de la PIMT. Ces derniers sont contrôlés par le promoteur de la protéine prion et permettent une expression ubiquitaire dans tous les types cellulaires du système nerveux des souris (Shimizu et al. 2002). Ces études ont révélé que la présence de l'un ou de l'autre des isoformes empêchait les convulsions épileptiques de manière drastique, évitait le retard de croissance des souris PIMT^{-/-} et réparait les résidus isoaspartyls accumulés dans le cerveau (Shimizu et al. 2002). Cela a donc prouvé que les deux isoformes possédaient les mêmes propriétés biologiques et substrats intracellulaires. Ces découvertes convergiaient

toutes sur l'importance au niveau physiologique de la réparation des protéines endommagées par la PIMT afin de prévenir l'accumulation des résidus L-isoaspartyls.

Une accumulation importante de résidus aspartyls anormaux dans les protéines peut perturber leur structure et donc leur fonction biologique. Cette accumulation conduit bien souvent à des pathologies graves telles la maladie d'Alzheimer. Celle-ci est un désordre neurodégénératif caractérisé par une accumulation extracellulaire de plaques séniles dans les régions corticales du cerveau et dans la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux (Mann, 1985). Ces plaques sont composées en majorité du peptide β -amyloïde provenant de la protéolyse de la protéine APP (amyloid precursor protein). Lorsque cette protéine est clivée, le peptide amyloïde-bêta subit plusieurs modifications post-traductionnelles incluant la formation de résidus isoaspartyls (Shimizu et al. 2000). Une étude a démontré que les résidus aspartyls, aux positions 1 et 7 des peptides β -amyloïdes, étaient transformés en L-isoaspartyls, D-isoaspartyls et D-aspartyls, dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Roher et al. 1993). L'équipe de Shimizu a ensuite confirmé cette hypothèse en montrant une augmentation de la formation de résidus L-isoaspartyls dans les peptides β -amyloïdes, impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Ils se sont intéressés à l'isomérisation des résidus en position 7 et 23 et ont remarqué que les résidus isomérisés en position 23 entraînaient une plus forte agrégation des peptides dans les plaques séniles.

La maladie d'Alzheimer est également caractérisée par la formation de PNF dans les neurones du cortex cérébral (Mann, 1985). Ces PNF sont des structures insolubles, retrouvées précisément dans le cytosol des neurones atteints, et elles sont composées de filaments hélicaux pairés (FHP). Ces FHP sont principalement constitués des protéines tau et ubiquitine. Certaines publications ont montré par spectrométrie de masse que la protéine tau isolée de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer possédait des résidus L-isoaspartyls aux positions Asp-193,

Asn-381 et Asp-387 (Watanabe et al. 1999, Shimizu et al. 2000). La présence de ces résidus aspartyls anormaux dans la protéine tau causerait son oligomérisation et donc la formation de FHP insolubles. Ainsi, l'accumulation d'isoaspartyls dans la protéine tau du cerveau humain pourrait être impliquée dans la formation des PNFs et donc dans le développement de la maladie d'Alzheimer (Watanabe et al. 1999).

1.3.6 La régulation de la PIMT

Actuellement, le mécanisme d'action de la PIMT est bien connu. Effectivement, des similitudes peuvent être observées entre les fonctions de la PIMT au niveau du cerveau et les protéines impliquées dans la voie de signalisation de Wnt tels que GSK-3 et la β -caténine (Lee et al. 2000, Brault et al. 2001, Spittaels et al. 2002). En effet la voie de signalisation de Wnt est très importante dans le développement du cerveau, de plus, des souris déficientes en Wnt-3a démontraient une absence de développement de l'hippocampe (Lee et al. 2000). Aussi, la surexpression de GSK-3 β , qui est inhibée lorsque la voie de Wnt est activée, conduisait à une réduction de la taille du cerveau chez la souris (Spittaels et al. 2002). L'inactivation du gène de la β -caténine, une protéine clé dans la voie de signalisation Wnt, donnait lieu à des malformations au niveau du cerveau ainsi qu'à une absence de développement cranio-facial (Brault et al. 2001).

La β -caténine jouerait un rôle dans l'épilepsie car, des souris mutantes avec une délétion de β -caténine présentaient des malformations au niveau de la structure de l'hippocampe et étaient plus vulnérables à des convulsions induites avec le penthyltétrazole, un convulsant du système nerveux central (Campos et Li, 2004). La voie de signalisation de Wnt, par l'intermédiaire de GSK-3, est connue pour être impliquée dans la plasticité synaptique, la survie cellulaire, et les rythmes circadiens. Tous ces phénomènes jouent un rôle dans les troubles bipolaires (Gould et Manji, 2002). Des travaux dans notre laboratoire ont prouvé que la voie de GSK-3/ β -caténine régulait l'expression de la PIMT (Cournoyer et Desrosiers 2009), et que

l'expression de celle-ci, dans les cellules d'astrocytomes humains U-87 MG, était induite par deux stabilisateurs de l'humeur: le lithium, couramment utilisé pour traiter les troubles bipolaires, et l'acide valproïque, un anticonvulsant utilisé principalement pour le traitement de l'épilepsie mais également dans le but de contrôler les troubles bipolaires.

1.4 Acide valproïque

1.4.1 Historique et propriétés

L'acide valproïque (VPA) est un médicament qui possède de nombreux effets thérapeutiques. Celui-ci est largement reconnu dans le traitement de plusieurs neuropathologies et désordres psychiatriques (épilepsie et troubles bipolaires). Le chimiste Burton fut le premier à synthétiser le VPA comme solvant organique en 1882 (Burton, 1882). Ce produit est soluble dans les solvants organiques et dans l'eau (sous forme de sel de sodium), et son nom générique (acide valproïque) est dérivé du nom descriptif, l'acide 2-propylvalérique (Henry, 2003). Durant de nombreuses années, le VPA n'était utilisé que pour ses fonctions de solvant organique, et ce n'est qu'en 1962 que ses propriétés thérapeutiques furent observées par une équipe française. Il fût alors employé dans le but de solubiliser des produits afin de tester leur activité anticonvulsante potentielle (Meunier et al. 2003). En effet, certains dérivés étaient difficiles à solubiliser dans l'eau ou dans des solvants organiques communs. C'est alors que Meunier et son équipe décidèrent d'utiliser le VPA comme solvant. Ils finirent par observer une activité anticonvulsante pour tous les composés testés et pour toutes les doses. Ainsi, les premiers essais cliniques sur des patients atteints d'épilepsie utilisant le VPA sous sa forme de sel de sodium, valproate, furent effectués en France en 1964 (Lebreton et al. 1964). À partir de 1967, le VPA fut commercialisé en France, en Grande-Bretagne en 1973 et approuvé par la US Food and Drug Administration en 1978. Il fut, durant plusieurs décennies qui ont suivi, le seul anticonvulsant sur le marché.

Le VPA est aujourd'hui l'anticonvulsant le plus prescrit. Son large spectre d'activité permet, à ce jour, de traiter plusieurs types de crises d'épilepsie généralisées et partielles chez l'enfant et chez l'adulte (Perucca, 2002). Il est aussi prescrit pour traiter les personnes souffrant de troubles bipolaires.

Des publications ont démontré que le VPA augmentait le niveau cérébral d'acide γ -aminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur qui inhibe la transmission synaptique, en bloquant l'action de la succinate semialdéhyde-déhydrogénase. Cette enzyme, une fois inhibée, entraîne une augmentation du succinate semialdéhyde, qui bloque à son tour l'action de l'enzyme GABA-transaminase, et prévient ainsi le catabolisme de GABA (Johannessen, 2000). En inhibant la neurotransmission GABAergique, il peut se produire des convulsions, ce qui explique en partie pourquoi la potentialisation de l'activité GABAergique favorise l'effet anticonvulsant du VPA (Loscher, 1989). Une étude a montré que cet effet se traduit aussi par l'inhibition des canaux sodiques dépendants du voltage (Johannessen, 2000). En effet, le VPA retarde la réactivation des canaux sodiques inactifs ainsi que la conductance sodique dans des neurones d'hippocampe en culture (Van den Berg et al. 1993).

1.5 Apoptose et signalisation cellulaire

L'apoptose est un processus important qui permet le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Ce processus nécessaire au développement, à la différenciation et au vieillissement, est régulé par différentes protéines et gènes. En effet, l'apoptose permet l'élimination des cellules endommagées, en surplus ou infectées. De plus, la mort des cellules par apoptose est génétiquement programmée et permet le suicide de la cellule. Ce processus est important car il permet à l'organisme de se débarrasser des cellules infectées qui pourraient nuire au fonctionnement des cellules avoisinantes. Le dérèglement de l'apoptose conduit à des maladies neuro-dégénératives telles Alzheimer et Parkinson, à des désordres immunitaires, des alopecies.

Lors de l'apoptose, s'opèrent des changements morphologiques et biochimiques au niveau de la cellule. Le signal apoptotique mène à un arrondissement de la cellule, puis à une condensation de l'ADN suivie de la fragmentation de celui-ci. Ensuite, vient la dégradation du noyau en petites vésicules nommées corps apoptotiques qui permettront la reconnaissance et la phagocytose de la cellule par les macrophages avoisinants. L'apoptose est induite par différents signaux tels que les infections virales, les irradiations aux UVs, les chocs thermiques, la pollution environnementale, des dommages sur l'ADN, des réactifs oxygénés ROS (reactive oxygen species) produits lors d'un stress oxydatif. Une fois ce processus enclenché, interviennent alors des molécules importantes telles les caspases et les protéines de la famille Bcl-2.

Les caspases ont trois fonctions importantes dans l'apoptose qui sont l'initiation, l'exécution et l'inflammation au niveau des cellules. Elles sont constituées de domaines de liaison DED (death effector domain) et CARD (caspase recruitment domain). Les pro-caspases sont les précurseurs des caspases et permettent leur activation, leur maturation et l'acquisition de leur activité protéasique. Celles-ci sont constituées d'une extrémité N-terminale et C-terminale, d'un prodomaine (3-24 kDa), de deux sites de clivage (Asp-x), d'une large unité alpha avec des sites de résidus actifs (R, H et C), et d'une petite sous-unité beta en C-terminal. Les caspases effectrices dans le processus de l'apoptose sont les caspases 3 et 7. Celles-ci sont activées par les caspases 8 et 9. La pro-caspase 9 devient caspase 9 et agit en activant la caspase 3 qui elle-même dérive de la pro-caspase 3. Une fois la caspase 3 activée, elle clive les protéines au niveau du noyau (Lamin, PARP, ICAD) et du cytosquelette (Fodrin). Ces clivages conduisent à des changements morphologiques dans le noyau menant ainsi à la fragmentation de l'ADN et à la formation de marqueurs de phagocytose (phosphatidyl serine) sur la surface des cellules (reconnaissance par les macrophages) (Chowdhury et al. 2008).

La deuxième classe de protéines importantes est la famille des Bcl-2. Ces protéines agissent au niveau de la mort (Bax) et la survie cellulaire (Bcl-2). Bcl-2 se lie à Bax sur le site BH (site de liaison entre les protéines) et empêche la formation de complexe entre Bax et les autres molécules. Au sein de cette famille, se trouve différentes classes de protéines: des protéines antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl avec des sites BH1 à 4), des protéines proapoptotique (Bax, Bak, Bok avec des sites BH1 à 3) et des protéines proapoptotiques Bik, Bid, Bad avec seulement un domaine BH3. Toutes ces classes possèdent aussi un domaine TM (transmembranaire) important dans l'ancrage aux membranes des mitochondries et du Réticulum Endoplasmique (RE). Les protéines avec un domaine activateur BH3 sont présentes seulement en petite quantité dans le cytosol et dans la membrane mitochondriale au niveau de complexes avec Bcl-2. Ces protéines sont activées par différents stimuli apoptotiques à travers des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Elles transmettent un signal à Bax et Bak qui entraîne la liaison puis l'activation ou la neutralisation des protéines avec des domaines BH1 à BH4, et le déplacement de Bax-Bak. Les protéines avec un domaine BH3 seulement induisent aussi la réparation des membranes mitochondriales altérées à travers l'insertion des MOM (mitochondrial outer membrane) et à travers des interactions avec les lipides et autres protéines mitochondriales (Youle et Stasser, 2008).

Il existe différents mécanismes de régulation de l'apoptose:

1.5.1 La voie mitochondriale ou voie intrinsèque

Elle est contrôlée par Bcl-2 (Bax et Bak) et mène à la libération du cytochrome c de la mitochondrie initiée par un stress, entraînant ainsi la formation de l'apoptosome. D'autres protéines mitochondriales sont aussi relarguées dans le cytosol, notamment par les ROS induits par un stress oxydatif, le Ca^{2+} , les Hsps, protéines de choc thermique et les AIF ou facteurs d'induction de l'apoptose. L'apoptosome active les caspases 9 qui vont activées à leur tour les caspases 3 effectrices (Garido et al. 2006).

En effet, la voie intrinsèque commence avec l'inactivation de certains membres de la famille Bcl-2. Cela enlève l'inhibition de Bax et Bak, conduisant à l'apoptose. De plus, certaines protéines comme Bim et Puma sont capables d'activer Bax et ou Bak. Une fois activés, Bax et Bak entraînent le relargage du cytochrome *c* et la fission de la mitochondrie. Cette fission provoque ainsi l'activation de APAF1 dans l'apoptosome et de la caspase 9 suivie de la caspase 3. À leur tour, les caspases clivent certains substrats, activent les DNases et orchestrent la destruction de la cellule (Figure 1.6).

La roténone est un pesticide naturel qui agit avec une grande spécificité comme un inhibiteur de la NADH déhydrogénase des mitochondries au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire (Radad et al. 2008, Cannon et al. 2009, Drolet et al. 2009). Elle est souvent utilisée dans le but d'élucider les mécanismes sous-jacents de la neurodégénération *in vitro* et *in vivo*. La roténone altère la dynamique des microtubules causant une désorganisation du centrosome, la dépolymérisation des microtubules et l'inhibition de l'assemblage des microtubules (Srivastava and Panda, 2007). Ceci entraîne des modifications au niveau du transport intracellulaire des mitochondries dans les neurones. En effet, il a été démontré que dans les cellules SH-SY5Y (neuroblastomes), exposées à la roténone, une diminution de la vitesse du transport des mitochondries était observée (Borland, 2008). En 2012, une étude a montré l'altération dans les protéines et les niveaux d'expression de messagers d'ARN des protéines KIF1B et KIF5 liées au transport antérograde des mitochondries suite à une exposition à la roténone (Melo et al. 2012). L'exposition à la roténone causerait aussi une diminution de la mobilité des mitochondries dans l'hippocampe, dans la substance noire de rats âgés et dans des cultures cellulaires de mêmes tissus exposés à des faibles doses de roténone (Chaves et al. 2013).

1.5.2 La voie des récepteurs de la mort (Fas, TNF-RI, TRAMP...) ou voie extrinsèque

Cette voie peut contourner la voie mitochondriale et activer directement la caspase 8, entraînant l'activation de la caspase 3 et la destruction de la cellule. La liaison du ligand aux récepteurs de la mort situés sur la membrane plasmique conduit à la trimérisation et à l'activation du récepteur. Cette activation permet la formation puis l'activation d'un complexe de signalisation d'induction de la mort (DISC) et la transformation des pro-caspases 8 en caspases 8. Cela entraîne une cascade d'activation de la caspase 3 (effectrice), 6 et 7 pour aboutir au clivage. Ce clivage mènera à la fragmentation de l'ADN et du noyau, à la décomposition de la membrane et à d'autres effets qui conduisent à l'apoptose. Les récepteurs de la mort sont impliqués dans le processus de l'apoptose au niveau du domaine intracellulaire de la mort (DD). Ils sont composés entre autres des récepteurs TNF-1 (TNF-R1, connus aussi sous le nom de récepteurs de la mort 1- DR1), des récepteurs Fas (DR2, CD95 et APO-1), des DR3 (APO-3 and TRAMP), des ligands reliés à l'apoptose induite par le TNF, (TRAIL), les récepteurs TRAIL-R1 connus sous le nom de DR4, les récepteurs TRAIL-R2, aussi nommés PO-2, DR5 etc... Le système (FasL)/Fas est le plus étudié quand il s'agit d'apoptose régulée par les récepteurs de la mort. En effet, Fas est activé par la liaison du ligand FasL à un récepteur spécifique, entraînant la trimérisation de ce récepteur. Cette trimérisation est importante pour le recrutement de la protéine adaptatrice associée au domaine de la mort (FADD) et pour la formation du complexe d'induction de signal de la mort (DISC) au niveau de la membrane plasmique. S'en suit une cascade de réactions aboutissant à la mort de la cellule comme présenté dans la Figure 1.6 (Pallepati et Averill-Bates, 2011).

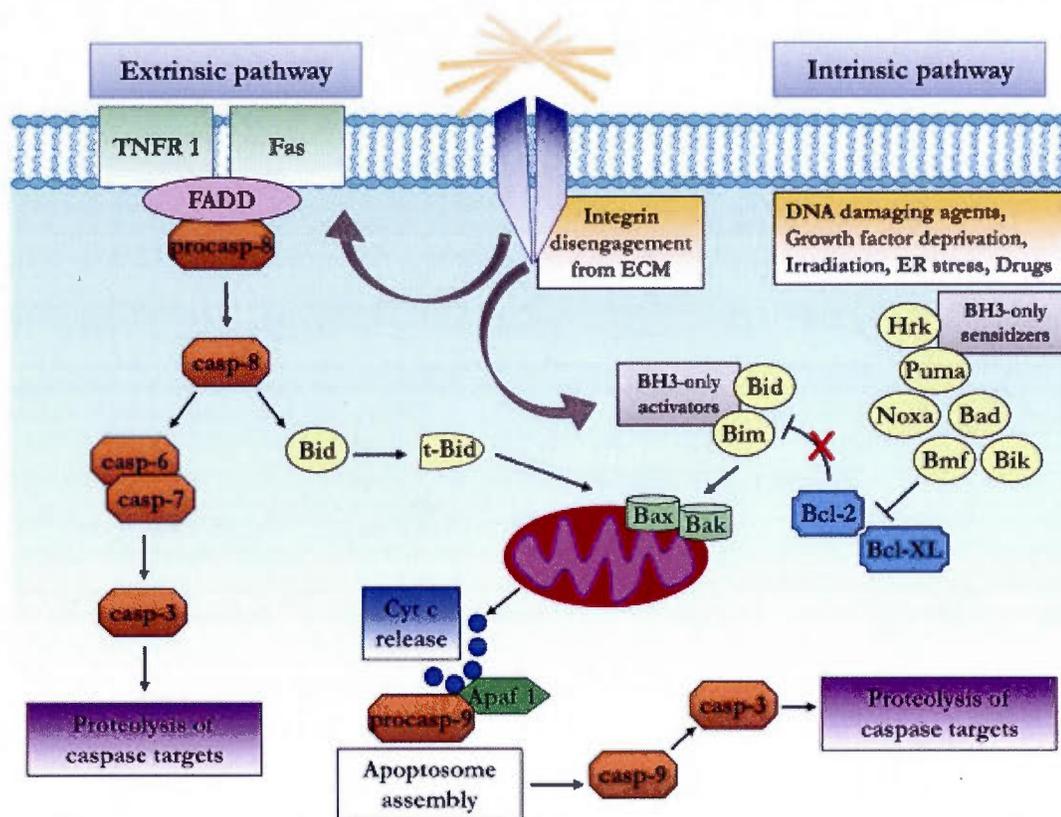


Figure 1.6 Voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque (Paoli et al. 2013)

1.5.3 La voie du stress du réticulum endoplasmique (RE)

Elle conduit à l'arrêt de la synthèse des nouvelles protéines et de la transcription. Ce stress active trois récepteurs PERk, ATF6 et IRE1 qui entraînent l'inhibition de la traduction des protéines, l'augmentation de l'expression des protéines chaperonnes et la dégradation protéique associée au RE (ERAD). Dans une période dénuée de stress, la fonction des protéines chaperonnes permet l'entreposage du calcium suite à un repliement des protéines (Szegezdi et al. 2006). Dans le RE se trouvent des protéines chaperonnes comme celle régulatrice de glucose Bip (GRP78), GRP94, GRP170, la calnexine, la calréticuline. Celles-ci assurent un repliement correct des protéines nouvellement synthétisées (Pallepati and Diana A. Averill-Bates

2011). Certaines conditions comme l'hypoxie, l'excès de ROS, la perturbation de l'homéostasie du calcium peuvent modifier le bon fonctionnement du RE et donc entraîner une accumulation de protéines non pliées. Ce phénomène appelé stress du RE, active des voies de signalisation comme celles de la réponse des protéines non pliées (UPR), ou de l'association des protéines de dégradation du RE. Le stress du RE implique différents mécanismes notamment l'activation transcriptionnelle des gènes pour les chaperonnes du RE et les protéines ERAD. De plus, ERAD implique la translocation de protéines mal pliées ou des protéines agrégées dans le cytoplasme du RE où elle seront ensuite dégradées de manière protéosomale. L'activation de UPR est dépendante de trois capteurs du RE: la protéine kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK), le facteur 6 d'activation de la transcription (ATF6), et une protéine qui requière de l'inositol (IRE1). En absence de stress, ces capteurs sont retenus dans la lumière du RE grâce à leur interaction avec le complexe Bip/GRP78. Durant un stress du RE, Bip relâche ces trois capteurs conduisant ainsi à leur activation (Pallapati et Averill Bates 2011). La Figure 1.7 regroupe les différentes voies qui régulent l'apoptose.

1.5.4 Régulation de l'apoptose par cascade de signalisation

La protéine p53 joue un rôle important au niveau des cellules, notamment la réparation de l'ADN, la sénescence, le cycle cellulaire et l'apoptose. Dans des cellules non stressées, la demie-vie de p53 est très courte et est maintenue à faible niveau par la protéine Mdm2 (Hdm2 chez l'humain). Mdm2 inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 en causant sa dégradation par le protéasome. Le niveau de p53 augmente rapidement en réponse à différents signaux de stress. Cette augmentation entraîne des dommages au niveau de l'ADN, la formation de ROS et l'augmentation de l'oncogénécité de p53. P53 peut aussi induire l'apoptose via un mécanisme dépendant du RE en activant l'expression de Scotin, une protéine localisée dans le RE et dans la membrane nucléaire.

Il existe des protéines anti-apoptotiques qui ont pour but soit d'empêcher, soit de minimiser les dégâts causés par l'apoptose. Parmi ces protéines, on peut citer les protéines de la voie de survie NF-KB (actives lors d'un faible stress et inactives pendant le stress), les FLIP longs (L) et courts (S) qui inhibent la caspase 8 dont la liaison sur FADD bloque la liaison des pro-caspases 8 avec le complexe DISC. De plus, on trouve aussi les protéines chaperonnes HSPs qui réparent les protéines endommagées ou les envoient au protéasome pour les dégrader. On retrouve aussi les IAPs de la voie des mitochondries, et les protéines de la voie de survie PI3K-Akt dont la phosphorylation d'Akt permet celle des protéines cibles impliquées dans les mécanismes de survie (Pórtt et al. 2011, Pragathi et Averill, 2011).

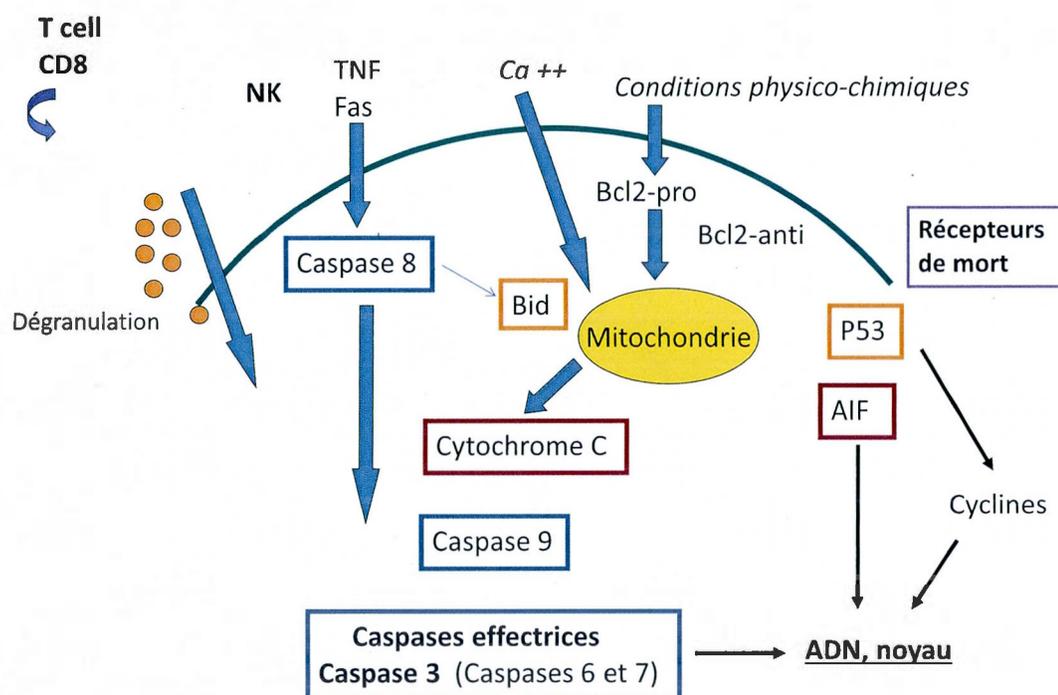


Figure 1.7 Schéma général de l'apoptose (adapté de Pallapati et Averil Bates, 2011)

Une étude effectuée dans notre laboratoire a montré que l'expression de la PIMT était régulée par la kinase GSK-3 et son effecteur la β -caténine, via la voie PI3-

kinase (phosphatidylinositol 3-kinase). Le VPA via l'inhibition indirect (phosphorylation de GSK-3) stimule le niveau de β -caténine et provoque une accumulation de celle-ci (Lamarre et Desrosiers, 2008). Cette accumulation mène à une régulation positive de l'expression de la PIMT (Lamarre et Desrosiers 2008). En effet, cette observation se base sur le fait que la sérine/thréonine kinase Akt-1 pourrait permettre au VPA de stimuler l'expression de la PIMT. En effet, il a déjà été prouvé que le VPA augmentait le niveau de phosphorylation de Akt sur la Ser473 dans les neuroblastomes SH-SY5Y (Thianhong et al. 2005). De plus, la voie de signalisation PI3K-Akt est connue pour être une voie de survie cellulaire et, la phosphorylation des protéines impliquées dans cette voie permet celle des protéines cibles participant aux mécanismes de survie (Portt et al. 2011, Pragathi et Averill, 2011).

D'autres recherches dans notre laboratoire ont démontré que l'induction de l'expression de la PIMT par le VPA était régit par la voie de signalisation ERK (Cournoyer et Desrosiers 2009). En effet, l'activation de la voie de signalisation de ERK par VPA conduit à une augmentation de l'expression de RSK-1, 90 kDa ribosomal S6 kinase, un membre de la famille des effecteurs de sérine/thréonine kinases qui transmettent les signaux de transduction en aval de la cascade des MAP kinases. Cette activation de la voie de ERK par le VPA entraîne aussi une augmentation de la phosphorylation de RSK-1 au niveau des résidus Thr359/Ser363. La stimulation de RSK-1 inhibe GSK-3 β via sa phosphorylation sur la Ser9, favorisant ainsi l'accumulation de la β -caténine. Ainsi, la β -caténine migre au noyau cellulaire et induit l'expression de la PIMT via la régulation de sa transcription. Cette étude montre que le VPA active ERK1/2 par l'intermédiaire de sa phosphorylation sur la Thr202/Tyr204 et la Thr185/Tyr187 respectivement dans deux lignées de cellules cérébrales, les U-87 MG et les SH-SY5Y (Cournoyer et Desrosiers, 2009). En utilisant des inhibiteurs dirigés contre MEK 1/2 et ERK 1/2, les chercheurs se sont rendus compte que ceux-ci supprimaient l'activation de ERK 1/2 par le VPA, ce qui inhibait l'induction de la PIMT par le médicament. Pour finir, des traitements

effectués avec un ARNi dirigé contre RSK-1 conduisait à une inhibition de l'expression de RSK-1, de la β -caténine et de la PIMT induite par le VPA (Cournoyer et Desrosiers, 2009). Ces résultats concluent donc que la PIMT est induite par le VPA par la voie ERK/RSK-1/GSK3/ β caténine et par la voie de survie cellulaire PI3kinase/Akt.

1.5.5 Rôle anti-apoptotique de la PIMT

Certaines études ont montré que l'induction de la PIMT protégeait les cellules contre l'apoptose causée par le stress oxydatif au H_2O_2 . Il a aussi été démontré que la PIMT bloquait la formation des ROS, suggérant une fonction antioxydante de l'enzyme (Huebscher et al. 1999). Elle serait donc capable de protéger les cellules contre des niveaux élevés de protéines proapoptotiques.

Une étude plus récente a mis en avant le rôle de la PIMT dans le diabète. En effet, une analyse protéomique a prouvé que l'expression de l'enzyme au niveau de l'aorte de rats diabétiques était beaucoup plus faible que celle dans l'aorte de rats sains. Cette publication appuie le fait que les lipoprotéines sanguines glycosylées ou gly-LDLs entraînent une apoptose des cellules. De ce fait, les chercheurs ont aussi remarqué que les gly-LDLs régulaient à la baisse la PIMT dans des cellules endothéliales HUVEC, suggérant ainsi que l'enzyme serait impliquée dans le processus d'apoptose induit par les gly-LDLs. Ils ont démontré que la surexpression de la PIMT diminuait l'apoptose induite par ces LDLs contrairement aux cellules traitées avec un ARNi contre la PIMT. À l'inverse, ce dernier entraîne une augmentation anormale de la concentration cytosolique de cytochrome c, sachant que son relâchement est une étape clé dans l'activation de la cascade de caspase initiant l'apoptose (Xiao-li et al. 2013).

De plus, une publication a aussi rapporté que la surexpression de la PIMT était capable de prévenir l'apoptose induite par un stress oxydatif dans les cellules endothéliales. En effet, il a été observé que dans des conditions où l'enzyme était

supprimée, le stress oxydatif causait une accumulation de résidus isoaspartyls et de protéines désamidées dans les cellules conduisant ainsi à la mort de ces dernières. Cette mort cellulaire par apoptose était régulée à la baisse lorsque l'enzyme PIMT était surexprimée (Cimmino et al. 2008).

Au vu de tous ces aspects, notamment la voie d'induction de l'expression de la PIMT par la voie de survie PI3k-Akt, et son rôle protecteur dans l'apoptose, nous nous sommes proposés d'étudier les propriétés antiapoptotiques de l'enzyme PIMT induite par le VPA contre l'apoptose causée par la roténone dans les neuroblastomes humains en culture.

1.6 Objectif de la recherche

Récemment, des publications ont mis l'accent sur l'implication de la PIMT dans la prévention de l'apoptose. Cette enzyme qui est fortement exprimée au niveau du cerveau, a la capacité de réparer les protéines endommagées. La PIMT occupe donc une place importante pour le bon fonctionnement des cellules. De plus, certaines des voies de signalisation importantes pour son expression sont aujourd'hui connues. Ce qui permet de mieux comprendre le rôle de la PIMT dans les différentes maladies neurodégénératives. Certaines de ces maladies sont causées par une mort importante de cellules neuronales par apoptose. C'est pourquoi notre étude s'est basée sur les propriétés anti-apoptotiques que la PIMT induite par le VPA pourrait avoir. Des recherches effectuées dans le passé ont montré que la PIMT protégeait contre l'apoptose induite par le stress oxydatif et contre les espèces réactives d'oxygène dans des cellules. Étant donné l'importance de la PIMT dans le cerveau, notre étude s'est effectuée sur une lignée de cellules cancéreuses de cerveau humain, des neuroblastomes SH-SY5Y, qui expriment la PIMT. L'objectif de ma recherche vise à démontrer si le traitement préalable des cellules SH-SY5Y avec le VPA protégeait contre l'action cytotoxique de la roténone et si la surexpression de la PIMT protégeait directement contre l'apoptose induite par ce pesticide.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériels

La lignée cellulaire des neuroblastomes humains SH-SY5Y provient de l'American Type Culture Collection (Manassas, Virginie, États-Unis). Les cellules SH-SY5Y transfectées avec le plasmide vide pCMV6, ou avec le plasmide pCMV6-PIMT pour surexprimer la PIMT ou encore avec le plasmide pCMV6-PIMT (D83V) exprimant une PIMT mutée et inactive, ont été produites dans notre laboratoire par un autre étudiant. Le VPA et la roténone viennent de Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). L'ARNi contrôle et celui dirigé contre la PIMT ont été achetés de Qiagen (Valencia, CA, États-Unis). La turbofectine utilisée comme agent de transfection provient de Cedarlane (Burlinton, ON, Canada). Les anticorps dirigés contre la caspase 3, p53, Bcl-xL ont été achetés de Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, États-Unis). L'inhibiteur de la caspase 3, le peptide Ac-DEVD-CHO est issu de Promega. L'anticorps dirigé contre la PIMT a été produit à l'Institut de Recherche en Biotechnologie (Montréal, QC, Canada). L'anticorps contre l'alpha-tubuline vient de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, États-Unis). Les kits de mesure des activités caspase 3, 7 et de la caspase 9 ont été achetés de Promega. Le test de prolifération et de viabilité cellulaire (MTT) est de Invitrogen (Burlington, ON, Canada).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire de neuroblastomes SH-SY5Y a été cultivée dans du milieu D-MEM/F 12 provenant de Invitrogen en présence de sérum bovin fœtal (FBS) à une concentration finale de 10%.

2.2.2 Traitement des cellules avec l'acide valproïque et la roténone.

Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à une température de 37°C avec une atmosphère humidifiée de 5% de CO₂. Les traitements ont été faits soit dans des plaques de 6 puits ou de 96 puits. Dans les plaques à 6 et 96 puits, les neuroblastomes furentensemencés à une concentration respectivement de 200 000 et de 10 000 cellules par puit. Les cellules ont été incubées durant 48 h dans le milieu de culture complet contenant le sérum bovin. Par la suite le VPA et la roténone ont été ajoutés pour une durée de 24 h chacun, à une concentration respective de 1 mM et 5 ou 10 µM. Le DMSO lorsqu'utilisé comme solvant a été maintenu à une concentration de 0.1 % (v/v). Une lyse des cellules a été ensuite effectuée dans un tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxycholate) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases, 1 mM de vanadate de sodium (Na₃VO₄) et 1 mM de fluorure de sodium (NaF). L'expression des protéines a été déterminée par immunobuvardage de type Western pour les cellules contenues dans les plaques à 6 puits. Les cellules dans les plaques à 96 puits ont servi à mesurer l'activité des caspases 3 et 9 à l'aide de kits.

2.2.3 Transfection des cellules avec un ARNi contre la PIMT

Les cellules ont étéensemencées dans les plaques à 6 puits à une concentration de 200 000 cellules par puit, dans le milieu D-MEM/F 12 avec du sérum durant 48 h. Avant la transfection, du milieu de culture sans sérum a été mélangé à de la turbofectine, un agent de transfection. Après 5 minutes d'incubation à

température pièce, l'ajout de l'ARNi contre la PIMT au mélange milieu de culture sans sérum contenant de la turbofectine a été effectué à une concentration finale de 40 nM. Le même procédé a été utilisé pour l'ARNi contrôle. Le mélange obtenu a été ensuite transféré dans les plaques après 30 min d'incubation à température pièce. Les cellules ont ensuite été incubées à 37 °C durant 48 h. À la suite des traitements d'ARNi, les cellules ont été lysées et l'expression de la PIMT a été vérifiée par immunobuvardage de type Western.

2.2.4 Détachement, rattachement des cellules puis mesure de l'activité de la caspase 3

Une fois les transfections et les différents traitements effectués dans les plaques à 6 puits comme expliqué plus haut, les cellules ont été passées à la trypsine et décollées des plaques. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 5000 rpm durant 5 min et les surnageants ont été éliminés. Une solution de phosphate saline tamponnée (PBS) 1X a été ajoutée aux culots et une autre centrifugation a été effectuée à 5000 rpm. Une fois de plus les surnageants ont été éliminés et remplacés par du milieu de culture contenant du sérum. Les comptes cellulaires ont été effectués et les cellules ont étéensemencées à une concentration de 10 000 par puit dans les plaques à 96 puits. Après 24 h d'incubation à 37 °C, l'activité de la caspase 3 ou de la caspase 9 a été mesurée.

2.2.5 Mesure de l'activité des caspases 3 ou 9

100 µl de préparation (fourni dans le kit de Promega) ont été ajoutés à chaque puit de la plaque à 96 puits. Ensuite celle-ci a été agitée entre 300 et 500 rpm durant 30 secondes. Après 1 heure d'incubation à l'abri de la lumière pour la caspase 3 et 45 min pour la caspase 9, la luminescence des échantillons a été mesurée. L'inhibiteur de la caspase 3 lorsqu'utilisé a été maintenu à une concentration de 10 µM en prétraitement durant 1 h.

2.2.6 Mesure de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été mesurée en utilisant le kit de prolifération vibrant MTT (Invitrogen) dans des microplaques de 96 puits (10 000 cellules par puit) selon le protocole de la compagnie. Suite aux différents traitements, deux lavages successifs des cellules ont été effectués avec du milieu de culture D-MEM/F12 sans sérum. À la suite de ces lavages, 100 µl de milieu sans sérum frais ont été ajoutés suivi de 10 µl de la solution stock de MTT à une concentration de 12 mM dans chaque puit. Les cellules ont été ensuite incubées durant 4 h à 37°C. Après incubation, 100 µl de SDS-HCL 0.01 M ont été ajoutés à chaque puit dans le but de dissoudre les cristaux formés. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C toute la nuit. L'absorbance de la solution ainsi colorée a été mesurée à 570 nm.

2.2.7 Lyse cellulaire

Suite aux différents traitements, les cellules ont été lavées dans une solution de PBS froide. Elles ont ensuite été récoltées en grattant le fond des plaques puis lysées sur la glace durant 30 min avec un tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxycholate) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases, 1 mM de vanadate de sodium (Na_3VO_4) et 1 mM de fluorure de sodium (NaF). Une centrifugation a été ensuite effectuée à 10 000 g pendant 10 min, les surnageants ont été conservés pour récolter les protéines solubles.

2.2.8 Électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western

Les protéines obtenues lors de la lyse cellulaire ont été dosées avec la méthode de microBCA de Pierce (Rockford, IL, États-Unis). Ensuite 30 µg de protéines ont été mélangés à un tampon d'électrophorèse (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycérol, 2% SDS, 5% βmercaptoéthanol et 0.00625% bleu de bromophénol). Le mélange a été chauffé 4 min à 100°C, et les échantillons ont ensuite été déposés sur un gel d'entassement 3.8% (p/v) acrylamide, 0.1% (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 0,125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 1 µl/ml N,N,N', N-tétraméthylènediamine (TEMED) et 0.5 mg/ml persulfate d'ammonium (APS).

Par la suite, les protéines ont été séparées dans un gel contenant 12,5% (p/v) ou 15% pour la caspase 3 d'acrylamide, 0.3% (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 0.375 M de Tris-HCl à un pH 8.8, 0.1% (v/v) SDS, 0.5 µl/ml de TEMED et 0.5 mg/ml APS.

Après l'électrophorèse, les gels contenant les protéines et les membranes de polyvinylidène difluore (PVDF) ont été trempés dans le tampon de transfert contenant 96 mM glycine, 10 mM Tris et 10% méthanol pendant 15 min. Le transfert des protéines a été ensuite effectué à 13. volt pendant 1 h dans un système semi dry. Suite au transfert des protéines sur la membrane PVDF, le blocage des sites de liaison non spécifiques a été effectué à température pièce pendant 1 h sous agitation dans une solution Tris-saline (TBS) contenant 0.1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre.

2.2.9 Immunodétection

Après le blocage, les membranes de PVDF ont été lavées à trois reprises durant 15 min dans un tampon TBS contenant 0.3% de tween-20. Ensuite, elles ont été incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps d'intérêt. Ces anticorps ont été préparés dans une solution TBS contenant 0.1% tween-20, 0.01% de sodium azide (NaN_3) et 5% albumine de sérum bovin (BSA) sauf pour l'anticorps dirigé contre la PIMT. Les différentes dilutions des anticorps étaient les suivantes : PIMT 1:50 000, alpha-tubuline, BCL-xL, p53 et caspase 3, 1:1000.

Le lendemain, les membranes PVDF ont été lavées trois fois à température pièce avec le tampon TBS contenant 0.3% tween-20, puis incubées 1 h avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. L'anticorps secondaire a été dilué 1:2500 dans le tampon TBS contenant 0.1% tween-20 et 5% de lait. Trois lavages à la suite ont été effectués avec le tampon TBS contenant 0.3% tween-20. La prochaine étape a été la détection par chimioluminescence (ECL). Les membranes ont été incubées dans une solution ECL durant environ 1 min. Elles ont ensuite été exposées à des films Fuji dans le but de détecter les protéines qui nous intéressaient. L'analyse de

l'intensité relative des différentes protéines détectées a été effectuée à l'aide d'un logiciel de densitométrie intégré à un système d'imagerie numérique (TotalLab).

2.2.10 Analyses densitométriques et statistiques

Les analyses densitométriques ont été effectuées à l'aide du logiciel TotalLab TL 100 program (Nonlinear USA Inc, Durham, NC). Les résultats sont représentatifs de trois expériences individuelles au minimum. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test Student t et ont toutes été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Un pré-traitement des cellules avec l'acide valproïque les protège contre l'action cytotoxique de la roténone

Des travaux effectués dans notre laboratoire ont précédemment démontré que le traitement des neuroblastomes humains SH-SY5Y avec des concentrations thérapeutiques de VPA, un médicament antiépileptique, augmentait le niveau de la PIMT dans celles-ci (Cournoyer et Desrosiers, 2008). Les concentrations thérapeutiques de VPA utilisées pour le traitement de l'épilepsie se situent entre 0,6 et 1 mM (Li et al. 2005). Afin de confirmer ces résultats nous nous sommes proposés d'étudier le niveau de la PIMT dans des cellules SH-SY5Y traitées avec une concentration de 1 mM de VPA, et cela pour une durée de 24 h comme décrit préalablement (Cournoyer et al. 2009).

D'autre part, des études ont démontré que la roténone, un pesticide perturbait la chaîne respiratoire mitochondriale et entraînait la mort cellulaire par apoptose. Cette perturbation pourrait avoir une incidence sur la PIMT et causer une diminution du niveau de celle-ci. Pour cela, nous avons donc décidé de traiter les neuroblastomes avec des concentrations de 5 et 10 μ M roténone durant 24 h (Thianhong et al. 2005).

Par la suite, nous avons voulu observer l'effet potentiellement protecteur de la PIMT induite par le VPA en prétraitant les cellules avec 1 mM VPA durant 24 h suivi

d'un traitement de 24 h avec la roténone à des concentrations de 5 et 10 μM . Comme on peut le voir dans la Figure 3.1 A, les analyses par d'immunobuvardage de type Western et par densitométrie indiquent que le niveau de la PIMT augmente de manière significative, soit d'environ 50% dans les cellules traitées pendant 24 h avec le VPA. De plus, les résultats de cette figure montrent que 10 μM roténone inhibe significativement l'expression de la PIMT d'environ 40%. Cette figure montrent également que le fait de prétraiter les neuroblastomes durant 24 h avec 1 mM VPA permet de contrer l'action inhibitrice de la roténone sur la PIMT de manière significative. On peut aussi suggérer que la roténone antagonise l'augmentation de l'expression de la PIMT induite par le VPA. Comme on peut le constater dans la Figure 3.1 A, le niveau de l' α -tubuline, qui est utilisée comme un contrôle, est restée stable en présence du VPA et de la roténone. Donc, les résultats démontrent que le VPA stimule l'expression de la PIMT, que la roténone inhibe l'expression de l'enzyme et que le prétraitement des cellules avec le VPA protège contre l'action inhibitrice de la roténone sur la PIMT.

En observant la Figure 3.1 B, on remarque que le VPA utilisé à une concentration de 1 mM n'a aucune incidence sur la survie des cellules contrairement à la roténone qui diminue considérablement la viabilité de celles-ci. En effet, la viabilité des cellules SH-SY5Y chute d'environ 50% que se soit à une concentration de 5 ou de 10 μM roténone après 24 h. Par la suite les résultats obtenus prouvent que le prétraitement des cellules avec le VPA durant 24 h les protège contre la mort induite par la roténone et ce de manière significative, comparativement aux conditions roténone seule. Le VPA protège donc non seulement contre l'effet inhibiteur de la roténone sur l'expression de la PIMT mais protège aussi contre l'action cytotoxique de celle-ci.

3.2 L'acide valproïque protège contre les changements induits par la roténone au niveau des protéines apoptotiques

L'effet protecteur du VPA sur le niveau d'expression des protéines apoptotiques a été déterminé par une analyse Western blot dans les cellules SH-SY5Y exposées à la roténone. L'analyse densitométrique des résultats présentés à la Figure 3.2 A indique que le traitement avec 10 μ M roténone durant 24 h diminue le niveau de la protéine antiapoptotique Bcl-xL d'environ 50%, alors qu'il augmente l'expression des protéines proapoptotiques p53 et caspase 3 dans ces mêmes pourcentages. Etant donné que la roténone est connue pour être un inducteur de l'apoptose au niveau mitochondrial (Radad et al. 2008, Cannon et al. 2009, Drolet et al. 2009), il est logique d'observer une variation de l'expression de ces protéines en sa présence. De plus, dans cette même figure, on constate que l'augmentation du niveau de la caspase 3 et de la protéine proapoptotique p53 en présence de roténone est fortement diminuée dans les conditions de prétraitement avec 1 mM VPA durant 24 h (retour du niveau semblable aux conditions contrôles). Le phénomène inverse se produit pour la protéine antiapoptotique Bcl-xL dont l'expression augmente lorsque les cellules sont prétraitées au VPA. Comme on peut le constater dans la Figure 3.2 A, le niveau de l' α -tubuline, qui est utilisée comme un contrôle, est resté stable en présence de VPA et de roténone.

La Figure 3.2 B représente l'activité de la caspase 3 mesurée avec un peptide substrat dans les cellules traitées avec différentes conditions de VPA et de roténone. On note dans cette figure que le VPA n'induit pas d'activité caspase 3 car son effet est comparable à celui de la condition contrôle. Par contre, lorsque les cellules sont traitées avec de la roténone à une concentration de 10 μ M durant 24 h, on observe une augmentation significative de l'activité caspase 3 d'environ 50% comparativement aux conditions contrôles et 1 mM VPA. Ces résultats confirment donc que la roténone induit la mort des cellules par apoptose. On constate également que le fait de prétraiter les cellules avec 1 mM VPA durant 24 h avant de les traiter à la roténone, diminuait de manière significative l'induction de l'activité caspase 3 d'environ 30% comparativement à la condition roténone 10 μ M. Cette activité bien

que supérieure à celle des conditions contrôles et VPA devient significativement inférieure à la condition roténone seule. Dans cette expérience, un inhibiteur spécifique de la caspase 3, le peptide Ac-DEVD-CHO, a été utilisé dans le but de s'assurer que c'est bien l'activité caspase 3 qui est mesurée.

3.3 L'action protectrice de l'acide valproïque contre l'activation de la caspase 3 par la roténone est dépendante de la PIMT

Afin de valider que l'effet protecteur du VPA contre la toxicité de la roténone est dépendante de l'action de la PIMT, les cellules de neuroblastomes SH-SY5Y ont été traitées ou non avec un ARNi dirigé contre la PIMT puis l'activité de la caspase 3 dans ces cellules a été mesurée. La Figure 3.3 A représente les résultats d'une analyse effectuée par immunobuvardage de type Western. On remarque dans cette figure que le traitement des cellules avec l'ARNi PIMT bloque très fortement l'expression de l'enzyme (environ 90%), comparativement aux conditions de traitement avec l'ARNi contrôle où l'expression de la PIMT n'est pas affectée. Une fois assuré que l'ARNi inhibe bien l'expression de la PIMT, nous nous sommes proposés de mesurer l'activité caspase 3 dans les cellules.

Dans la Figure 3.3 B, on constate une augmentation très importante de l'activité caspase 3 d'environ 10 fois dans les cellules transfectées avec l'ARNi contrôle en présence de 10 μ M roténone comparativement à la condition sans roténone. Dans les cellules traitées exclusivement avec l'ARNi contre la PIMT, nous notons également une augmentation significative d'environ 13 fois de l'activité caspase 3 en présence de roténone. De plus, il est important de noter qu'une différence significative des activités caspase 3 est observée entre les conditions ARNi contrôle et ARNi PIMT en absence de roténone. En effet, l'inhibition de la PIMT en présence de 10 μ M roténone conduit à une augmentation significative de l'activité caspase 3 d'environ 30% comparativement à la condition ARNi contrôle en présence de 10 μ M roténone. Cela veut donc dire que la protection du VPA contre l'action

cytotoxique de la roténone est bien dépendante de la PIMT, et que l'enzyme joue bel et bien un rôle protecteur contre l'activation de la caspase effectrice par la roténone.

3.4 La surexpression de la PIMT inhibe l'activité de la caspase 3 et 9 induite par la roténone

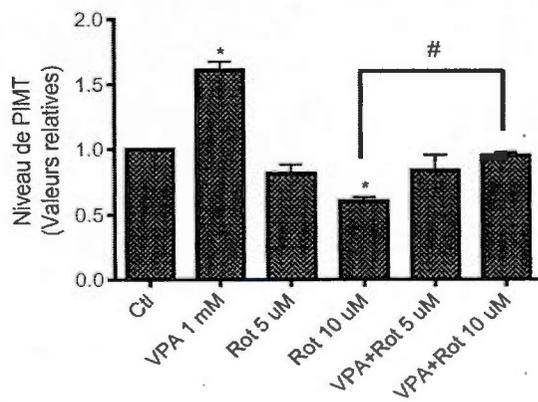
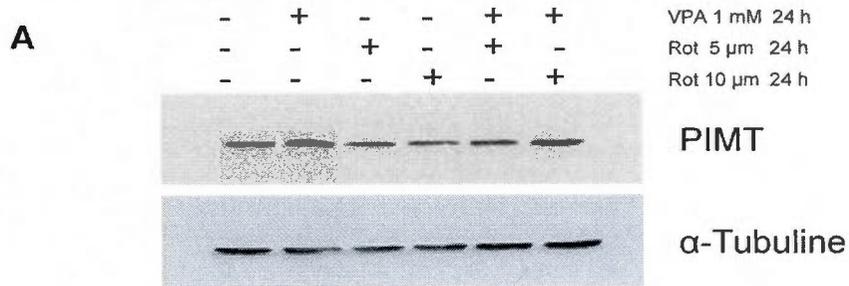
Dans le but d'approfondir la compréhension du rôle antiapoptotique de la PIMT, nous avons utilisé des cellules SH-SY5Y transfectées avec des plasmides exprimant différentes formes de la PIMT. Ainsi, les cellules contrôles ont été transfectées avec le plasmide pCMV6 vide, celles-ci expriment donc uniquement la PIMT endogène (Figure 3.4 A, puits 1 et 2). Les autres cellules ont été transfectées avec le plasmide pCMV6 contenant l'isoforme I de la forme sauvage de la PIMT (Figure 3.4 A, puits 3 et 4) ou exprimant une forme mutée de la PIMT dans le site catalytique de celle-ci (D83V), la rendant inactive (Figure 3.4 A, puits 5 et 6). Dans les cellules surexprimant les formes sauvages et mutées de la PIMT, les niveaux d'expression sont supérieurs de 2 à 3 fois et de 3 à 4 fois respectivement par rapport à ceux de la PIMT endogène observés dans les cellules contrôles transfectées avec le plasmide vide (Figure 3.4 A).

Les résultats précédents ont démontré qu'une déficience en PIMT dans les cellules SH-SY5Y induite par un traitement avec un ARNi augmentait fortement la susceptibilité de ces cellules face à l'apoptose déclenchée par la roténone tel que mesuré avec l'essai de l'activité de la caspase 3 (Figure 3.3 B). Ici, dans une expérience complémentaire, nous avons testé si la surexpression de la PIMT pouvait protéger les cellules contre l'apoptose provoquée par la roténone. Comme attendu, dans les cellules contrôles transfectées avec le plasmide vide, un traitement avec 10 μ M roténone durant 24 h augmente significativement l'activité de la caspase 3 (Figure 3.4 B) d'environ 60% comparativement à la condition sans roténone. Dans les cellules surexprimant la forme sauvage de la PIMT, la roténone induit aussi une hausse de l'activité caspase 3. Cependant, cette hausse est significativement moindre que celle

notée chez les cellules contrôles soit d'environ 25% (Figure 3.4 B). Ces résultats indiquent donc que la PIMT protège les cellules contre l'apoptose induite par la roténone. Dans le cas des cellules exprimant la forme inactive de la PIMT, l'activité caspase 3 induite par la roténone est similaire à celle observée chez les cellules contrôles. De plus, il est important de noter que cette activité caspase 3 provoquée par la roténone est significativement moindre dans les cellules exprimant la PIMT sauvage comparativement à celles exprimant la PIMT mutée et inactive (Figure 3.4 B). Ces données démontrent alors que l'activité catalytique de la PIMT est requise afin que celle-ci puisse exercer son effet protecteur contre l'apoptose induite par la roténone.

La roténone est un pesticide qui bloque l'activité du complexe I des mitochondries, et il est souvent employé pour investiguer les mécanismes moléculaires dans le processus de la neurodégénérescence ou de la mort neuronale (Radad et al. 2008, Cannon et al. 2009, Drolet et al. 2009). Puisque la roténone perturbe le fonctionnement mitochondrial des neurones, nous avons examiné si celle-ci active la voie mitochondriale de l'apoptose et nous avons étudié le rôle de la PIMT sur cette voie dans les cellules SH-SY5Y. On remarque qu'effectivement, chez les cellules contrôles qui sont transfectées avec le plasmide vide puis traitées avec 10 μ M roténone durant 24 h, l'activité de la caspase 9 augmente significativement d'environ 70% comparativement à celle dans les cellules non traitées (Figure 3.4 C). Ces résultats indiquent clairement que la roténone active la voie mitochondriale de l'apoptose dans les cellules SH-SY5Y. Lorsque les cellules exprimant la forme sauvage de la PIMT sont traitées avec 10 μ M roténone durant 24 h, l'activité de la caspase 9 est significativement réduite d'environ 50% comparativement à celle observée dans les cellules contrôles traitées avec la roténone (Figure 3.4 C). Quant aux cellules surexprimant la forme inactive de la PIMT, aucune protection n'est conférée contre l'apoptose causée par la roténone car l'activité de la caspase 9 observée est similaire à celle mesurée dans les cellules contrôles (Figure 3.4 C). De

plus, l'activité basale des caspases 3 et 9 est inhibée dans les cellules exprimant la forme sauvage de la PIMT contrairement à l'activité observée dans les cellules exprimant la forme mutée qui s'apparente à la condition contrôle. En résumé, ces résultats montrent que la surexpression de la PIMT catalytiquement active permet une protection contre l'apoptose induite par la roténone.



B

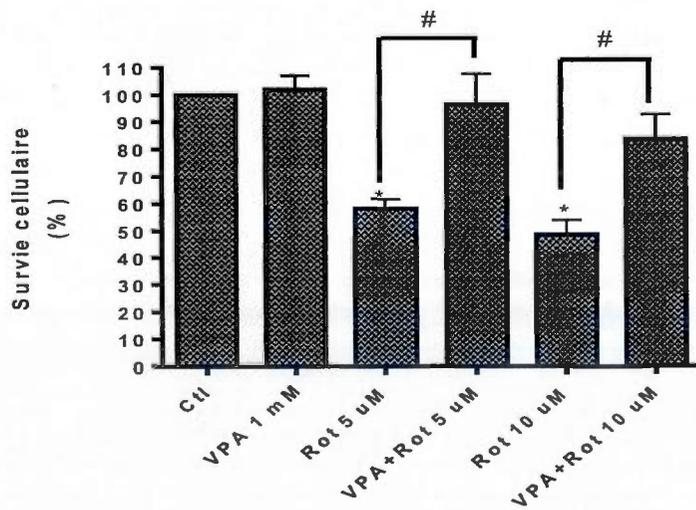


Figure 3.1 Un pré-traitement des cellules avec VPA les protège contre l'action cytotoxique de la roténone.

(A) Les cellules SH-SY5Y ont été incubées avec 1 mM VPA ou avec 5 et 10 μ M roténone durant 24 h. Des cellules non traitées ont servi de contrôle (Ctl). Les niveaux de la PIMT et de l'alpha-tubuline des lysats des cellules ont été déterminés par l'analyse SDS-PAGE et par immunobuvardage de type Western. Les histogrammes représentent les niveaux de la PIMT dans les cellules traitées comparativement à celles non traitées. Le rapport de la PIMT sur l'alpha-tubuline a été calculé par analyse densitométrique. (B) Les cellules SH-SY5Y ont été incubées avec ou sans VPA et roténone comme décrit ci-dessus durant 24 h, dans le but de déterminer la survie cellulaire. Celle-ci est mesurée à l'aide d'un kit de viabilité MTT vybrant. Les résultats représentent une moyenne de trois expériences indépendantes. Le test t de student indique une différence significative ($p < 0.05$) entre les cellules traitées et le contrôle (*) ou entre deux conditions (#)

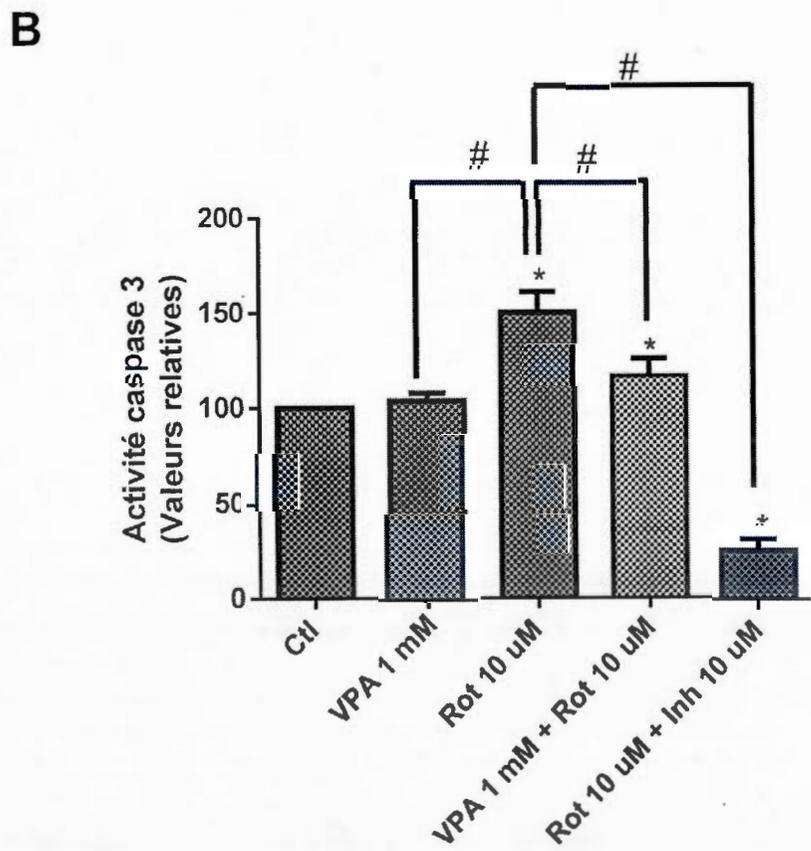
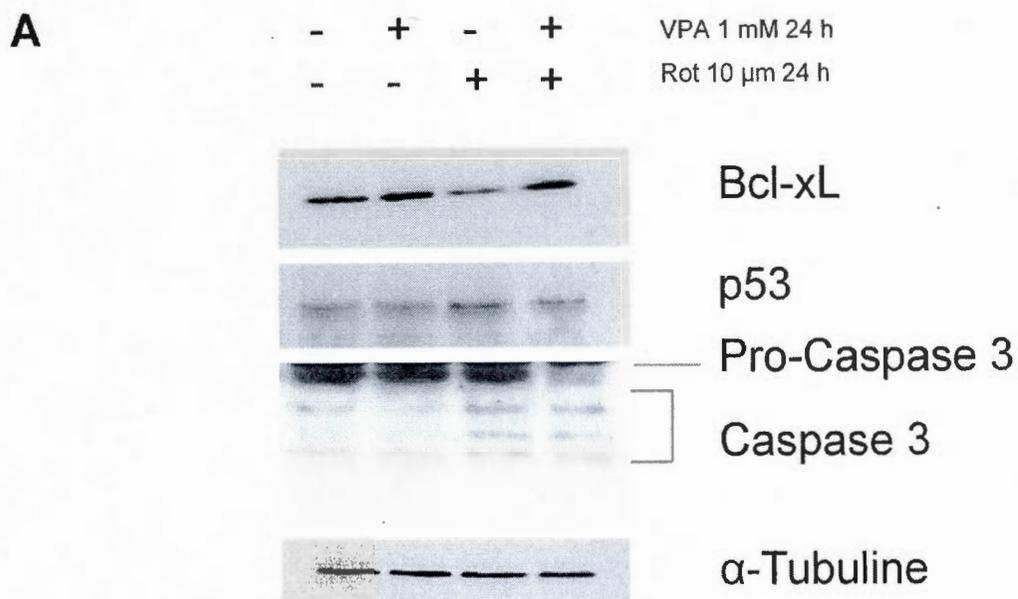


Figure 3.2 VPA protège contre les changements induits par la roténone au niveau des protéines apoptotiques.

(A) Les cellules SH-SY5Y ont été incubées avec 1 mM VPA ou 10 μ M roténone durant 24 h. Des cellules non traitées ont servi de contrôle (Ctl). L'expression de Bcl-xL, p53, pro-caspase 3, caspase 3 clivée en trois fragments et de l'alpha-tubuline des lysats de cellules a été déterminé par l'analyse SDS-PAGE et par immunobuvardage de type Western. (B) Les cellules SH-SY5Y ont été incubées avec ou sans VPA et roténone comme décrit ci-dessus, dans le but de déterminer l'activité de la caspase 3. Celle-ci a été mesurée à l'aide d'un kit provenant de Promega. Un inhibiteur spécifique de la caspase 3, le peptide Ac-DEVD-CHO à la concentration de 10 μ M a été utilisé dans le but de s'assurer que c'est bien l'activité de cette caspase qui est mesurée dans l'essai. Les résultats représentent une moyenne de trois expériences indépendantes. Le test t de student indique une différence significative ($p < 0.05$) entre les cellules traitées et le contrôle (*) ou entre deux conditions (#)

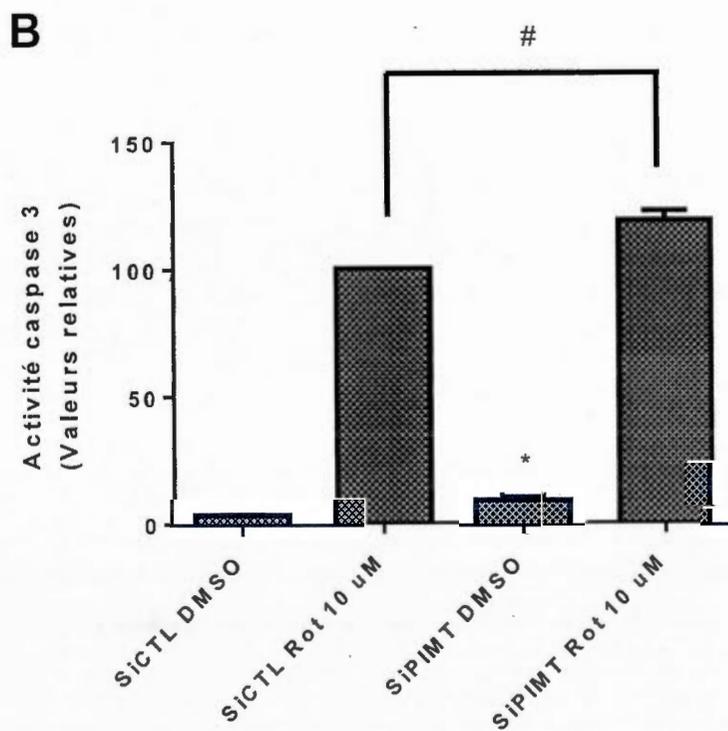
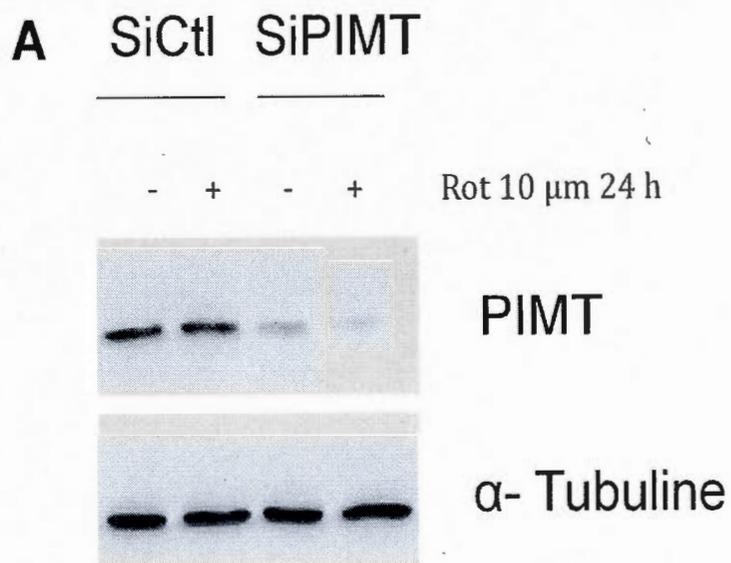
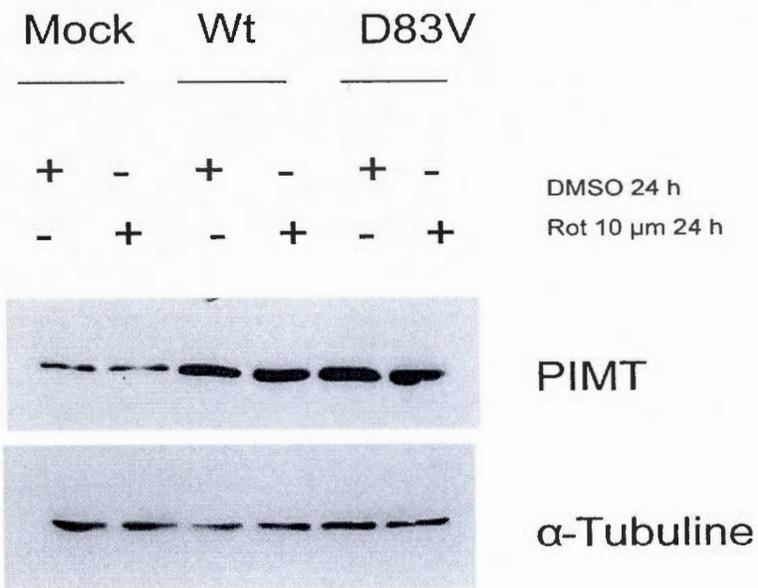


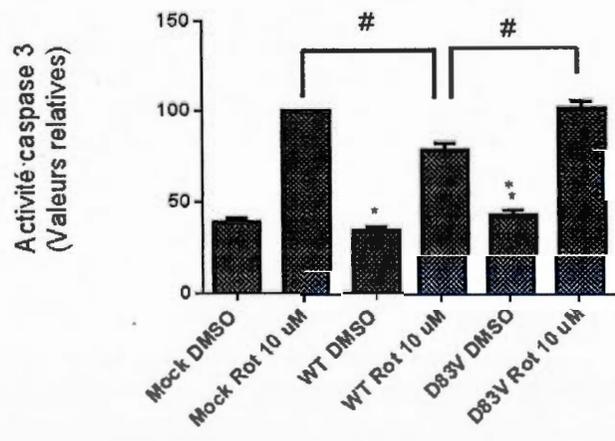
Figure 3.3 L'action protectrice du VPA contre l'activation de la caspase 3 par la roténone est dépendante de la PIMT.

(A) Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec un ARNi (SiPIMT) dirigé contre la PIMT ou un ARNi non spécifique servant de contrôle (SiCtl). Les cellules ont ensuite été incubées ou pas avec 10 μ M roténone durant 24 h. Les cellules non traitées ont été maintenues en présence de DMSO. Les niveaux de la PIMT et de l'alpha-tubuline des lysats de cellules ont été analysés par SDS-PAGE et par immunobuvardage de type Western. (B) Les cellules SH-SY5Y transfectées avec les deux types d'ARNi ont été incubées avec 10 μ M roténone durant 24 h ou en son absence (DMSO), dans le but de déterminer l'activité de la caspase 3. Celle-ci a été mesurée à l'aide d'un kit provenant de Promega. Les colonnes représentent les rapports de l'activité caspase 3 sur la viabilité cellulaire dans les mêmes conditions. Les résultats représentent une moyenne de trois expériences indépendantes. Le test t de student indique une différence significative ($p < 0.05$) entre les cellules traitées et le contrôle (*) ou entre deux conditions (#).

A



B



C

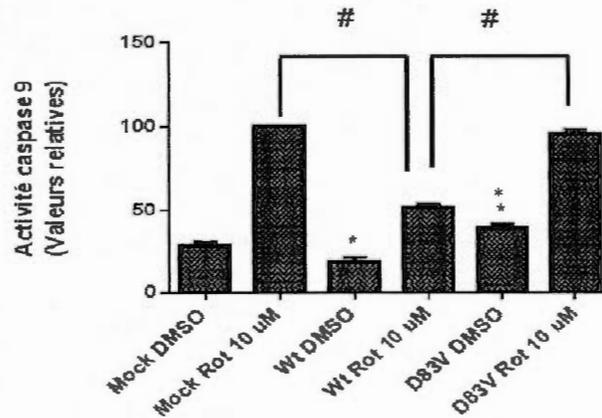


Figure 3.4 La surexpression de la PIMT inhibe l'activité de la caspase 3 et de la caspase 9 induite par la roténone.

(A) Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec le plasmide pCMV6 vide (Mock) ou le plasmide pCMV6-PIMT exprimant l'isoforme I de la forme sauvage de la PIMT (Wt) ou avec le plasmide pCMV6-PIMT (D83V) exprimant une PIMT inactive car ayant une mutation sur son site actif. Les cellules ont ensuite été incubées avec 10 µM roténone ou en son absence durant 24 h. Les niveaux de la PIMT et de l'alpha-tubuline des lysats de cellules ont été analysés par SDS-PAGE et par immunobuvardage de type Western. (B) Les cellules SH-SY5Y transfectées ont été incubées avec la roténone ou le DMSO durant 24 h, dans le but de déterminer l'activité de la caspase 3. (C) Les cellules SH-SY5Y transfectées ont été incubées avec la roténone ou le DMSO durant 24 h, dans le but de déterminer l'activité de la caspase 9. Ces activités ont été mesurées à l'aide de deux kits de mesure des activités caspase 3 et 9 provenant de Promega. Les résultats représentent une moyenne de trois expériences indépendantes. Le test t de student indique une différence significative

($p < 0.05$) entre les cellules traitées et le contrôle (*), entre le niveau basal des activités caspase 3 et 9 entre les conditions Wt DMSO et D83V DMSO (**) ou entre deux conditions (#).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La PIMT est connue pour réparer les protéines anormales ayant accumulées des résidus L-isoaspartyls dans leur structure (Clark S. 2003, Desrosiers et Fanélus 2011). Ces protéines anormales sont souvent associées à des désordres neurologiques tels que la maladie d'Alzheimer (Shimizu et al. 2000) ou encore l'épilepsie (Kim et al. 1997, Yamamoto et al. 1998). Par exemple, des études effectuées dans notre laboratoire ont montré que les niveaux de la PIMT étaient réduits d'au moins 50% dans les astrocytomes humains (Lapointe et al. 2005) et dans l'hippocampe de patients atteints d'épilepsie du lobe temporal (Lanthier et al. 2002). Il a aussi été démontré que des souris déficientes en PIMT accumulaient fortement les protéines ayant des résidus L-isoaspartyls dans les fractions cytosoliques du cerveau (Kim et al. 1997). Ces souris PIMT $-/-$ mourraient des suites de crise d'épilepsie montrant ainsi l'importance du rôle de la PIMT au niveau neuronal (Kim et al. 1997, Yamamoto et al. 1998).

Dans notre laboratoire, nous avons réussi à montrer qu'un traitement de 1 h à des concentrations thérapeutiques de VPA, un médicament antiépileptique, stimulait l'expression de la PIMT dans les cellules d'astrocytomes U-87 MG et dans les neuroblastomes SH-SY5Y (Lamarre et Desrosiers, 2008, Cournoyer et Desrosiers 2009). Cette expression par le VPA était régulée par la voie de signalisation ERK/RSK-1/GSK3 β et par la voie de survie PI3K-Akt. Ces observations sont confirmées au niveau de la Figure 3.1 A, car on note une induction du niveau de la

PIMT d'environ 50% lorsque les cellules SH-SY5Y sont traitées avec 1 mM de VPA durant 24 h. Dans cette même figure, on remarque que le fait de traiter les cellules à la roténone (5 et 10 μ M) conduisait à une diminution du niveau de la PIMT. Cette inhibition par la roténone était prévenue lorsque les cellules étaient prétraitées avec le VPA. Ces résultats montrent donc que l'antiépileptique protège contre l'inhibition de l'expression du niveau de la PIMT provoquée par la roténone. Cette protection pourrait être le résultat d'un équilibre entre des mécanismes complémentaires dans l'induction de la PIMT par le VPA et d'autres dans l'inhibition de celle-ci par la roténone. Alternativement, étant donné que le VPA est connu pour induire la PIMT et la roténone pour l'inhiber, on peut supposer que la PIMT induite par le prétraitement des cellules avec le VPA est ensuite inhibée par la roténone, ce qui entraîne un retour du niveau de l'enzyme semblable à celui du contrôle.

En étudiant les résultats présentés dans la Figure 3.1 B, on remarque que le traitement des cellules avec la roténone (5 et 10 μ M) durant 24 h conduit à la mort cellulaire contrairement au traitement avec le VPA (1mM 24 h). Ces résultats s'expliquent par le fait que la roténone est un pesticide naturel connu pour agir avec une grande spécificité comme inhibiteur de la NADH déhydrogénase des mitochondries. Cette inhibition se fait au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire (Radad et al. 2008, Cannon et al. 2009, Drolet et al. 2009). De plus, la roténone qui cause la mort cellulaire par apoptose via la voie mitochondriale bloque les cellules à la phase G₂/M du cycle cellulaire (Amstrong et al. 2001). Dans cette même figure, on observe également que le prétraitement des cellules avec le VPA avant celui de la roténone maintient la viabilité cellulaire. Ce prétraitement permet donc une protection totale contre la mort cellulaire par apoptose induite par la roténone. De plus, étant donné que le VPA active la voie de survie PI3K-Akt (De Sarno et al. 2002, King et al. 2001), on peut expliquer cette protection par le fait que Akt phosphoryle et inactive GSK3 via la voie de PI3K. Ainsi, l'activation de PI3K ou l'inhibition de l'activité de GSK3 protégerait contre l'apoptose induite par la roténone

(De Sarno et al. 2002 et Gottlicher et al. 2001). Un prétraitement des cellules avec le VPA permettrait donc aux cellules de continuer leur cycle cellulaire. Ainsi, tous ces phénomènes contribueraient à la neuroprotection des cellules par le VPA.

Le VPA est connu pour avoir un potentiel neuroprotecteur contre l'induction de l'apoptose par la roténone dans les neuroblastomes SH-SY5Y (Tianhong et al. 2005). Cette protection se fait via l'inhibition du relâchement du cytochrome c et via la diminution de la production des caspases 3 et 9. Nos analyses par Western blot ont confirmé que le VPA jouait en parti un rôle protecteur contre l'apoptose. En effet, l'analyse par Western blot en Figure 3.2 A montre que la roténone conduit à une augmentation du niveau de la protéine p53, de la caspase 3 et une diminution de celui de Bcl-xL. De plus, dans cette même figure, on observe un retour au niveau des contrôles de l'expression de Bcl-xL, de p53 et de la caspase 3 lorsque les cellules sont prétraitées avec 1 mM de VPA. Une étude a montré qu'un traitement des cellules TPC-1 avec la roténone causait une augmentation du niveau de p53 et sa phosphorylation à la serine 15 conduisant à une accumulation de p53 au niveau du noyau (Jimenez et al. 1999). Les résultats obtenus dans la Figure 3.2 A suggèrent donc que le VPA protège contre l'induction de l'apoptose par la roténone au niveau des protéines apoptotiques. Étant donné que le VPA est connu pour induire la PIMT, il est normal que l'on observe en sa présence une diminution du niveau de la protéine proapoptotique p53 et une augmentation du niveau de la protéine antiapoptotique Bcl-xL. En effet, il est connu que l'effet protecteur de la PIMT contre l'apoptose est médié en partie via la modulation de la déamidation de Bcl-xL (Cimmino et al. 2008). Cette équipe a réussi à montrer que les protéines isomérisées augmentaient de manière significative dans les cellules, conduisant à une apoptose induite par un stress oxydatif. Étant donné que Bcl-xL subit une déamidation lorsque les cellules sont confrontées à des dommages, cela donne naissance à son dérivé isoaspartyl. De plus, cette déamidation a une forte implication sur le rôle antiapoptotique de Bcl-xL (Cimmino et al. 2008). En effet, il a été précédemment rapporté dans la littérature que

la déamidation de Bcl-xL était critique dans la voie de signalisation conduisant à l'apoptose suite à des lésions de l'ADN. Cette déamidation induit une modification structurelle profonde, empêchant la fonction antiapoptotique de Bcl-xL. La PIMT serait selon cette étude impliquée dans la modulation de l'apoptose, en régulant l'équilibre dans la cellule entre la forme de Bcl-xL contenant le résidu isoaspartyl anormal et la forme de Bcl-xL contenant l'aspartyl réparé (Cimmino et al. 2008). D'autre part, une autre publication a montré que la PIMT supprimait l'activité transcriptionnelle de p53, une protéine proapoptotique, à travers la déstabilisation de celle-ci, en améliorant l'interaction p53-HDM2. Cela conduit à l'inhibition de l'expression des gènes cibles de p53 en période de stress génotoxique (Lee et al. 2012). Cette inhibition protège donc les cellules cancéreuses contre l'apoptose. De plus, la PIMT méthyle les résidus isosapartyls 29 et 30 de p53, méthylation qui est requise afin de réguler l'activité de p53 de manière négative. Cette équipe a aussi réussi à montrer que la PIMT perturbait la réponse de p53 suite aux dommages de l'ADN. L'enzyme bloquerait alors la fonction de supresseur de tumeur de p53 en modulant son activité (Lee et al. 2012). Toutes ces études qui mettent en évidence les substrats de la PIMT impliqués dans l'apoptose utilisés dans cette étude, soient p53 et Bcl-xL, viennent confirmer le potentiel neuroprotecteur de cette enzyme induite par le VPA. Dans la Figure 3.2 B, on remarque une augmentation de l'activité de la caspase 3 en présence de roténone qui est régulée à la baisse lorsque les cellules sont prétraitées avec le VPA. Ces résultats concordent donc avec ceux de la littérature qui stipulent que le VPA a un potentiel protecteur contre l'apoptose induite par la roténone en diminuant la production de caspase 3 et 9 (Tianhong et al. 2005).

La Figure 3.3 démontre clairement l'importance de la PIMT induite par le VPA dans la protection contre la mort cellulaire par apoptose. On remarque qu'une transfection des cellules SH-SY5Y avec un ARNi dirigé contre la PIMT conduit à une inhibition du niveau de l'enzyme d'environ 90%. De plus, l'étude de l'activité de la caspase 3 montre que celle-ci augmente grandement lorsque les cellules

transfectées avec l'ARNi dirigé contre la PIMT sont traitées à la roténone comparativement aux cellules transfectées avec un ARNi contrôle traitées dans les mêmes conditions. Ces résultats indiquent donc que la PIMT joue un rôle majeur dans la protection des neuroblastomes contre l'induction de l'apoptose par la roténone. En outre, même en absence de roténone, lorsque les cellules sont traitées avec un ARNi dirigé contre la PIMT, on remarque une stimulation significative de l'activité de la caspase 3 comparativement aux cellules traitées avec l'ARNi contrôle dans les mêmes conditions. Ces résultats s'expliquent par le fait que la PIMT joue un rôle protecteur dans le processus d'apoptose. En effet, certaines études ont montré que la surexpression de l'enzyme protégeait les cellules contre l'apoptose causée par le stress oxydatif au H_2O_2 tandis que son inhibition conduisait à l'effet inverse (Cimmino et al. 2008). D'autres études ont démontré aussi que la PIMT bloquait la formation des ROS, suggérant ainsi une fonction antioxydante de l'enzyme (Huebscher et al. 1999, Fanélus et Desrosiers, 2008). De plus, la PIMT serait capable de protéger les cellules contre des niveaux élevés de la protéine proapoptotique Bax (Huebscher et al. 1999).

Dans le but d'investiguer plus en détails l'importance de la PIMT dans la protection contre l'apoptose, une série d'expériences complémentaires à celles sur l'impact que pouvait avoir l'inhibition de la PIMT sur l'activité de la caspase 3 a été effectuée. En effet, ces expériences portent sur des traitements de cellules exprimant différentes formes de la PIMT, avec ou sans roténone, comme on peut le voir dans la Figure 3.4. Trois types de cellules SH-SY5Y transfectées chacune avec un plasmide pCMV6 différents ont été utilisés dans cette expérience. Nous avons travaillé avec des cellules SH-SY5Y contrôles ayant été transfectées avec le plasmide pCMV6 vide. Des cellules SH-SY5Y exprimant la forme sauvage de la PIMT (isoforme 1) ou une forme mutée de l'enzyme au niveau de son site catalytique (D83V), la rendant inactive, ont aussi été employées. La Figure 3.4 A représente l'analyse par Western blot de chaque type de cellules traitées ou non avec 10 μ M de roténone. Dans cette figure, on remarque que le niveau de la PIMT est entre 2 à 4 fois plus faible dans les

cellules contrôles transfectées avec le plasmide vide comparativement aux cellules exprimant la forme sauvage ou mutée de la PIMT. Ces résultats s'expliquent par le fait que les cellules contrôles n'expriment en leur sein que la PIMT endogène. De plus, dans le but de comprendre l'impact des traitements des cellules exprimant différentes formes de la PIMT sur l'activité des caspases 3 et 9, celles-ci ont été mesurées dans les Figures 3.4 B et C respectivement. Rappelons que la caspase 3 est l'une des caspases effectrices de l'apoptose (Chowdhury et al. 2008) et que la caspase 9 est impliquée dans l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose (Garido et al. 2006). Ainsi, on constate que les profils obtenus pour les caspases 3 et 9 sont similaires, avec pour seule différence l'échelle. Dans un premier temps, ces figures montrent que la roténone induit une augmentation de l'activité des caspases quelles que soient les conditions ou le type cellulaire utilisé comparativement aux traitements contrôles. Ces résultats sont donc en accord avec les précédents qui montrent l'induction de l'apoptose par ce produit toxique via l'augmentation de l'activité de la caspase 3. Dans la Figure 3.4 C on observe que la roténone induit l'apoptose par la voie mitochondriale, car le traitement des cellules avec ce produit augmente l'activité de la caspase 9. Cette induction se fait via l'inhibition de la NADH déshydrogénase des mitochondries au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire (Radad et al. 2008, Cannon et al. 2009). Ensuite, on observe que l'activité des deux caspases est beaucoup plus élevée lorsque les cellules transfectées avec le plasmide vide ou le plasmide contenant la forme mutée de la PIMT respectivement sont traitées à la roténone. On peut alors expliquer l'augmentation de cette activité par le fait que les cellules contrôles ne possèdent pas le gène de la PIMT et que dans les cellules qui expriment la forme mutée de l'enzyme, l'activité catalytique de celle-ci est inexistante. Cette mutation empêche donc l'action protectrice de la PIMT contre l'activation des caspases prouvant ainsi l'importance d'une activité catalytique de l'enzyme. De plus, que ce soit dans le profil d'activité de la caspase 3 ou dans celui de la caspase 9, on observe une diminution significative de l'activité de ces caspases lorsque les cellules qui expriment la forme sauvage de l'isoforme I de la PIMT sont

traitées avec la roténone. Ces résultats viennent donc appuyer l'hypothèse stipulant que la PIMT aurait une activité catalytique antiapoptotique. En effet, la surexpression de la forme sauvage de l'enzyme dans les neuroblastomes leur confère une résistance à l'apoptose induite par la roténone, contrairement aux conditions avec les SH-SY5Y transfectées avec un plasmide vide ou exprimant une forme mutée de la PIMT la rendant inactive. On observe que les niveaux d'activité des caspases varient d'une expérience à l'autre, cela est probablement dû à la transfection des cellules avec soit des ARNi ou avec des plasmides contenant la forme sauvage ou mutée de la PIMT.

Les résultats précédents concordent avec ceux de la littérature qui affirment que la PIMT dans sa forme active protège contre l'action apoptotique du stress oxydatif dans les cellules endothéliales (Cimmino et al. 2008). Il est aussi connu que la PIMT est capable de protéger les cellules contre des niveaux élevés d'induction de protéines proapoptotiques comme Bax (Huebscher et al. 1999). De plus, la surexpression de l'enzyme chez *Escherichia Coli* ou chez *Drosophila Melanogaster* augmente la survie des cellules exposées à un stress thermique (Kindrachuk et al. 2003, Chen et al. 2010). Une publication sur l'implication de la PIMT dans le diabète a aussi montré que le fait de surexprimer l'enzyme augmentait de manière significative la viabilité cellulaire et atténuait l'induction de l'apoptose par les lipoprotéines sanguines glycosylées (gly-LDL). Par contre, les traitements utilisant des ARNi dirigés contre la PIMT montraient des effets opposés (Xiao-li et al. 2013). En effet, les cellules traitées avec l'ARNi dirigé contre la PIMT suivi de gly-LDL présentaient un taux élevé de p53 contrairement à celles qui avaient une surexpression de la PIMT active. Ces dernières présentaient une diminution du niveau de p53 en présence de gly-LDL (Xiao-li et al. 2013). Cela veut donc dire que la surexpression de la PIMT active supprime l'activité transcriptionnelle de p53, conduisant ainsi à l'inhibition de l'expression de ses gènes cibles (Lee et al. 2012) et protégeant les cellules contre l'apoptose. Étant donné que la PIMT perturbe la réponse

de p53 suite aux dommages de l'ADN, il a été démontré que l'enzyme bloquait la fonction de supresseur de tumeur de p53 en modulant son activité (Lee et al. 2012).

CONCLUSION

Le vieillissement des protéines peut conduire à l'altération de leur fonction, causant une accumulation de résidus L-isoaspartyls dans les protéines. La PIMT est une enzyme de réparation qui empêche cette accumulation. Cette dernière prévient le vieillissement prématuré des protéines tout en assurant l'intégrité fonctionnelle de celles-ci. Il a été précédemment démontré dans notre laboratoire que la PIMT était induite par le VPA par la voie GSk3-/RSK-1/ β caténine, et par la voie de survie cellulaire PI3K-Akt. Il a aussi été vu que la PIMT permettait de protéger contre l'apoptose induite par le stress oxydatif (Cimmino et al. 2008) et par l'induction de l'apoptose par les gly-LDL (Xhiao-li et al. 2013). Nous avons réussi à montrer, dans cette étude, que le VPA protégeait contre l'action inhibitrice et toxique de la roténone au niveau de l'induction de protéines apoptotiques p53 et caspase 3. Ensuite, nous avons prouvé que la PIMT était importante pour la protection contre l'induction de l'activité caspase 3. De plus, la surexpression de l'enzyme protégeait contre l'activité de la caspase 3, une caspase effectrice de l'apoptose et de la caspase 9 qui joue un rôle essentiel dans la régulation de l'apoptose par la voie mitochondriale. Étant donné les différentes découvertes concernant les propriétés antiapoptotiques de la PIMT et son rôle dans le bon fonctionnement neuronal, il serait nécessaire d'approfondir les recherches sur les différents mécanismes qui régulent cette protection. Pour cela, il faudra pousser la recherche afin de trouver de nouveaux substrats de la PIMT impliqués dans l'apoptose. Ainsi, l'on effectuerait un pas de plus vers la découverte d'une cure des maladies neurodégénératives comme celles d'Alzheimer ou de Parkinson, et l'on comprendrait un peu plus le rôle de la PIMT dans le développement et la progression des cancers.

BIBLIOGRAPHIE

- Amstrong, J.S., Hornung, B., Lecane, P., Jones, D.P., Knox, S.J. 2001. « Rotenone-induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in a human B lymphoma cell line PW». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 289, p. 973-78.
- Aswad, D.W. 1984. «Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by protein carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25 Evidence for methylation at the alpha-carboxyl group of atypical L-isoaspartyl residues». *J. Biol. Chem.*, vol. 259, p. 10714-21.
- Aswad, D.W. 1995. «Purification and properties of protein L-isoaspartyl methyltransferase». In *Deamidation and isoaspartates formation in peptides and proteins* sous la dir. de D.W., Aswad (ed) p.31-46 Boca Raton (FL) CRC Press.
- Aswad, D.W., Deight, E.A. 1983. «Purification and characterization of two distinct isozymes of protein carboxymethylase from bovine brain». *J. Neurochem.*, vol. 40, p. 1718-26.
- Axelrod, J., Daly, J. 1965. «Pituitary gland: enzymic formation of methanol from S-adenosylmethionine». *Science*, vol. 150, p. 181-94.
- Barten, D.M., R.F., O'Dea. 1990. «The Function of protein carboxyl méthyltransferase in eucaryotic cells». *Life Sci.*, vol. 47, p.181-94.
- Bennett, E.J., Bjerregaard, J.J., Knapp, E., Chavous, D.A., Friedman, A.M., Royer Jr, W.E., O'Connor, C.M. 2003. «Catalytic implications from the *Drosophila*

- protein L-isoaspartyl methyltransferase structure and site directed mutagenesis». *Biochemistry*, vol. 42, p. 12844-853.
- Boisvert, F.M, Coté, J.M., Boulanger, C., Richard, S. 2003. «A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes». *Mol.Cell.Proteomics*, vol. 2 p. 1319-30.
- Boivin, D., Bilodeau, D., Béliveau, R 1995. «Immunochemical characterization of L-isoaspartyl-protein carboxyl methyltransferase from mammalian tissues». *Biochem. J.*, vol. 309, p. 993-98.
- Boivin, D., Gingras, D., Béliveau, R. 1993 «Purification and characterization of a membrane-bound protein carboxyl methyltransferase from rat kidney cortex». *J. Biol. Chem.*, vol. 268, p. 2610-15.
- Borland, M.K., Trimmer, P.A., Rubinstein, J.D., Keeney, P.M., Mohanakumar, K., Liu L., Bennett J.P.Jr. 2008. «Chronic, low-dose rotenone reproduces Lewy neurites found in early stages of Parkinson's disease, reduces mitochondrial movement and slowly kills differentiated SH-SY5Y neural cells». *Mol. Neurodegener.*, vol. 3, p. 3- 21.
- Boulanger, M.C., Miranda, T.B., Clarke, S., Di Fruscio, M., Suter, B., Lasko, P., Richard, S. 2004. «Characterization of the Drosophila protein arginine methyltransferase DART1 and DART4». *Biochem.J.*, vol. 379, p. 283-89.
- Brennan, T.V., Clarke, S. 1995. «Deamidation and isoaspartate formation in model synthetic peptides: the effects of sequence and solution environment». In *Deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins*, sous la dir. de D.W. Aswad (éd.), Boca Raton (FL): CRC Press p. 65-90.

- Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D. H., McMahon, A. P., Sommer, L., Boussadia, O., Kernler, R. 2001 «Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development». *Development*, vol. 8, p. 1253-64.
- Burton, B.S. 1882. «On the propyl derivatives and decomposition products of ethylaceto acetate». *J. of Amer. Chem.*, vol. 3, p. 385-95.
- Campos, V.E., Du, M., Li, Y. 2004. «Increased seizure susceptibility and cortical malformation in β -catenin mutant mice». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 320, p. 606-14.
- Cannon, J.R, Tapias, V., Na, H.M., Honick, A.S., Drolet, R.E., Greenamyre, J.T. 2009. «A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease». *Neurobiol. Dis.*, vol. 34, p. 279-90.
- Chaves, R., Melo, T.Q., D'Unhao, K.L.G., Ferrari, M.F.R. 2013. «Dynein clh1, dynactin and syntaphilin expression in brain areas related to neurodegenerative diseases following exposure to rotenone». *Acta Neurobiol. Exp.*, vol. 73, p. 541-56.
- Chazin, W.J., Kossiakoff, A.A. 1995. «The role of secondary and tertiary structures in intramolecular deamidation of proteins». In *Deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins*, sous la dir. de D.W. Aswad (éd.), Boca Raton (FL): CRC Press, p. 193-206.
- Chen, T., Nayak, N., Majee, S.M., Lowenson, J., Schäfermeyer, K.R. 2010. «Substrates of the Arabidopsis thaliana protein isoaspartyl methyltransferase 1 identified using phage display and biopanning». *J. Biol. Chem.*, vol. 285, p. 37281-292.

- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K. 2008. «Review Caspase-An update». *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 151, part B, p. 10-27.
- Cimmino, A., Capasso, R., Muller, F., Sambri, I., Masella, L., Raimo, M., De Bonis, M.L., D'Angelo, S., Zappia, V., Galletti, P., Ingrosso, D. 2008. «Protein isoaspartate methyltransferase prevents apoptosis induced by oxidative stress in endothelial cells: role of Bcl-xL deamidation and methylation». *PLoS One*, vol. 3, e3258
- Clarke, S. 1985. «Protein carboxyl methyltransferase: two distinct classes of enzymes». *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 61, p. 355-86.
- Clarke, S. 2003. «Aging as war between chemical and biochemical processes: Protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair». *Ageing Res. Rev.*, vol. 2, p. 263-85.
- Cournoyer, P., Desrosiers, R. 2009. «Valproic acid enhances protein L-isoaspartyl methyltransferase expression by stimulating extracellular signal-regulated kinase signaling pathway». *Neuropharm.*, vol. 56, p. 839-48.
- Cueille, N., Blanc, C.T., Riederer, I.M., Riederer, B.M. 2007. «Microtubule-associated protein 1B binds glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase». *J. Proteome Res.*, vol. 6, p. 2640-47.
- D'Angelo, S., Trojsi, F., Salvatore, A., Daniele, L., Raimo, M., Galletti, P., Monsuro, M.R. 2013. «Accumulation of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis». *Neurochem. Intern.*, vol. 63, Issue 6, p. 626-34.
- David, C.L., Szumlanski, C.L., DeVry, C.G., Park-Hah, J.O., Clarke, S. 1997. «Human erythrocyte protein L-isoaspartyl methyltransferase: heritability of

- basal activity and genetic polymorphism for thermal stability». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 346, p. 277-86.
- De Sarno, P., Li, X., Jope, R.S. 2002. «Regulation of Akt and glycogene synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium». *Neuropharm.*, vol. 43, p. 1158-64.
- Desrosiers, R.R., Fanélus, I. 2011. «Damaged proteins bearing L-isoaspartyl residues in aging: a dynamic equilibrium between generation of isomerized forms and repair by PIMT». *Curr. Aging Sci.*, vol.4, p.8-18.
- DeVry, C.G., Tsai, W., Clarke, S. 1996. «Structure of the human gene encoding the protein repair L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 335, p. 321-32.
- DeVry, C.G., Clarke, S. 1999. «Polymorphic forms of the protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase involved in the repair of age-damaged proteins». *Hum. Genet.*, vol. 44, p. 275-88.
- Diliberto, E.J., Axelrod, J. 1974. «Characterization and substrate specificity of a protein carboxymethyltransferase in pituitary gland». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 71, p.1701-04.
- Diliberto, E.J., Axelrod, J. 1976. «Regional and subcellular distribution of protein carboxymethylase in brain and other tissues». *J. Neurochem.*, vol. 26, p. 1159-65.
- Drolet, R.E., Cannon, J.R., Montero, L., Greenamyre, J.T. 2009. «Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology». *Neurobiol. Dis.*, vol. 36, p. 96-102.

- Fanelus, I., Desrosiers, R.R. 2008. « Reactive oxygen species generated by thiol-modifying phenylarsine oxide stimulate the expression of protein L-isoaspartyl methyltransferase». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, vol. 371, p. 203-08.
- Fanelus, I., Desrosiers, R.R. 2013. «Mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide M-chlorophenylhydrazone induces the multimer assembly and activity of repair enzyme protein L-isoaspartyl methyltransferase». *J. Mol. Neurosci.*, vol. 50, p. 411-23.
- Farrar, C., Clarke, S. 2002. «Altered levels of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the brains of L-isoaspartyl (D-Aspartyl) O-methyltransferase-deficient mice». *J. Biol. Chem.*, vol. 277, p. 27856-63.
- Fountoulakis, M., Juranville, J.F., Dierssen, M., Lubec, G. 2002. «Proteomic analysis of the fetal brain». *Proteomics*, vol. 2, p. 1547-76.
- Galleti, P., Ingrosso, D., Manna, C., Clemente, G. Zappia. 1995. «Protein damage and methylation mediated repair in the erythrocyte». *Biochem. J.*, vol. 306, p. 313- 25.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C. Kroemer, G. 2006. «Review Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria». *Cell Death and Differentiation, Nature Publishing Group*, vol.13, p. 1423-33.
- Gingras, D., Ménard, P., Béliveau, R., 1991. «Protein carboxyl methylation in kidney brush border membranes». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1066, p. 261-67.
- Gingras, D., Boivin, D., Bilodeau, D., Pelletier, J., Beliveau, R. 1994. «Les protéines carboxyl méthyltransferase des eucaryotes: deux classes distincts d'enzymes». *Med. Sci.*, vol. 10, p. 55-64.

- Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G., Heinzl, T. 2001. «Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells». *EMBO J.*, vol. 20, p. 6969-78.
- Gould, T.D., Manji, H.K. 2002. «The Wnt signaling pathway in bipolar disorder». *Neuroscientist*, vol. 8, p. 497-511.
- Halic, M., Gartmann, M., Schlenker, O., Mielke, T., Pool, M.R., Sinning, J., Beckmann, R. 2006. «Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site». *Science*, vol. 312, p. 745-47.
- Haliwell, B. 2010. «Free radicals and antioxidant- quo vadis? » *Trends Pharmacol. Sci.*, vol.32, p 125-30.
- Henry, T.R. 2003. «The history of valproate in clinical neuroscience». *Psychopharmacol. Bull.*, vol. 37, p. 5-16.
- Huebscher, K.J., Lee, J., Rovelli, G., Lundin, B., Matus, A., Stauffer D., Furst P. 1999. «Protein isoaspartyl methyltransferase protects from Bax induced apoptosis». *Gene*, vol. 240, p. 333-41.
- Ikegaya, Y., Yamada, M., Fukuda, T., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T., Nishiyama, N. 2001. «Aberrant synaptic transmission in the hippocampal CA3 region and cognitive deterioration in protein-repair enzyme-deficient mice». *Hippocampus*, vol. 2, p. 287-98.
- Ingresso, D., D'Angelo, S., Perna, A F., Iolascon, A., Miraglia del Giudice, E., Penotta, S., Zappia, V., Galletti, P. 1995. «Increased membrane-protein methylation in hereditary spherocytosis. A marker of cytoskeletal disarray». *Eur. J. Biochem.*, vol. 228, p. 894-98.

- Ingrosso, D., Fowler, A., Bleibaum, J., Clarke, S. 1989. «Sequence of the D-aspartyl-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. Common sequence motifs for protein, DNA, RNA, and small molecule S-adenosylmethionine-dependent metnyltransferases». *J. Biol. Chem.*, vol. 264, p. 20131-139.
- Ingrosso, D., D'angelo, S., di Carlo, E., Pema, A F., Zappia, V., Galletti, P. 2000. «Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress». *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, p. 4397-405.
- Jimenez, G.S., Bryntesson, F., Torres-Arzayus, M.I., Priestley, A., Beeche, M., Saito, S., Sakaguchi, K., Apella, E., Jeggo, P.A., Taccioli, G.E., Wahl, G.M., Hubank, M. 1999. « DNA-dependant protein kinase is not required for the p53 dependant response to DNA damage». *Nature*, vol. 400, p. 81-3.
- Johannessen, C.U. 2000. «Mechanisms of action of valproate: a commentary». *Neurochem. Int.*, vol. 37, p. 103-10.
- Johnson, B.A., Freitag, N.E., Aswad, D.W. 1985. «Protein carboxyl methyltransferase selectively modifies an atypical form of calmodulin. Evidence for methylation at deamidated asparagine residues». *J. Biol. Chem.*, vol. 260, p. 10913-16.
- Johnson, B.A, Langmack, E.L., Aswad, D.W. 1987. «Partial repair of deamidation-damaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferase» *J. Biol. Chem.*, vol. 262, p. 12283-287.
- Johnson, B.A., Aswad, D.W. 1995. «Deamidation and isoaspartate formation during in vitro aging of purified proteins». *In Deamidation and isoaspartate*

formation in peptides and proteins, sous la dir. de D.W. Aswad (éd.), p. 91-113. Boca Raton (FL): CRC Press.

- Kharbanda, K.K., Mailliard, M.E., Baldwin, C.R., Sorrell, M.F., Tuma, D.J. 2007. «Accumulation of proteins bearing atypical isoaspartyl residues in livers of alcohol-fed rats is prevented by betaine administration: effects on protein-L-isoaspartyl methyltransferase activity». *J. Hepatol.*, vol. 46, p. 1119-25.
- Kim, E., Lowenson, J.D., MacLaren, D.C., Clarke, S., Young, S.G. 1997. «Deficiency of a protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth, and fatal seizures in mice». *Prot. Natl.Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 94, p. 6132-37.
- Kim, S., Paik, W.K. 1970. «Purification and properties of protein methylase II». *J. Biol. Chem.*, vol. 245 p. 1806-13.
- Kindrachuk, J., Parent, J., Davies, G. F., Dinsmore, M., Attah-Poku, S., Napper, S. 2003. «Overexpression of L-isoaspartate O-methyltransferase in *Escherichia coli* increases heat shock survival by a mechanism independent of methyltransferase activity». *J. Biol. Chem.*, vol. 278, p. 50880-86.
- King, T.D., Bijur, G.N., Jope, R.S. 2001. «Caspase 3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogene synthase kinase-3 beta and attenuated by lithium». *Brain Res.*, vol. 919, p. 106-14.
- Kless, L.J., Parada, L.F. 1999. «Trks: signal transduction and intracellular pathways». *Microsc. Res. Technol.*, vol. 45, p. 210-16.
- Ladino, C.A., O'Connor, C.M. 1992. «Methylation of atypical protein aspartyl residues during the stress response of HeLa cells». *J. Cell. Physiol.*, vol. 153, p. 297-304.

- Lamarre, M., Desrosiers, R.R. 2008. «Up-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase expression by lithium is mediated by glycogen synthase kinase-3 inactivation and b-catenin stabilization». *Neuropharm.*, vol. 55, p 669-76.
- Lanthier, J., Bouthillier, A., Lapointe, M., Demeule, M., Béliveau, R., Desrosiers, R.R. 2002. «Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin». *J. Neurochem.*, vol. 83, p. 581-91.
- Lapointe, M., Lanthier, J., Mouldjian, R., Régina, A., Desrosiers, R.R. 2005. «Expression and activity of L-isoaspartyl methyltransferase decrease in stage progression of human astrocytic tumors». *Brain Res. Mol. Brain Res.*, vol. 135, p. 93-103.
- Lebreton, S., Carraz, G., Meunier, H., Beriel, H. 1964. «Pharmacodynamic properties of 2,2-dipropylacetic acid. 2nd report on its anti-epileptic properties», *Thérapie*, vol. 19, p. 451-45.
- Lee, A.Y., Gooch, J.L., Oesterreich, S., Guler, R.L., Yee, D. 2000. «Insulin-like growth factor I-induced degradation of insulin receptor substrate 1 is mediated by the 26S proteasome and blocked by phosphatidylinositol 3'-kinase inhibitor». *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, p. 1489-96.
- Lee, J.C., Kang, S.U., Jeon, Y., Park, J.W., You, J.S., Ha, S.W., Bae, N., Lubec, G., Kwon, S.H., Lee, J.S., Cho, E.J., Han, J.W. 2012. «Protein L-isoaspartyl methyltransferase regulates p53 activity». *Nature Commun.*, p. 1-10.
- Li, X.N., Shu, Q., Su, J.M., Perlaky, L., Blaney, S.M., Lau, C.C. 2005. «Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by

histone hyperacetylation and regulating expression of p21 Cip1, CDK4, and CMYC». *Mol. Cancer Ther.*, vol. 4, p. 1912-22.

- Lindner, H., Helliger, W. 2001. «Age-dependent deamidation of asparagine residues in proteins». *Exp. Gerontol.*, vol. 36, p. 1551-63.
- Liss, M., Maxam, A.M. 1967. «Methylation of ovalbumine and human serum albumin by a purified enzyme from calf spleen». *Biochem. Biophys. Acta.*, vol. 140, p. 555-57.
- Liss, M., Edelstein, L.M. 1967. «Evidence for the enzymatic methylation of crystalline ovalbumin preparations». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 26, p. 497-504.
- Loscher, W. 1989. «Valproate enhances GABA turnover in the substantia nigra». *Brain Res.*, vol. 501, p. 198-203.
- Lowenson, J.D., Clarke, S. 1992. «Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis». *J. Biol. Chem.*, vol. 267, p. 5985-95.
- Lowenson, J.D., Kim, E., Young, S.G., Clarke, S. 2001. «Limited accumulation of damaged proteins in L-isoaspartyl (O-aspartyl) O-methyltransferase-deficient mice». *J. Biol. Chem.*, vol. 276, p. 20695-702.
- MacLaren, D.C., Kagan, R.M., Clarke, S. 1992. «Alternative splicing of the human isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase RNA leads to the generation of a C-terminal -RDEL sequence in isozyme II». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 185, p. 277-28.

- Mann, D.M. 1985. «The neuropathology of Alzheimer's disease: a review with pathogenetic, aetiological and therapeutic considerations». *Mech. Ageing Dev.*, vol. 31, p. 213-55.
- Melo T., D'unhao A., Martins S., Farizatto K.G., Chaves R., Ferrari M.R. 2012. «Rotenone-dependent changes of anterograde motor protein expression and mitochondrial mobility in brain areas related to neurodegenerative diseases». *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 33, p. 327-35.
- Meunier, H., Carraz, G., Neunier, Y., Eymard, P., Aimard. M. 1963. «Pharmacodynamie properties of N-dipropylacetic acid». *Therapie*, vol. 18, p. 435-38.
- Mizobuchi, M., Murao, K., Takeda, R., Kakimoto, Y. 1994. «Tissue-specific expression of isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase gene in rat brain and testis». *J. Neurochem.*, vol. 62, p. 322-28.
- Mucelli S.P., Odreman F., Gonzales M.L., Gerardi E., Stanta G., Vindigni, A. 2006. «Proteomic studies on the white matter of human brain». *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 833, p. 80-90.
- Ota, L.M., Gilbert, J.M., Clarke, S. 1988. «Two major isozymes of the protein D-aspartyl/L- isoaspartyl methyltransferase from human erythrocytes». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 151, p. 1136-43.
- Paik, W.K., Kim, S. 1990. «Reevaluation of the enzymologie of protein methylation» *In protein methylation*, sous la direction de W.K Paik et S.Kin (ed) Boca Ranton (FL):CRC Press, p. 22-31.

- Pallapati, P., Averill Bates, D.A. 2011. «Activation of ER stress and apoptosis by hydrogen peroxide in HeLa cells: Protective role of mild heat preconditioning at 40 °C». *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 1813, Issue 12, p. 1987-99.
- Perucca, E. 2002. «Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience». *CNS Drugs*, vol. 16, p. 695-714.
- Pragathi.P, Averill-Bates, D.A. 2011. «Reactive oxygen species, cell death signaling and apoptosis», *Nova science*, vol. 2, p.1-40.
- Paoli, P., Giannoni, E., Chiarugi, P. 2013. «Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression» . *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 1833, Issue 12, p. 3481-98.
- Potter, S.M., Johnson, B.A., Henschen, A., Aswad, D.W., Guzzetta, A.W. 1992. «The type II isoform of bovine brain protein L-isoaspartyl methyltransferase has an endoplasmic reticulum retention signal (...RDEL) at its C-terminus». *Biochemistry*, vol. 31, p. 6339-47.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., Greenwood, M.T. 2001. «Anti apoptosis and cell survival: A review». *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 1813, p. 238-59.
- Radad K., Gille, G., Rausch, W.D. 2008. «Dopaminergic neurons are preferentially sensitive to long-term rotenone toxicity in primary cell culture». *Toxicol. In Vitro*, vol. 22, p. 68-74.
- Riederer, B.M. 2007. «Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein». *Brain Res. Bull.*, vol. 71, p. 541-58.

- Reissner, K.J., Aswad, D.W. 2003. «Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signalisation». *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 60, p. 1281-95.
- Robinson, N.E., Robinson, A.B. 2004. «Amide molecular clocks in drosophila proteins : potential regulators of aging and other processes». *Mech. Ageing Dev.*, vol. 125, p. 259-67.
- Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Wolkow, C., Wang, R., Cotter, R.J., Reardon, I.M., Zurcher, N.H., Heinrikson, R.L., Bail, M.J., Greenberg, R.D. 1993. «Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease». *J. Biol. Chem.*, vol. 268, p. 3072-83.
- Ryttersgaard, C., Griffith, S.C., Sawaya, M.R., MacLaren, D.C., Clarke, S., Yeates, T.O. 2002. «Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase». *J. Biol. Chem.*, vol. 277, p. 10642-46.
- Saido, T.C., Toyoshima, S., Osawa, T. 1987. «Protein-O-carboxyl methyltransferase from cytosol and membranes of chicken erythrocytes». *J. Biochem.*, vol. 102, p. 319-26.
- Sellinger, O.Z., Kramer, C.M. 1988. «The carboxymethylation of membrane-bound proteins in the aging rat brain». *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 231, p. 269-80.
- Shimizu, T., Watanabe, A., Ogawara, M., Mori, H., Shirasawa, T. 2000. «Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol.381, p. 225-34.

- Shimuzu, T., Ikegami, T., Ogawara, M., Suzuki, Y., Takahashi, M., Morio, H., Shirasawa, T. 2002. «Transgenic expression of protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) gene in the brain rescues mice from fatal epilepsy of PIMT deficiency». *J. Neurosci. Res.*, vol. 69, p. 341-52.
- Shimuzu, T., Matsuoka, Y., Shirasawa, T. 2005. «Biological significance of isoaspartate and its repair system». *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, p.1590-96.
- Shirasawa, T., Endoh, R., Zeng, Y.X., Sakamoto, K., Mori, H. 1995. «Protein L-isoaspartyl methyltransferase: developmentally regulated gene expression and protein localization in the central nervous system of aged rat». *Neurosci.* vol. 188, p. 37-40.
- Skinner, M.M., Puvathingal, J.M., Walter, R.L., Friedman, A.M. 2000. «Crystal Structure of Protein Isoaspartyl Methyltransferase: A Catalyst for Protein Repair». *Structure*, vol. 8, Issue 11, p. 1189-201.
- Smith, C.D., Carson, M., Friedman, A.M., Skinner, M.M., Delucas, L., Chantalat, L., Weise, L., Shirasawa, T., Chatopadhyay, D. 2002. «Crystal structure of human 72 L-isoaspartyl-O-methyl-transferase with S-adenosyl homocysteine at 1.6-Å resolution and modeling of an isoaspartyl-containing peptide at the active site». *Protein Sci.*, vol. 2, p. 625-35.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Terwel, D., Vandezande, K., Lasrado, R., Bruynseels, K., Irizarry, M., Verhoye, M., Van Lint, J., Vandenheede, J.R., Ashton, D., Mercken, M., Loos, R., Hyman, B., Van der Linden, A., Geerts, H., Van Leuven, F. 2002. «Neonatal neuronal overexpression of glycogen synthasekinase-3 beta reduces brain size in transgenic mice». *Neuroscience*, vol. 4, p. 797-808.

- Srivastava, P., Panda, D. 2007. «Rotenone inhibits mammalian cell proliferation by inhibiting microtubule assembly through tubulin binding». *FEBS J.*, vol. 274, p.4788-801.
- Stock, J. 1990. «Role of protein carboxyl-methyltransferase in bacterial chemotaxis». *In protein methylation*, sous la dir W.K Paik et S.Kim Boca Raton (FL) CRC Press, p. 275-84.
- Tianhong, P., Xinqun, L., Wenjie, X., Joseph, J., Weidong, L. 2005. «Valproic acid-mediated Hsp70 induction and anti-apoptotic neuroprotection in SH-SY5Y cells». *FEBS L.*, vol.519, p. 6716-20.
- Tsai, W., Clarke, S. 1994. «Amino acid polymorphisms of the human L-isoaspartyl/D-aspartyl methyltransferase involved in protein repair». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 203, p. 491-97.
- Van den Berg, R.J., Kok, P., Voskuyl, R.A. 1993. «Valproate and sodium currents in cultured hippocampal neurons». *Exp. Brain Res.*, vol. 93, p. 279-87.
- Watanabe, A., Takio, K., Thara, Y. 1999. «Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments: unusual properties of the microtubule binding domain of tau». *J. Biol. Chem.*, vol. 274, p. 7368-78.
- Xiao-li, L., Bao-ying, L., Mei, C., Fei, Y., Wen-bin, Y., Qian, C., Zhen, Z., Jian-hua, Z., Jun-fu, W., Rui-hai, Z., Hai-qing, G. 2013. « PIMT prevents the apoptosis of endothelial Cells in response to glycated low density lipoproteins and protective effects of grape seed procyanidin B2». *Plos One.*, vol 8, e69979

- Xie, H., Clarke, S. 1994. «An enzymatique activity in bovin brain that catalyzes the reversal of the Cterminal methyl esterification of protein phosphatade 2A». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 203, p. 1710-15.
- Yamamoto, A., Takagi, H., Kitamura, D. 1998. «Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy». *J. Neurosci.*, vol. 18, p. 2063-74.
- Yamamoto, A., Takagi, H., Kitamura, D., Tatsuoka, H., Nakano, H., Kawano, H., Kuroyanagi, H., Yahagi, Y., Kobayashi, S., Koizumi, K., Sakai, T, Saito, K., Chiba, T., Kawamura, K., Suzuki, K., Watanabe, T, Mori, H., Shirasawa, T. 1998. «Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy». *J. Neurosci.*, vol. 18, p. 2063-74.
- Youle, R.J., Strasser, A., Review. 2008. «The BcL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death». *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, vol. 9, p 47-59.