

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'AGENT ANTICONVULSIVANT VALPROATE
STIMULE L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE L-ISOASPARTYL
MÉTHYLTRANSFÉRASE VIA LA VOIE DE ERK

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
PHILIPPE COURNOYER

DÉCEMBRE 2008

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 d'abord à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance au Dr. Richard Desrosiers, mon directeur de recherche, d'une part, pour la confiance qu'il m'a accordée dès mon arrivée dans le laboratoire, mais également pour ses multiples conseils, pour sa grande disponibilité, pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche, pour son engouement face à la science qu'il m'a transmis, pour son soutien, pour sa discipline ainsi que pour sa rigueur scientifique qui, somme toute, m'ont servi d'inspiration au cours de ma maîtrise.

J'aimerais aussi remercier mes collègues de laboratoire Irvens Fanélus et Mélanie Lamarre pour leurs conseils techniques qu'ils ont pu me prodiguer au cours de ces deux dernières années.

Également, je remercie profondément Richard, Hélène, Mélissa, Rolande et Miles qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de mes études ainsi que pour leur compréhension et leur soutien moral.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vi
RÉSUMÉ.....	viii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Les méthyltransférases.....	1
1.2 La protéine L-isoaspartyl méthyltransférase (PIMT).....	2
1.2.1 Historique.....	2
1.2.2 Caractéristiques.....	4
1.2.3 Formation des résidus aspartates anormaux.....	6
1.2.4 Réparation des résidus L-isoaspartates par la PIMT.....	10
1.2.5 Rôles et implications biologiques de la PIMT.....	14
1.2.6 Régulation de la PIMT.....	17
1.3 L'acide valproïque.....	19
1.3.1 Historique et propriétés.....	19
1.3.2 Cibles d'action.....	20
1.3.2.1 Neurotransmission.....	20
1.3.2.2 HDACs.....	22
1.3.2.3 GSK-3 et la voie Wnt/ β -caténine.....	23
1.3.2.4 Voie de ERK.....	24
1.4 Objectifs de la recherche.....	30
CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	31
2.1 Matériels.....	31

2.2	Méthodes.....	32
2.2.1	Culture cellulaire.....	32
2.2.2	Traitements des cellules avec différents inhibiteurs.....	32
2.2.3	Transfection des cellules avec un siRNA contre RSK-1.....	32
2.2.4	Lyse cellulaire.....	33
2.2.5	Électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.....	33
2.2.6	Immunodétection des protéines.....	34
2.2.7	Activité méthyltransférase.....	35
2.2.8	Analyses statistiques.....	35
CHAPITRE III		
	RÉSULTATS.....	36
3.1	Cinétique de l'expression de la PIMT en présence d'une concentration thérapeutique d'acide valproïque.....	36
3.2	L'acide valproïque stimule l'expression de la PIMT dans deux lignées de tumeurs cérébrales.....	37
3.3	L'acide valproïque augmente l'activité méthyltransférase dans les U-87MG et les SH-SY5Y.....	37
3.4	L'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque est régit par la voie de signalisation ERK.....	38
3.5	L'activation de RSK-1 par l'acide valproïque dans les U87MG et les SH-SY5Y inhibe GSK-3 β et stimule l'expression de la PIMT.....	39
3.6	L'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque via GSK-3 β / β -caténine requiert RSK-1.....	41
CHAPITRE IV		
	DISCUSSION.....	55
	CONCLUSION.....	60
	BIBLIOGRAPHIE.....	61

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Mécanismes de formation de résidus isoaspartates provenant des acides aminés asparagines ou aspartates des protéines.....	7
1.2 Configuration des résidus aspartates reconnus ou non par la PIMT.....	10
1.3 Mécanisme de réparation des protéines par la PIMT.....	11
1.4 Vue d'ensemble de la structure cristalline de la PIMT humaine.....	13
1.5 Structure chimique de l'acide valproïque.....	19
1.6 L'acide valproïque est un inhibiteur direct des HDACs.....	22
1.7 Représentation schématique de la voie de Wnt.....	23
1.8 Résumé de la cascade de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK	25
1.9 Structure des différents domaines des isoformes de la protéine RSK	27
1.10 Mécanisme d'activation de la protéine RSK	28
3.1 Cinétique de l'expression de la PIMT en présence d'une concentration thérapeutique d'acide valproïque.....	43
3.2 L'acide valproïque stimule l'expression de la PIMT dans deux lignées de tumeurs cérébrales humaines.....	44
3.3 L'acide valproïque augmente l'activité méthyltransférase dans les U-87MG et les SH-SY5Y.....	45
3.4 L'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque est dépendante de la voie de signalisation ERK.....	46
3.5 L'activation de RSK1 par l'acide valproïque dans les U-87MG et les SH-SY5Y inhibe GSK-3 β et stimule l'expression de la PIMT.....	48
3.6 L'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque via GSK-3 β / β -caténine requiert RSK-1.....	51
3.7 Représentation schématique des voies de signalisation responsables de l'induction de la PIMT par l'acide valproïque.....	54

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH	Adrénocorticotrope
AdoMet	S-adénosyl-L-méthionine
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt/PKB	Akt/Protéine-kinase B
ANOVA	One-way analysis of variance
APP	Amyloid precursor protein
APS	Persulfate d'ammonium
ARE	<i>Antioxydant response element</i>
ARN	Acide ribonucléique
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BS	Sérum bovin
BSA	Albumine sérique bovine
CamK	<i>Kinases dépendante de Ca⁺⁺/calmodulin (Ca⁺⁺/calmodulin-dependent kinases)</i>
CBZ	Carbamazépine
CRE	<i>Cyclic AMP response element</i>
CTK	Domaine kinase C-terminal
DSIP-isoD	Delta-Sleep-Inducing peptide isomérisé
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
ECL	Enhanced chemiluminescence
EGF	Epidermal growth factor
ERE	Estrogen response element
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Sérum bovin fœtal
FHP	Filaments hélicaux pairés
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GAP-43	Growth cone-associated protein
GSK-3	Glycogen synthase kinase-3

HDACs	Histone deacetylase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MEM	Minimum Essential Medium
NGF	Nerve growth factor
NTK	Domaine kinase N-terminal
PBS	Solution saline phosphate tamponnée
PDK1	Protein 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIMT	Protéine-L-isoaspartate (D-aspartate)-méthyltransférase
PNF	Plaques neurofibrillaires
PVDF	Fluorure de polyvinylidène
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RSK-1	<i>Ribosomal S6 kinase-1</i>
SAM	S-adénosyl-L-méthionine
SAH	S-adénosyl-L-homocystéine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
t-BHP	t-butyl hydroperoxyde
TBS	Tampon Tris salin
TCF/LEF	T-Cell factor/Lymphoid enhancer factor
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TSA	Trichostatin A
UVA	Rayons ultraviolets A
VPA	Acide valproïque
XRE	Xenobiotic response element

RÉSUMÉ

Les protéines subissent progressivement des modifications post-traductionnelles non-enzymatiques au cours du vieillissement ou dans certains états pathologiques. La protéine-L-isoaspartyl méthyltransférase (PIMT) est une enzyme qui reconnaît et répare les résidus anormaux L-isoaspartyl des protéines. Récemment, il a été démontré dans notre laboratoire que l'expression de la PIMT est stimulée par l'acide valproïque, un médicament anti-épileptique, via la voie de signalisation glycogène-synthase-kinase-3 (GSK-3)/ β -caténine. Dans cette étude, afin d'acquérir de nouvelles informations sur les voies de signalisation activées par l'acide valproïque régulant le niveau d'expression de la PIMT, les cellules d'astrocytome U-87 MG et de neuroblastome SH-SY5Y ont été traitées avec le médicament pour étudier l'implication de la voie de *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) dans l'induction de la PIMT. Les résultats montrent que l'acide valproïque augmente la phosphorylation de ERK1/2 sur Thr202/Tyr204 et sur Thr185/Tyr187, respectivement. Des inhibiteurs pharmacologiques contre les kinases Src, c-Raf, MEK1/2 et ERK1/2 suppriment la phosphorylation de ERK1/2 stimulée par l'acide valproïque empêchant ainsi l'induction de la PIMT par le médicament. En outre, l'inhibition de MEK1/2 par U0126 bloque l'augmentation de la phosphorylation de RSK-1 au niveau des résidus Thr359/Ser363 et de la phosphorylation de GSK-3 β sur la Ser9 ainsi que la stimulation de l'expression de RSK-1, de β -caténine et de la PIMT suite au traitement avec l'acide valproïque. L'abolition de RSK-1 par ARN interférant abroge l'induction de l'expression de RSK-1, de β -caténine et de la PIMT ainsi que l'augmentation des niveaux de phosphorylation de RSK-1 et de GSK-3 β dépendants de l'acide valproïque. Ainsi, nos résultats démontrent que l'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque requiert l'activation de la voie de ERK1/2 incluant RSK-1 qui est responsable de l'inactivation de GSK-3 et en occurrence, la stabilisation de la β -caténine.

Mots clés: Protéine L-isoaspartyl méthyltransférase, acide valproïque, épilepsie; voie de signalisation ERK1/2, RSK-1, GSK-3; β -caténine.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les méthyltransférases

Dans une grande variété de types cellulaires allant des procaryotes aux eucaryotes, les modifications post-traductionnelles que subissent les protéines constituent un des éléments importants au cours de leur maturation. La méthylation est une modification post-traductionnelle catalysée par des méthyltransférases dépendantes de la S-adenosyl-L-méthionine (AdoMet), un donneur de groupements méthyles. L'ADN, l'ARN et les protéines constituent des substrats pour les méthyltransférases. Celles qui méthylent les protéines comprennent les protéine-*N*-méthyltransférases et les protéine-carboxyle-méthyltransférases.

Les protéine-*N*-méthyltransférases méthylent les groupements amines de certains acides aminés dont les résidus arginines et lysines (Paik et Kim, 1990). La méthylation par ces enzymes est impliquée dans plusieurs fonctions dont la régulation de la transcription, les interactions entre les protéines, la signalisation cellulaire et la localisation intracellulaire de certaines protéines (Boisvert *et al.*, 2003). Les protéine-*N*-méthyltransférases modifient notamment les histones, les protéines ribonucléaires et les protéines basiques de la myéline (Boulanger *et al.*, 2004).

Les protéine-carboxyle-méthyltransférases catalysent des réactions de méthylation sur les groupements carboxyles libres des acides aminés. Il existe quatre groupes de protéine-carboxyle-méthyltransférases et elles sont classées en fonction de la nature du résidu modifié. La première classe comprend les L-glutamyl-méthyltransférases retrouvées seulement dans les bactéries. Elles jouent un rôle important pour la méthylation des résidus glutamates des protéines chimioréceptrices (Stock, 1990). La seconde catégorie comprend les L-isoaspartyl-méthyltransférases impliquées dans la méthylation des résidus L-isoaspartates anormaux des protéines (Galletti *et al.*, 1995).

La troisième classe est composée des isoprényl-L-cystéine-méthyltransférases. Celles-ci se retrouvent exclusivement dans la membrane cellulaire et méthylent les résidus cystéines isoprénylés en position C-terminale des protéines (Gingras *et al.*, 1994b). Cette réaction de méthylation est considérée comme une étape intermédiaire dans l'ancrage membranaire de protéines prénylées (Clarke, 1992). La quatrième classe, les protéine-leucines-méthyltransférases, catalysent la méthylation du groupement α -carboxyle des résidus leucines C-terminaux de protéines cytosoliques (Xie et Clarke, 1994). Dans ce mémoire, la protéine-L-isoaspartyl-méthyltransférase (PIMT) appartenant à la seconde classe sera le sujet de ce travail.

1.2 La protéine L-isoaspartyl méthyltransférase

1.2.1 Historique

En 1965, Axelrod et Daly découvrirent, dans des extraits hypophysaires, la PIMT et l'ont alors nommée «enzyme produisant du méthanol». Effectivement, lorsque l'AdoMet radioactive a été ajoutée aux extraits d'hypophyse, une production de méthanol radioactif fut observée, fournissant ainsi un mécanisme démontrant la production *in vivo* de méthanol. Néanmoins, l'implication de la méthylation des protéines comme étape intermédiaire dans le processus était toujours ignorée (Axelrod et Daly, 1965). Deux ans plus tard, le groupe de Liss rapportait que la méthylation de l'ovalbumine et de l'albumine de sérum humain était dépendante de l'AdoMet dans des tissus de rats (Liss et Edelstein, 1967; Liss et Maxam, 1967). Toutefois, ce n'est que dans une publication subséquente que l'équipe de Liss a établi que les produits volatils suite à la méthylation étaient du méthanol (Liss, Maxam et Cuprak, 1969), sans jamais faire de rapprochement avec les travaux d'Axelrod et de Daly. En 1970, le groupe de Kim et Paik rapporta la purification, à partir de thymus de rats, d'une enzyme de méthylation dépendante de l'AdoMet qu'ils nommèrent protéine-méthylase-II (Kim et Paik, 1970). Kim démontra également que la protéine-méthylase-II était aussi présente dans l'hypophyse et, une fois purifiée, elle correspondait à l'enzyme générant du méthanol (Kim, 1973). Cette méthylase II, était capable de modifier, avec différents degrés d'efficacité, une grande

variété de protéines tout en produisant du méthanol. Toutefois, ce n'est qu'en 1973 qu'un consensus a été fondé associant ainsi l'enzyme étudiée par le groupe de Liss et la méthylase II de Kim et Paik à l'enzyme trouvée par Axelrod et Daly. De plus, en 1973, Morin et Liss découvrirent que l'hypophyse contenait une enzyme qui, sous des conditions alcalines, méthyle les groupements carboxyles des protéines et génèrent du méthanol (Morin et Liss, 1973). L'équipe de Diliberto et Axelrod démontrèrent l'existence d'une protéine-carboxyl-méthyltransférase dans l'hypophyse qui méthyle plusieurs hormones de l'hypophyse antérieure et que celles-ci étaient des substrats deux fois plus efficaces que l'ovalbumine (Diliberto et Axelrod, 1974).

Durant les dix années qui suivirent, plus d'une soixantaine d'articles portant sur les propriétés et les fonctions possibles de la protéine carboxyle méthyltransférase chez les eucaryotes ont été publiés. Certaines études ont suggéré un rôle pour cette protéine dans le relargage du contenu des vésicules, l'entreposage des hormones, la régulation de l'activité de la calmoduline et de la chimiotaxie des leucocytes (Clarke, 1985; Barten et O'Dea, 1990). En effet, il a été démontré en 1975 que la carboxyl-méthylation des protéines membranaires des bactéries pouvait jouer un rôle dans la régulation de la réponse chimiotactique (Kort *et al.*, 1975). Cependant, les progrès sur la protéine carboxyle méthyltransférase ont été ralentis par plusieurs obstacles. Les années passèrent sans que quiconque ne parvienne à identifier clairement les fonctions de cette protéine. D'une part, la méthylation catalysée par cette enzyme était sous-stoechiométrique. En plus, les groupements méthyl-esters formés étaient très instables et ne résistaient pas aux conditions alcalines habituelles d'électrophorèse. Toutefois, en 1984 on trouva une explication à ces problèmes. Lors de ses études sur l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), un des meilleurs substrats de la protéine carboxyle méthyltransférase, Aswad démontra que le groupement α -carboxyle libre d'un lien L-isoaspartyl était un excellent site de méthylation pour cette enzyme à laquelle il attribua donc le nom de protéine L-isoaspartyl méthyltransférase (Aswad, 1984). Par la suite, Murray et Clarke démontrèrent qu'un intermédiaire imide cyclique se formait lors de la réaction et que l'hydrolyse de ce dernier entraînait la formation d'un mélange de liens α -aspartyls et β -aspartyls. De plus, ils démontrèrent que la PIMT méthylait sélectivement les résidus L-

isoaspartates de l'adénocorticotropine désamidée (Murray et Clarke, 1984). Également, en tenant compte de la configuration optique (L ou D) de ces groupements, quatre structures différentes furent observées, soit L- α , L- β , D- α et D- β . Ces quatre variants furent soumis à une méthylation par la PIMT et seul le variant L-isoaspartate (L- β) était un substrat efficace pour l'enzyme. Ces découvertes ont donc permis d'expliquer l'instabilité et la faible stoechiométrie de la réaction de méthylation par la PIMT observée dans les études antérieures, car le groupement méthyl-ester formé sur un L-isoaspartate est fortement susceptible à la cyclisation et à l'hydrolyse. Les années passèrent et l'hypothèse que la PIMT soit responsable de la réparation des résidus aspartates endommagés dans les protéines s'étendit en popularité et fut le sujet de nombreuses publications.

1.2.2 Caractéristiques

La PIMT est une enzyme ubiquitaire d'environ 24 500 daltons qui a été identifiée chez plusieurs organismes comme les bactéries, les plantes, les champignons et les mammifères (Barten et O'Dea, 1990). Plusieurs études depuis sa découverte ont permis de caractériser cette protéine. En plus de se retrouver dans quatre des cinq règnes du monde vivant, la PIMT est exprimée dans de nombreux tissus. Chez les mammifères, la PIMT est exprimée dans tous les tissus. Par contre, c'est dans le cerveau que son expression est la plus élevée, suivi des testicules et du coeur (Diliberto et Axelrod, 1976; Boivin, Bilodeau et Béliveau, 1995). Par ailleurs, la PIMT a pu être purifiée dans d'autres organes tels que le thymus (Kim, 1973) et le rein (Gingras, Ménard et Béliveau, 1991) ainsi que dans les érythrocytes (Kim, Choi et Jun, 1983). Un fractionnement biochimique de plusieurs organes a permis d'observer que la PIMT est exprimée particulièrement dans le cytosol (Diliberto et Axelrod, 1976). Cependant, quelques études ont démontrées l'existence d'une forme membranaire de la PIMT dans le cerveau, le rein, les testicules et les érythrocytes (Saido, Toyoshima et Osawa, 1987; Sellinger et Kramer, 1988; Boivin, Gingras et Béliveau, 1993). Également, il a été démontré que dans le cerveau d'embryons de rats, l'expression de la PIMT augmente linéairement lors

de la maturation de cet organe. De plus, il a été démontré, par immunohistochimie, que la PIMT est fortement exprimée au niveau des neurones (Shirasawa *et al.*, 1995).

Deux isoformes majeures de la PIMT ont été identifiées et caractérisées dans plusieurs tissus de mammifères dont le cerveau de bœuf (Aswad et Deight, 1983) et les érythrocytes humains. Chez l'humain, il existe deux isoformes de la PIMT, désignées isoformes de type I et de type II en raison de leur ordre d'élution lors d'une chromatographie par échange anionique. Ces deux isoformes se retrouvent également dans des tissus d'autres espèces incluant le lapin, le rat, la souris et le cheval (Ota, Gilbert et Clarke, 1988). L'isoforme I possède 226 acides aminés ainsi qu'une séquence -RWK (arginine-tryptophane-lysine) en région C-terminale. Pour sa part, l'isoforme II possède 227 acides aminés et se termine par la séquence -RDEL (arginine-aspartate-glutamate-leucine) (MacLaren, Kagan et Clarke, 1992). De ce fait, la différence entre les séquences entraîne des points isoélectriques différents, plus précisément 6,6 pour l'isoforme I et 5,5 pour l'isoforme II (Ota, Gilbert et Clarke, 1988). La présence des deux isoformes de la PIMT est en effet le résultat d'un épissage alternatif d'un seul gène situé sur le chromosome 6 (MacLaren, Kagan et Clarke, 1992). Par ailleurs, la séquence terminale -RDEL de l'isoforme II s'apparente fortement au signal de rétention dans le réticulum endoplasmique, qui est KDEL. De plus, il est proposé que cette isoforme pourrait avoir une fonction réparatrice dans le réticulum endoplasmique ou dans d'autres compartiments cellulaires (Potter *et al.*, 1992). Néanmoins, aucune activité de méthylation par la PIMT n'a été rapportée comme étant présente de manière significative au niveau du réticulum endoplasmique. L'expression des isoformes I et II peut varier d'un tissu à l'autre mais le ratio semble généralement se situer entre 2:1 et 3:2 respectivement dans la plupart des tissus de mammifères (Aswad, 1995). Même si ces deux isoformes se distinguent par quelques caractéristiques, aucune fonction distincte ne leur a été associée jusqu'à présent. Il semblerait qu'il existe une troisième isoforme de la PIMT beaucoup moins abondante que les deux formes majeures avec un point isoélectrique se situant à mi-chemin entre les deux isoformes précédentes (MacLaren, Kagan et Clarke, 1992). De plus, l'analyse des sites d'épissage dans la séquence du gène de la PIMT prédit une séquence de 224 acides aminés se terminant par

les résidus –SR (sérine-arginine). Toutefois, cette troisième isoforme étant moins abondante, il existe peu d'informations sur celle-ci et elle n'a pas encore été purifiée ni bien caractérisée (MacLaren, Kagan et Clarke, 1992).

Le gène qui code pour la PIMT chez l'humain, composé de 8 exons séparés de 7 introns, est situé sur le chromosome 6 dans la région q24-25 et occupe 60 kb. La séquence du gène dans la région 5' non transcrite révèle la présence de certains éléments potentiels de réponses incluant les motifs ARE (*antioxydant response element*), XRE (*xenobiotic response element*), CRE (*cyclic AMP response element*) et ERE (*estrogen response element*) (DeVry, Tsai et Clarke, 1996). De plus, il existe des variations alléliques dans le gène de la PIMT suggérant ainsi la présence de plusieurs sites polymorphiques sur le gène *PIMT*, ce qui lui procure une certaine diversité (Ingrosso *et al.*, 1989; MacLaren, Kagan et Clarke, 1992; Tsai et Clarke, 1994). 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 ce qui résulte 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).

1.2.3 Formation des résidus aspartates anormaux

Dans la plupart des organismes vivants, les protéines et les peptides peuvent être assujettis à diverses modifications post-traductionnelles spontanées dommageables lors du vieillissement normal. D'ailleurs, ces différentes modifications entraînent normalement un changement conformationnel qui peut provoquer une altération néfaste pour la fonction de la protéine (Robinson et Robinson, 2004). La désamination des asparagines et l'isomérisation des acides aspartiques sont de bons exemples de modifications non enzymatiques qui affectent les fonctions des protéines, en formant des résidus L-isoaspartates anormaux (figure 1.1). Effectivement, lors du vieillissement, la formation de résidus aspartates anormaux, tels que L-isoaspartates, est considérée

comme une des principales sources de dommages aux protéines (Aswad, Paranadi et Schurter, 2000).

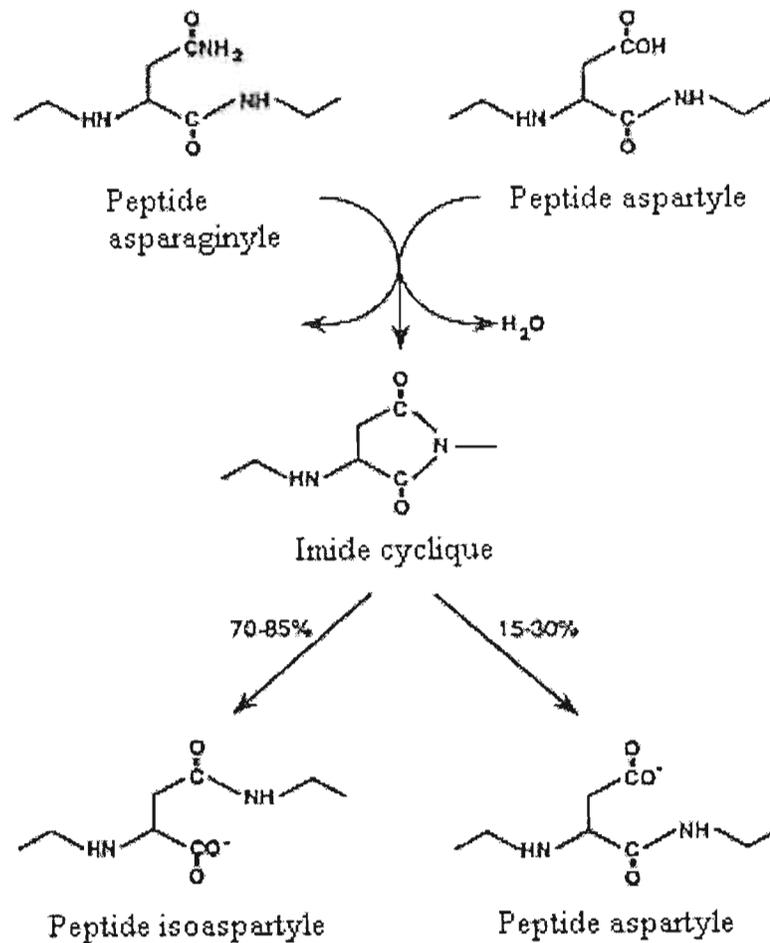


Figure 1.1 Mécanismes de formation de résidus isoaspartates provenant des acides aminés asparagines ou aspartates des protéines (Tirée de Aswad, Paranadi et Schurter, 2000).

Ces événements sont très fréquents et surviennent spontanément à l'intérieur des cellules. Toutefois, des facteurs comme la température, le pH environnant, la structure et le temps de demi-vie de la protéine peuvent influencer ces processus. Lors de la réaction,

il y a formation d'un intermédiaire imide cyclique nommé succinimide. Ce dernier est très instable et subit une hydrolyse spontanée en quelques heures ce qui produit un mélange contenant 70-85% de résidus anormaux L-isoaspartates, dans lesquels le lien peptidique est formé par le groupement carboxyle de la chaîne latérale de l'acide aminé au lieu du groupement α -carboxyle, et 15-30% de résidus L-aspartates normaux (Reissner et Aswad, 2003). Néanmoins, les résidus L-isoaspartates sont formés de façon préférentielle à cause de l'asymétrie de la structure du succinimide. De plus, ce processus est également accompagné d'une lente racémisation de l'intermédiaire succinimide engendrant de faibles quantités de résidus D-aspartates et D-isoaspartates. Donc, la formation de résidus D-aspartates peut être négligée par rapport à la formation de résidus L-isoaspartates. Également, une série de réactions similaires peut survenir pour les résidus glutamines et glutamates. Cependant, ces réactions se produisent à des vitesses extrêmement lentes dans les protéines par rapport à la formation d'isoaspartates puisque l'intermédiaire cyclique est beaucoup plus difficile à former (Wright, 1991). En plus, il existe d'autres facteurs qui favorisent la formation des résidus L-isoaspartates. En effet, les résidus aspartates ou asparagines d'une protéine ne sont pas tous susceptibles d'être modifiés par la formation d'isoaspartates. Des études de vieillissement *in vitro* mimant des conditions physiologiques (pH 7,4 et 37°C) avec une grande variété de protéines et de peptides ont permis d'établir certaines généralités sur la formation de ces résidus aspartates anormaux. D'une part, la structure primaire de la protéine joue aussi un rôle primordial dans le processus de désamidation. Premièrement, les résidus L-isoaspartates sont formés dans des séquences où l'acide aminé qui suit immédiatement (N+1) est petit, hydrophile et ne possédant pas de chaîne latérale encombrante (Johnson et Aswad, 1995). En effet, il a été démontré qu'une glycine en position N+1 provoque la formation de résidus L-isoaspartates 70 à 100 fois plus rapidement que des acides aminés possédant une chaîne latérale hydrophobe et ramifiée (Brennan et Clarke, 1995). Il y aurait donc une relation directe entre la grosseur de la chaîne latérale de l'acide aminé en position N+1 et la vitesse de formation de l'intermédiaire succinimide. Ainsi, les acides aminés favorables à la formation d'isoaspartates sont la glycine, la sérine et l'histidine. Ces derniers accélèrent la déprotonation de l'azote du lien peptidique favorisant l'attaque nucléophile de la

chaîne latérale de l'aspartate ou de l'asparagine entraînant ainsi la formation de l'intermédiaire succinimide (Reissner et Aswad, 2003). Cette étape est donc l'étape limitante du processus de formation des résidus L-isoaspartates. De plus, des études ont démontré que l'acide aminé précédant l'aspartate ou l'asparagine n'influence pas la vitesse de formation des isoaspartates (Brennan et Clarke, 1995). Outre la séquence locale en acides aminés, les structures secondaires et tertiaires de la protéine affectent grandement la formation d'isoaspartates. En effet, la formation de résidus aspartates anormaux survient préférentiellement dans des régions hautement flexibles de la protéine, favorisant ainsi la cyclisation et la formation de l'intermédiaire succinimide (Chazin et Kossiakoff, 1995). Aussi, tel que mentionné précédemment, d'autres facteurs tels que la température, le pH et la force ionique peuvent influencer la formation d'isoaspartates dans les protéines (Brennan et Clarke, 1995). En effet, à des températures élevées, la chaîne polypeptidique est dénaturée entraînant une conformation plus détendue et favorisant la formation du succinimide et donc la formation d'isoaspartates. Aussi, à des pH basiques, la déprotonation de l'azote du lien peptidique est augmentée ce qui accélère également la formation de résidus isoaspartates.

Certaines conditions de stress ont également été rapportées pour induire la formation de résidus aspartates anormaux dans les cellules. Effectivement, lorsque des cellules HeLa en culture sont soumises à un choc thermique à 42°C, une augmentation marquée du nombre de résidus L-isoaspartates est observée (Ladino et O'Connor, 1992). De plus, l'exposition d'érythrocytes humains à des agents induisant un stress oxydatif tels que le *t*-butyl hydroperoxyde (t-BHP) ou le peroxyde d'hydrogène induisent l'accumulation d'isoaspartates dans les protéines membranaires des érythrocytes (Ingrosso *et al.*, 2000). La présence d'agents antioxydants tels que l'acide ascorbique ou l' α -tocophérol prévient cette accumulation indiquant la spécificité du phénomène (Ingrosso *et al.*, 2000). Le stress hypotonique est également connu pour induire la formation d'isoaspartates dans les protéines membranaires des érythrocytes (Ingrosso *et al.*, 1995). Récemment, une autre équipe a aussi montré que les rayons ultraviolets A (UVA), sources importantes d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), induisent fortement la formation d'isoaspartates

dans des cellules de mélanome humain, et ce à des doses similaires aux rayonnements du soleil (D'Angelo *et al.*, 2001).

1.2.4 Réparation des résidus L-isoaspartates par la PIMT

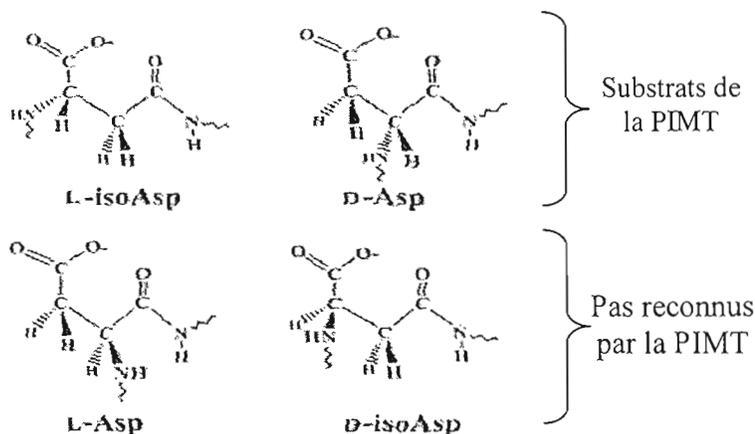


Figure 1.2 Configuration des résidus aspartates reconnus ou non par la PIMT (Tirée de Clarke, 2003).

La formation spontanée de résidus L-isoaspartates n'est pas néfaste pour la cellule, c'est plutôt l'accumulation au cours du vieillissement de ces protéines endommagées qui peut avoir des conséquences importantes au niveau de leur structure et de leur fonction biologique. C'est notamment le cas dans certaines maladies dont l'Alzheimer (Clarke, 2003). Dès lors, la PIMT grâce à ses propriétés de méthylation des résidus L-isoaspartates, joue un rôle crucial dans la réparation des protéines endommagées porteuses de résidus aspartates anormaux dans la cellule. En effet, la PIMT a la capacité de reconnaître et de réparer les résidus L-isoaspartates et D-aspartates. La formation de résidus L-isoaspartates et L-aspartates est engendrée suite à la désamination des asparagines et l'isomérisation des aspartates, mais cette réaction produit également de

faibles quantités de résidus D-aspartates et D-isoaspartates. La PIMT possède une forte affinité pour les résidus L-isoaspartates, elle reconnaît les résidus D-aspartates avec une affinité de 700 à 10 000 fois moindre que les résidus L-isoaspartates (Lowenson et Clarke, 1992). L'efficacité de méthylation de ces résidus est alors très faible et presque négligeable par rapport aux L-isoaspartates. En plus, les résidus L-aspartates et D-isoaspartates ne font pas partie des substrats de la PIMT (figure 1.2). Cette spécificité de réparation de la PIMT est due à l'orientation de l'atome d'azote, qui se trouve en avant-plan et qui empêche la PIMT de se fixer sur les résidus L-aspartates et D-isoaspartates (Clarke, 2003).

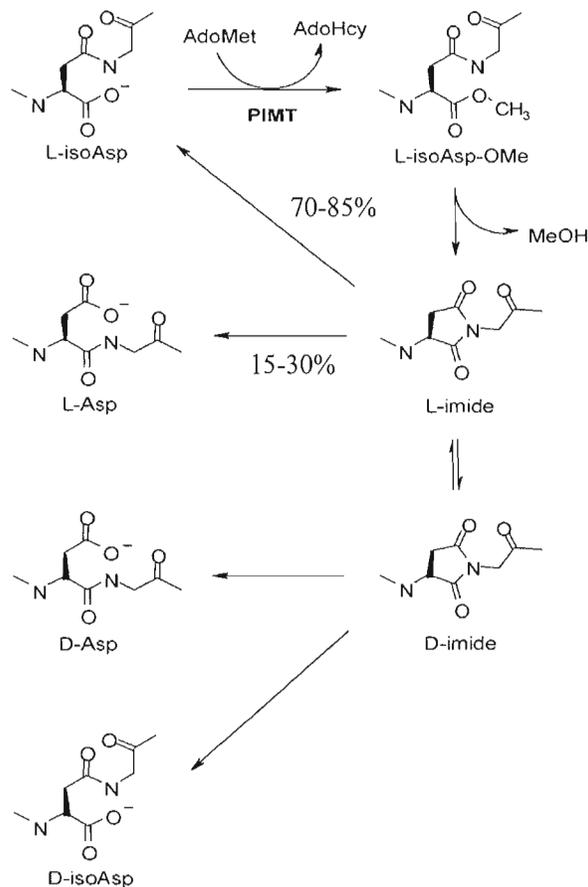


Figure 1.3 Mécanisme de réparation des protéines par la PIMT (Tirée de Young *et al*, 2005).

La réparation des résidus L-isoaspartates par la PIMT se fait par le transfert d'un groupement méthyle, provenant de l'AdoMet, sur les résidus carboxyles des protéines endommagées. (Lindner et Helliger, 2001). Il y a alors formation d'un groupement méthyl-ester sur la protéine ciblée et libération de S-adénosyl-L-homocystéine (SAH), qui peut agir comme inhibiteur compétitif de la réaction de méthylation. Le groupement méthyl-ester de la protéine va par la suite s'hydrolyser spontanément et ainsi libérer du méthanol et former un intermédiaire succinimide qui se convertira à son tour en résidu aspartate ou L-isoaspartate. L'hydrolyse non enzymatique du succinimide engendre environ 30% de résidus aspartates «réparés» et 70% de résidus L-isoaspartates «non réparés» (Gingras *et al.*, 1994b). Toutefois, le cycle de réparation peut survenir plusieurs fois, assurant une réparation presque complète des protéines endommagées (figure 1.3). L'activité de la PIMT est donc essentielle afin de maintenir un niveau très bas de protéines isomérisées anormales dans les cellules.

La réparation des résidus L-isoaspartates *in vitro* a d'ailleurs été démontrée à l'aide de nombreux peptides synthétiques contenant des isoaspartates ainsi que plusieurs protéines vieilles *in vitro*. Ainsi, des études ont mis en évidence que la PIMT est capable de rétablir l'activité d'une protéine endommagée par la présence d'isoaspartates. C'est le cas de la calmoduline. Des études ont montré que la calmoduline perd 82% de sa capacité à activer un de ses effecteurs, la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (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).

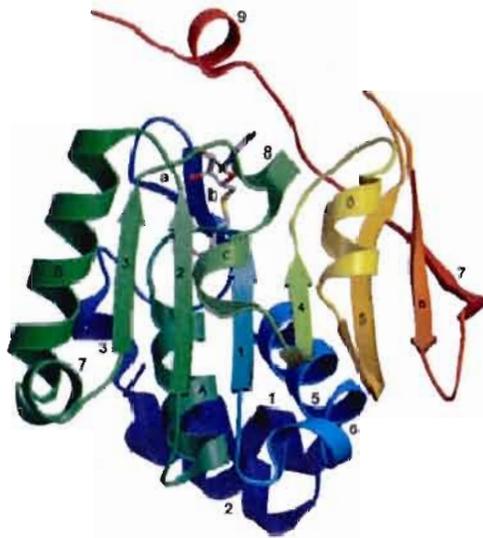


Figure 1.4 Vue d'ensemble de la structure cristalline de la PIMT humaine (Tirée de Ryttersgaard *et al.*, 2005).

La structure cristalline de la PIMT humaine (figure 1.4) (Ryttersgaard *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002), de bactéries thermophiles (Skinner *et al.*, 2000; Griffith *et al.*, 2001) de même que de la drosophile (Bennett *et al.*, 2003) a été élucidée récemment ce qui a permis de mieux comprendre son mécanisme catalytique. Une de ses particularités est la localisation du site de liaison de l'AdoMet dans une poche profonde enfouie à l'intérieur de la PIMT. Ceci suggère que l'une des étapes limitantes de la réaction enzymatique est la liaison de l'AdoMet à son site puis le relâchement de l'AdoHcy de cet espace restreint. Ainsi, l'AdoMet est le premier substrat à lier l'enzyme et l'AdoHcy est le dernier produit à la quitter.

Les études ont également permis de déterminer la présence de deux acides aminés chargés négativement à l'intérieur de la PIMT dans le site de liaison de l'AdoMet et 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 liaison du substrat L-isoaspartate semble impliquer des liens hydrogènes avec une sérine à proximité de l'AdoMet (Bennett, *et al.*, 2003). La PIMT de mammifère possède un Km pour les peptides possédant un L-isoaspartate d'environ 0,5 à 10 μM et son Vmax est de 15 à 30 nmol/min/mg à 37°C (Johnson et Aswad, 1995). Ainsi, 1 à 3 minutes sont nécessaires pour que chaque molécule de PIMT catalyse le transfert d'un groupement méthyle (Aswad, 1995).

1.2.5 Rôles et implications biologiques de la PIMT

Une accumulation importante de résidus aspartates anormaux dans les protéines peut grandement altérer leur structure et leur fonction biologique. Ainsi, la présence de protéines endommagées dans certains tissus peut amener des conséquences pathologiques importantes comme c'est le cas dans la maladie d'Alzheimer. Effectivement, des études sur l'implication de la PIMT dans la maladie d'Alzheimer ont déjà été effectuées. D'une part, la maladie d'Alzheimer est un désordre neurodégénératif caractérisé par l'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 principalement du peptide β -amyloïde provenant de la protéolyse de la protéine APP (*amyloid precursor protein*). Suite au clivage de la protéine APP, le peptide amyloïde-bêta, composé de 40 ou 42 acides aminés, subit plusieurs modifications post-traductionnelles incluant la formation d'isoaspartates (Shimizu *et al.*, 2000). Une de ces études a effectivement démontré que les résidus aspartates, aux positions 1 et 7, des peptides β -amyloïdes, étaient transformés en L-isoaspartates, D-isoaspartates et D-aspartates, dans des cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer (Roher *et al.*, 1993). De plus, le groupe de Shimizu (2005) a démontré une augmentation de la formation de résidus L-isoaspartates dans les peptides β -amyloïdes, impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Ils ont étudié l'isomérisation des résidus en position 7 et 23 et en sont arrivés à la conclusion que les résidus isomérisés en position 23 augmentaient fortement l'agrégation des peptides dans les plaques séniles. Une autre

caractéristique de la maladie d'Alzheimer est la formation de plaques neurofibrillaires (PNF) dans les neurones du cortex cérébral (Mann, 1985). Les PNF sont des structures fibrillaires insolubles retrouvées dans le cytosol des neurones atteints et elles sont composées de filaments hélicaux pairés (FHP). Ces derniers sont formés majoritairement des protéines tau et ubiquitine. Des études ont démontré récemment par spectrométrie de masse que la protéine tau isolée de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer possédait des résidus L-isoaspartates aux positions Asp-193, Asn-381 et Asp-387 par rapport aux cerveaux sains (Watanabe, Takio et Ihara, 1999; Shimizu *et al.*, 2000). De plus, la présence de ces résidus aspartates anormaux dans la protéine tau entraînait son oligomérisation et donc la formation de FHP insolubles. Ainsi, il est possible que l'accumulation d'isoaspartates dans la protéine tau du cerveau humain puisse être impliquée dans la formation des PNF et le développement de la maladie d'Alzheimer (Watanabe, Takio et Ihara, 1999). De plus, 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 PNF (Shimizu *et al.*, 2000). Cependant, le rôle exact de cette surexpression de la PIMT n'est pas connu.

Par ailleurs, un des rôles physiologiques de la PIMT a récemment été révélé grâce à des souris déficientes en PIMT ($PIMT^{-/-}$). Des études ont démontré que ces souris présentent une forte accumulation de résidus isoaspartates dans la fraction cytosolique du cœur, du foie, des érythrocytes et plus particulièrement dans le cerveau où neuf fois plus d'isoaspartates sont observés lorsque comparés aux souris normales (Kim *et al.*, 1997; Yamamoto, Takagi et Kitamura, 1998). De ce fait, ces souris $PIMT^{-/-}$ démontrent un retard de croissance significatif et succombent suite à des convulsions épileptiques fatales entre 22 et 60 jours après la naissance (Kim *et al.*, 1997, 1999; Yamamoto, Takagi et Kitamura, 1998). Également, il fut observé que les neurones pyramidaux du cortex cérébral des souris $PIMT^{-/-}$ possèdent des dendrites déformés ainsi que des microtubules désorganisés par rapport aux souris normales (Yamamoto, Takagi et Kitamura, 1998). Ces premières études démontrent donc que la réparation des protéines possédant des résidus L-isoaspartates par la PIMT dans le cerveau est essentielle au bon

fonctionnement du système nerveux central et à la croissance normale des souris. Par la suite, il a été démontré que les souris $PIMT^{-/-}$ présentent une neurotransmission aberrante dans les synapses de la région CA3 de l'hippocampe par rapport aux souris normales (Ikegaya *et al.*, 2001). De plus, des études en microscopie électronique ont révélé une distribution anormale des vésicules synaptiques et une dégénérescence des vacuoles des axones des neurones de la région CA3 de l'hippocampe des souris $PIMT^{-/-}$ (Ikegaya *et al.*, 2001). Cette étude démontre que cette région du cerveau est particulièrement vulnérable à la présence d'isoaspartates et confirme l'importance du système de réparation dépendante de la PIMT pour son bon fonctionnement. Par la suite, une autre étude a rapporté que dans les souris $PIMT^{-/-}$, des niveaux plus élevés d'AdoMet et plus faibles d'AdoHcy sont mesurés dans le cerveau par rapport aux souris normales (Farrar et Clarke, 2002). De plus, ces niveaux semblent être altérés plus significativement dans la région de l'hippocampe. Ainsi, 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 poursuivre l'étude sur le rôle physiologique de la PIMT, des souris transgéniques possédant le gène *PIMT* sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux neurones ont été produites. En exprimant la PIMT, ces dernières évitent ainsi les crises d'épilepsie (Shimizu *et al.*, 2002) et peuvent même vivre jusqu'à 5 fois plus longtemps que des souris non traitées (Lowenson *et al.*, 2001). D'autres études ont développé des souris transgéniques, mais cette fois-ci, en utilisant les gènes codant pour les isoformes I et II de la PIMT séparément, ceux-ci étant sous le contrôle du promoteur de la protéine prion et permettant une expression ubiquitaire dans tous les types cellulaires du système nerveux des souris (Shimizu *et al.*, 2002). Ainsi, la présence de l'une ou l'autre des isoformes prévient complètement les convulsions épileptiques ainsi que le retard de croissance des souris $PIMT^{-/-}$ et répare les isoaspartates accumulés dans le cerveau (Shimizu *et al.*, 2002). Il est donc suggéré que les deux isoformes possèdent les mêmes propriétés biologiques et les mêmes substrats intracellulaires. La perte de la PIMT dans les cellules autres que les neurones peut être possiblement critique au développement des symptômes épileptiques (Shimizu *et al.*, 2002).

La pertinence physiologique de la réparation des protéines endommagées par des résidus L-isoaspartates par la PIMT a donc été établie grâce à l'utilisation de souris déficientes en PIMT (PIMT^{-/-}). Ces études ont démontré que les souris PIMT^{-/-} accumulaient une forte quantité de résidus aspartates anormaux dans leur cerveau et qu'elles mourraient prématurément suite à des convulsions épileptiques fatales (Kim *et al.*, 1997, 1999; Yamamoto, Takagi et Kitamura, 1998) et ont soulevé l'hypothèse selon laquelle la PIMT serait essentielle au maintien du bon fonctionnement du système nerveux central, particulièrement au niveau de l'hippocampe, et qu'une déficience en PIMT induirait l'épilepsie chez la souris. En occurrence, une autre étude provenant de notre laboratoire a démontré que l'expression réduite de la PIMT dans des hippocampes d'humains atteints d'épilepsie était associée à l'accumulation de résidus L-isoaspartates dans différentes protéines, dont la tubuline (Lanthier *et al.*, 2002).

1.2.6 Régulation de la PIMT

Il ne fait donc aucun doute que la PIMT occupe une place prépondérante dans le maintien fonctionnel des systèmes biologiques. Les données chez l'homme et la souris soulignent l'importance d'analyser les mécanismes moléculaires qui régulent l'expression de la PIMT dans les tissus du cerveau. Bien que son mécanisme d'action soit aujourd'hui bien élucidé et que de nombreuses études aient démontré son rôle dans plusieurs maladies, peu d'études ont analysé les mécanismes contrôlant l'expression de la PIMT en dépit de plusieurs résultats démontrant sa dérégulation dans plusieurs neuropathologies.

Toutefois, de récents travaux dans notre laboratoire ont signalé que l'inhibition de l'expression de la PIMT par ARN interférant dans des cellules gliales traitées avec un dérivé de l'arsenic, l'oxide de phénylarsine, augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène suggérant que la PIMT pourrait agir comme une protéine antioxydante (Fanéus et Desrosiers, 2008). De plus, nous avons récemment noté des similitudes entre les fonctions de la PIMT dans le développement du cerveau (Kim *et al.*, 1997; Yamamoto, Takagi et Kitamura, 1998) et les principales 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). Comme PIMT, la voie de signalisation de Wnt est critique pour le développement du cerveau. Il a d'ailleurs été démontré qu'il y avait absence de développement de l'hippocampe chez des souris déficientes en Wnt-3a, (Lee *et al.*, 2000). Une autre étude a montré que la surexpression de GSK-3 β , qui est inhibée lorsque la voie de Wnt est activée, conduit à une réduction de la taille du cerveau chez la souris (Spittaels *et al.*, 2002). En plus, l'inactivation du gène de la β -caténine qui est une protéine clé dans la voie de signalisation Wnt, donne lieu à des malformations au niveau du cerveau ainsi qu'une absence de développement cranio-facial (Brault *et al.*, 2001). Également, il semblerait que la β -caténine soit impliquée dans l'épilepsie. En fait, les souris mutantes avec une délétion de β -caténine présentent des malformations au niveau de la structure de l'hippocampe et sont plus susceptibles aux convulsions induites avec le penthyltétrazole, un convulsivant du système nerveux central (Campos, Du et Li, 2004). De plus, la voie de signalisation de Wnt, par l'intermédiaire de GSK-3, est également impliquée dans la plasticité synaptique, la survie cellulaire, et les rythmes circadiens, qui sont tous impliqués dans les troubles bipolaires (Gould et Manji, 2002). Ces observations suggèrent que la voie de GSK-3/ β -caténine pourrait réguler l'expression de la PIMT.

En accord avec cette suggestion, les récents travaux de notre laboratoire ont démontré que l'expression de la PIMT, dans les cellules d'astrocytomes humain U-87 MG, est induite par deux stabilisateurs de l'humeur: le lithium, qui est couramment utilisé pour traiter le trouble bipolaire, et l'acide valproïque, un anticonvulsivant utilisé principalement pour le traitement de l'épilepsie mais aussi pour contrôler les troubles bipolaires. Le lithium est maintenant connu pour inhiber directement GSK-3 et mimer l'activation de la voie de signalisation Wnt (Stambolic, Ruel et Woogett, 1996). De plus, l'acide valproïque est un inhibiteur indirect de GSK-3. Donc, l'induction de l'expression de la PIMT par ces médicaments dépend de l'augmentation de la phosphorylation provoquant l'inactivation de GSK-3 et, par conséquent, de la stabilisation de β -caténine (Lamarre et Desrosiers, 2008).

1.3 L'acide valproïque

1.3.1 Historique et propriétés

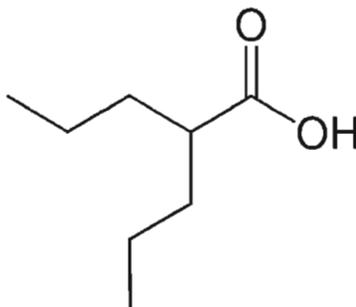


Figure 1.5 Structure chimique de l'acide valproïque.

L'acide valproïque est un médicament qui malgré sa structure chimique simple (acide 2-propylpentanoïque) (figure 1.5) possède de multiples effets thérapeutiques. L'acide valproïque a été découvert, par hasard, et est maintenant largement reconnu dans le traitement de plusieurs neuropathologies et désordres psychiatriques. C'est un chimiste américain (Burton) qui a été le premier à synthétiser l'acide valproïque comme solvant organique en 1882 (Burton, 1882). C'est un liquide clair, de couleur jaune pâle à température pièce et soluble dans les solvants organiques et dans l'eau (sous forme de sel de sodium). Son nom générique (acide valproïque) est dérivé du nom descriptif, l'acide 2-propylvalérique (Henry, 2003). L'acide valproïque a fréquemment été utilisé comme solvant organique avant que ses propriétés thérapeutiques furent établies en 1962 par une équipe française. Il fût alors employé pour solubiliser d'autres composés (dérivés khelline) qui étaient testés pour leur activité anticonvulsivante potentielle (Meunier *et al.*, 2003). Meunier et ses collègues ont éprouvé quelques difficultés à solubiliser certains dérivés dans l'eau ou dans des solvants organiques communs. Ils ont

alors utilisé l'acide valproïque comme solvant pour finalement observer une activité anticonvulsivante pour tous les composés testés et pour toutes les doses. Les premiers essais cliniques pour les gens souffrant d'épilepsie utilisant l'acide valproïque sous sa forme de sel de sodium, valproate, ont été effectués en France en 1964 (Lebreton *et al.*, 1964). Il est ensuite commercialisé en France en 1967, en Grande-Bretagne en 1973 et approuvé par la US Food and Drug Administration en 1978. Il fut, pour plusieurs décennies qui ont suivi, le seul anticonvulsivant sur le marché.

L'acide valproïque est maintenant commercialisé dans plus de cent pays et est l'anticonvulsiant de premier plan le plus largement 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, 2003). De plus, cet anticonvulsivant est aussi prescrit pour traiter les gens souffrant de troubles bipolaires. Il est d'ailleurs recommandé par plusieurs sociétés nationales et internationales de psychiatrie et de pharmacologie comme médicament de premier plan pour le traitement des désordres bipolaires (Fountoulakis *et al.*, 2005).

1.3.2 Cibles d'action

Même si l'acide valproïque est prescrit depuis près de 50 ans pour traiter les gens souffrant d'épilepsie et aussi depuis quelques années comme régulateur de l'humeur, le ou les mécanismes d'action qui sont responsables de l'effet thérapeutique du médicament demeurent toujours mal compris. Toutefois, depuis quelques années, plusieurs études ont permis de mieux identifier certaines cibles d'action du médicament, mais ces cibles sont multiples, ce qui rend difficile la compréhension des phénomènes thérapeutiques autant pour l'épilepsie que pour les troubles bipolaires.

1.3.2.1 Neurotransmission

Il a été démontré que l'acide valproïque augmente le niveau cérébral d'acide γ -aminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur qui inhibe la transmission synaptique,

probablement en inhibant la succinate semialdéhyde-déhydrogénase. Conséquemment, l'inhibition de cette enzyme augmente le niveau de succinate semialdéhyde, un métabolite qui inhibe l'enzyme GABA-transaminase et donc prévient ainsi le catabolisme de GABA (Johannessen, 2000). L'inhibition de la neurotransmission GABAergique peut provoquer des convulsions, ce qui explique en partie pourquoi la potentialisation de l'activité GABAergique favorise l'effet anticonvulsivant de l'acide valproïque (Lösher, 1989).

De plus, plusieurs évidences suggèrent que l'effet anticonvulsivant de l'acide valproïque se traduit aussi par l'inhibition des canaux sodiques dépendants du voltage (Johannessen, 2000). En effet, des études ont démontré que l'acide valproïque retarde la réactivation des canaux sodiques inactifs ainsi que la conductance sodique dans des neurones d'hippocampe en culture (Van den Berg, Kok et Vosuyl, 1993). Également, une administration chronique d'acide valproïque provoque une augmentation de l'ARNm des canaux sodiques ce qui pourrait refléter un mécanisme compensatoire pour l'inhibition des canaux sodiques (Tunnicliff, 1999).

1.3.2.2 HDACs

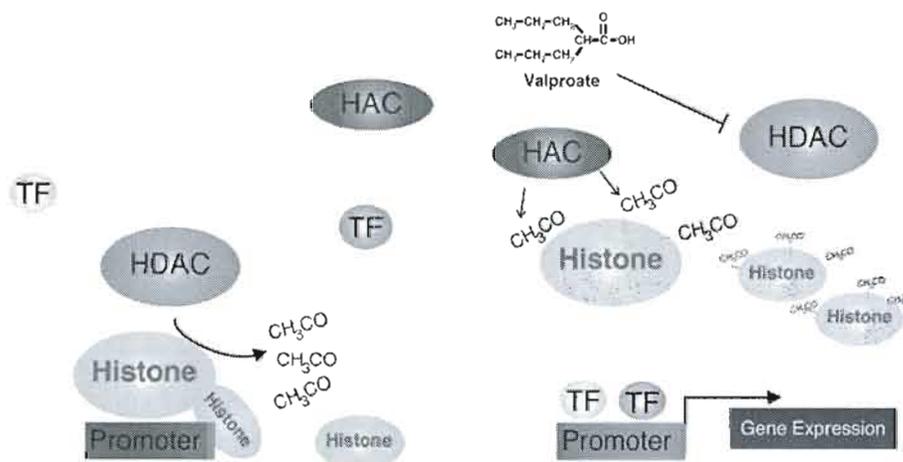


Figure 1.6 L'acide valproïque est un inhibiteur direct des HDACs. L'acétylation des histones est régulée par les histone-acétyltransférases (HAC) et les histone-désacétylases (HDACs). L'acétylation des histones active généralement la transcription génétique en favorisant l'interaction des facteurs de transcription (TF) avec le promoteur des gènes (Tirée de Quiroz *et al.*, 2004).

D'un autre côté, plusieurs travaux ont démontré que l'acide valproïque inhibe fortement les HDACs (figure 1.6). En effet, plusieurs des effets au niveau génomique de l'acide valproïque proviennent de sa capacité à inhiber les HDACs (Phiel *et al.*, 2001). Le nucléosome, l'unité de base de la chromatine, comprend quatre paires d'histones (H2A, H2B, H3 et H4). Les résidus lysines sur la queue C-terminale de ces protéines contrôlent le degré d'enroulement de l'ADN et donc l'accessibilité à la machinerie transcriptionnelle. Une augmentation de l'acétylation de ces lysines par les histone-acétyltransférases provoque une relaxation de l'ADN favorisant l'activité transcriptionnelle et inversement, une hypoacétylation engendrée par les HDACs résulte en l'arrêt de transcription (Newton et Duman, 2006). Il a d'ailleurs été démontré que l'acétylation des histones est un mécanisme régulateur important qui peut contrôler environ 2% de la transcription génétique (Van Lint, Emiliani et Verdin, 1996).

Les HDACs peuvent être catégorisées en trois classes : I, II et III. L'acide valproïque inhibe les HDACs de classe I (HDACs 1-3) et II (HDACs 4, 5 et 7) (Phiel *et al.*, 2001) ce qui engendre principalement l'augmentation des niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 (Hoffmann *et al.*, 2000). Contrairement à d'autres inhibiteurs des HDACs comme le trichostatin A (TSA), l'acide valproïque n'inhibe pas l'activité des HDACs 6 et 10 de classe II ce qui laisse croire que l'acide valproïque est un inhibiteur plus sélectif. Les mécanismes d'inhibition de l'acide valproïque diffèrent pour les deux classes des HDACs. En effet, l'acide valproïque inhibe l'activité catalytique des HDACs de classe I, mais induit plutôt une dégradation protéosomale pour les HDACs de classe II (Kramer *et al.*, 2003).

1.3.2.3 GSK-3 et la voie Wnt/ β -caténine

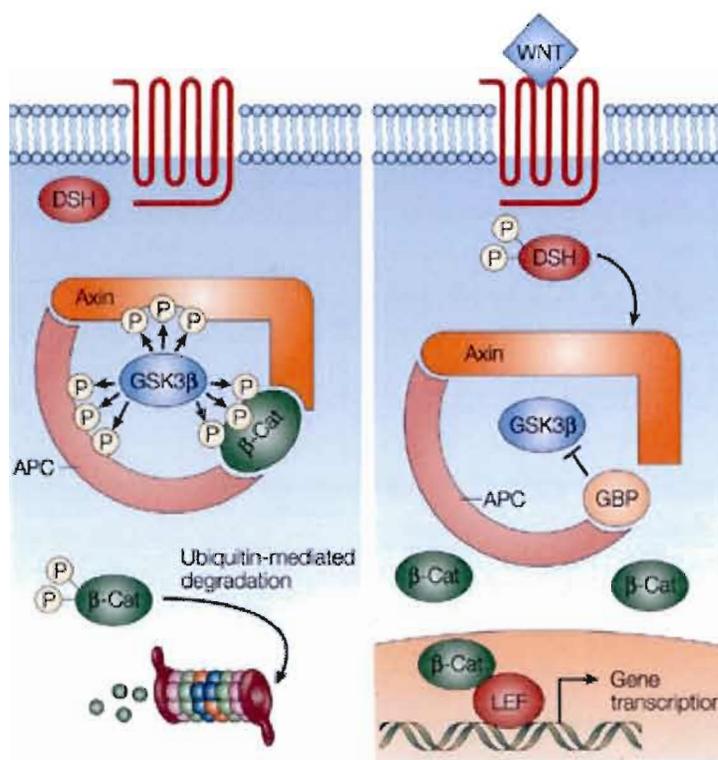


Figure 1.7 Représentation schématique de la voie de Wnt (Tirée de Radtke et Raj, 2003).

L'acide valproïque est également impliqué dans la régulation de la voie de Wnt via son action au niveau de GSK-3. Les Wnts sont une famille de ligands extracellulaires qui sont riches en cystéines, sécrétés et glycosylés et qui influencent grandement le développement embryonnaire, la croissance cellulaire, la différenciation, la polarisation et la migration. Lorsque les Wnts lient leurs co-récepteurs membranaires, Frizzled et LRP 5 ou 6, il y a augmentation du niveau de phosphorylation de l'enzyme GSK-3 qui devient inactive et ne peut plus phosphoryler la protéine β -caténine. La β -caténine est stabilisée et s'accumule donc dans le cytosol, puis migre au noyau pour lier la famille de facteurs de transcription Tcf (T cell factor)/Lef (lymphoid-enhancer factor) et active la transcription de gènes cibles dépendants de Wnt (Blaheta et Cinatl Jr., 2002) (figure 1.7). GSK-3 joue donc un rôle majeur dans cette voie puisque lorsqu'elle est active, elle phosphoryle la β -caténine. Lorsque β -caténine est phosphorylée, elle est dégradée au niveau du protéasome et la transcription de gènes ciblés par cette voie ne peut plus être activée (Doble et Woodgett, 2003). Il a été démontré que l'inhibition de GSK-3 protège les neurones de l'apoptose (Hetman *et al.*, 2000). De plus, comme le lithium, l'acide valproïque inhibe les deux isoformes de GSK-3, mais particulièrement GSK-3 β . Des études similaires faites par le même groupe ont démontré que l'acide valproïque augmentait considérablement le niveau de β -caténine cytosolique et nucléaire dans les cellules de neuroblastomes SH-SY5Y suite à l'inhibition de GSK-3 β (Chen *et al.*, 1999).

1.3.2.4 Voie de ERK

Les cellules reconnaissent et répondent aux signaux extracellulaires par la mise en jeu de programmes intracellulaires spécifiques tels que les cascades de signalisation qui conduisent à l'activation des *mitogen activated protein kinases* (MAPK). Le cycle des MAPK varie entre un état inactif non phosphorylé et un état actif phosphorylé sur un résidu thréonine et un résidu tyrosine. La voie des MAPK constitue l'une des voies principales de transmission des signaux de prolifération apportés par les facteurs de croissance. Cette voie, après activation des récepteurs, implique par l'intermédiaire de protéines adaptatrices l'activation d'une protéine Ras à l'origine de la cascade des

activités de phosphorylation : Raf (MAP kinase kinase kinase), Mek (MAP kinase kinase) et Erk (MAP kinase) (figure 1.8).

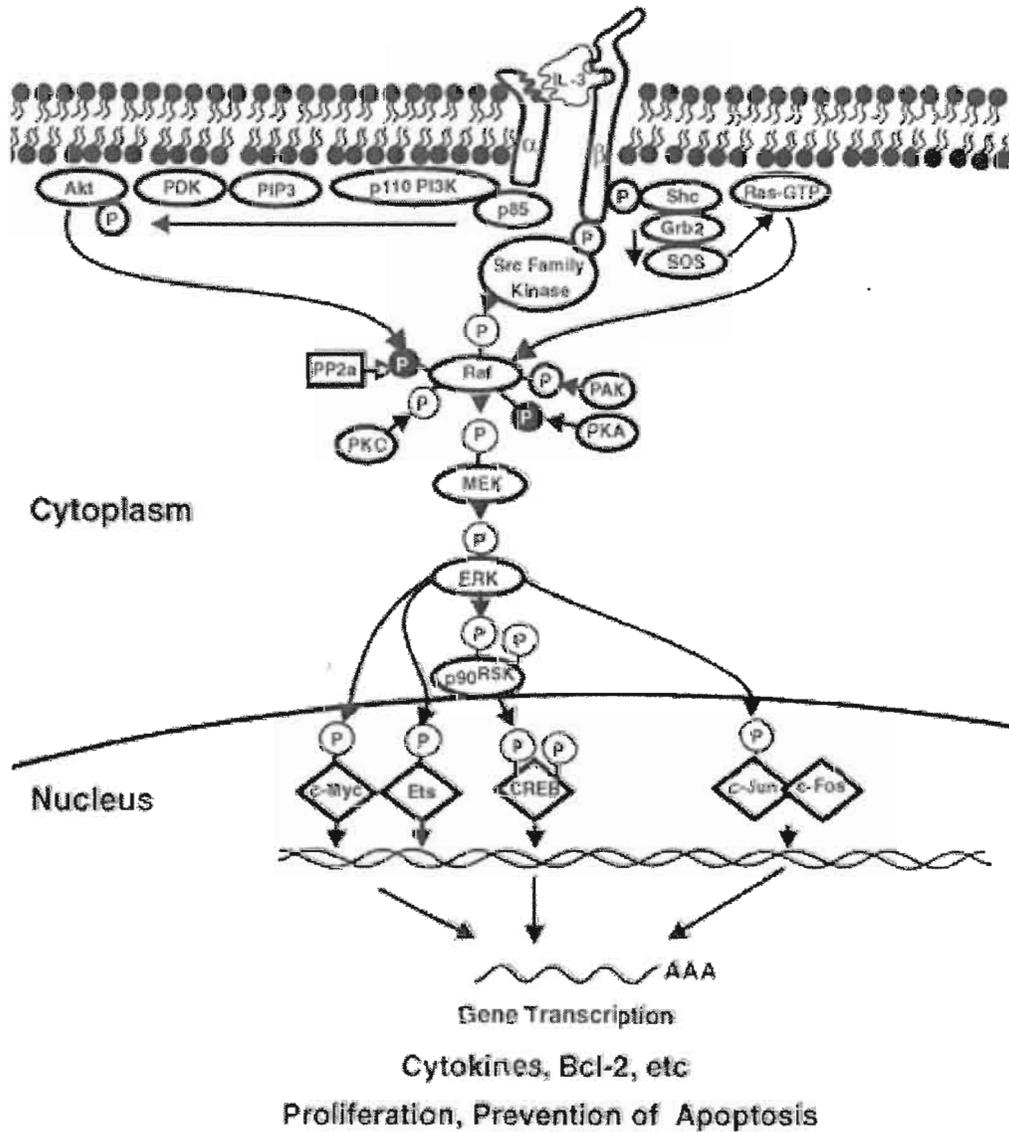


Figure 1.8 Résumé de la cascade de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK (Tirée de Chang *et al.*, 2003).

Le principal rôle de la voie de ERK est de supporter les processus de neurogénèse, de survie neuronale et de plasticité synaptique dans le cerveau de mammifères adultes (Chen et Manji, 2006). Toutefois, lorsque cette voie de signalisation est atteinte, on observe chez l'animal une altération de son comportement ressemblant fortement à un désordre de l'humeur et l'animal répond bien aux thérapies employées pour traiter ce type de désordre (Einat, 2003). Par conséquent, ces résultats suggèrent que cette voie de signalisation majeure peut être régulée par l'acide valproïque.

Au cours des dernières années, il a largement été démontré que l'acide valproïque active la voie de ERK. Dans les cellules en culture, cette activation requiert les composants en amont de cette voie, c'est-à-dire Ras, Raf et la MEK et augmente ainsi le niveau de phosphorylation de ERK1/2 (Yuan *et al.*, 2001). À son tour, lorsque ERK est activée, elle peut alors activer le facteur de transcription Elk-1 et celui-ci peut favoriser l'expression de c-Fos (Johnson *et al.*, 1997). De plus, la protéine *growth cone-associated protein* (GAP-43), qui est très importante dans le maintien de la plasticité neuronale (Yuan *et al.*, 2001), est une autre cible reliée à l'activation de la voie de ERK par l'acide valproïque. *In vivo*, il a également été démontré que l'acide valproïque augmente les niveaux de Bcl-2 dans le cortex frontal chez le rat (Chen *et al.*, 1999) ce qui pourrait être causé par l'activation de la voie de ERK. En plus, d'autres études montrent que dans le cerveau de rat, l'activation de ERK1/2 par l'acide valproïque augmente significativement les niveaux d'expression du facteur *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), une cible connue pour la voie de ERK, dans l'hippocampe et le cortex frontal du rat (Hao *et al.*, 2004). Également, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que l'inhibition de MEK prévient le processus de croissance neuronale induit par l'acide valproïque (Yuan *et al.*, 2001; Hao *et al.*, 2004). En plus, il a aussi été démontré que l'acide valproïque, par l'activation de la voie de ERK, stimule l'activation de la *90 kDa ribosomal S6 kinase 1* (RSK-1) (Einat *et al.*, 2003; Hao *et al.*, 2004).

Les RSKs constituent une famille d'effecteurs de sérine/thréonine kinases transmettant les signaux de transduction en aval de la cascade des MAP kinases. En effet, les RSKs sont activées par ERK, souvent en réponse à des facteurs de croissance,

des neurotransmetteurs, des chimiokines ou d'autres stimuli. Chez les mammifères, quatre gènes codent pour les différents isoformes de RSK (RSK1-RSK4). De plus, la famille des RSKs est ubiquitinairement exprimée dans les types cellulaires. Toutefois, il y a peu d'informations sur les fonctions cellulaires de chacune des isoformes. Des orthologues de RSK ont également été décelés dans *D. melanogaster* et *C. elegans*, mais pas dans les plantes et les levures.

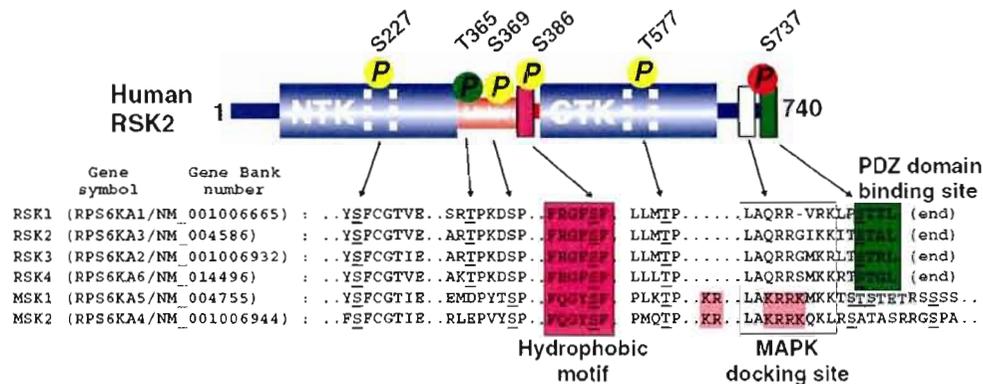


Figure 1.9 Structure des différents domaines des isoformes de la protéine RSK (Tirée de Hauge et Frödin, 2006).

RSK contient deux domaines kinases distincts et fonctionnels qui sont connectés par un domaine de liaison d'environ 100 acides aminés (Jones *et al.*, 1988). Le domaine kinase N-terminal (NTK) appartient à la famille des kinases AGC et est responsable de la phosphorylation de substrats exogènes et est aussi impliqué dans des événements d'autophosphorylation régulant l'interaction ERK-RSK. Le domaine kinase C-terminal (CTK) appartient à la famille des kinases Ca^{++} /calmoduline-dépendantes (CamK) et sa seule fonction connue est celle d'activer le domaine NTK via l'autophosphorylation de la protéine (Vik et Ryder, 1997) (Figure 1.9).

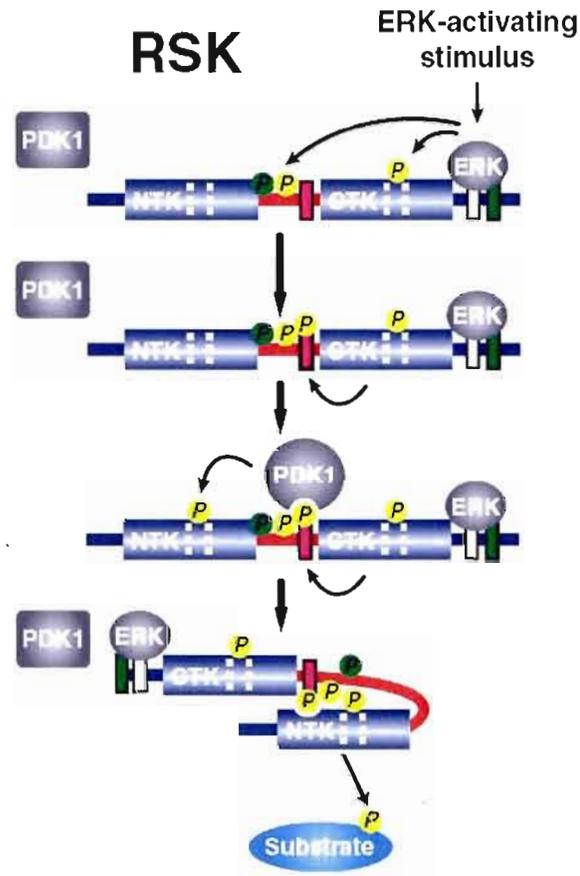


Figure 1.10 Mécanisme d'activation de la protéine RSK (Tirée de Hauge et Frödin, 2006).

Le mécanisme d'activation de RSK implique une cascade de phosphorylation au niveau de quatre sites régulateurs de la protéine (Dolby *et al.*, 1998) (Figures 1.9 et 1.10). D'une part, ERK lie le site de liaison de ERK, aussi appelé domaine D, au niveau de la terminaison C-terminal et phosphoryle le domaine de liaison sur la Ser369 ainsi que la Thr577 au niveau de la boucle d'activation du CTK. La phosphorylation du résidu Thr577 active CTK ce qui induit la phosphorylation de la Ser386 qui est localisée dans le motif hydrophobique de résidus aromatiques du domaine de liaison. La

phosphorylation de la Ser386 génère un site d'amarrage qui permet le recrutement de la protéine 3-phosphoinositide-dependent-protein kinase 1 (PDK1) stimulant son activation et phosphoryle le NTK sur la Ser227 dans la boucle d'activation (Frodin *et al.*, 2002). Suite à la dissociation de PDK1, le résidu Ser386 phosphorylé lie un site de liaison phosphate dans le NTK, ce qui empêche les résidus aromatiques du motif hydrophobique de lier et de stabiliser à proximité, la pochette hydrophobique formée par une α C-helix. Cette α C-helix coopère avec le résidu Ser227 dans la boucle d'activation stabilisant le NTK dans sa conformation active (Frodin *et al.*, 2000). D'un autre côté, l'inactivation de RSK implique la phosphorylation du résidu Ser737 ce qui diminue l'affinité de ERK pour RSK et aide à prévenir la réactivation de RSK après la déphosphorylation du site activé (Roux *et al.*, 2004).

RSK est un des effecteurs multifonctionnels de la voie de ERK qui participent à la régulation de divers processus cellulaires tels la signalisation nucléaire, la progression du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, la synthèse de protéines et la survie cellulaire. L'interaction ERK- RSK entraîne donc la régulation de plusieurs protéines, notamment, Bad, Fos, SOS, ER α et GSK-3. En effet, RSK phosphoryle et inhibe GSK-3 au niveau du résidu Ser9 *in vitro* (Sutherland, Leighton et Cohen, 1993). De plus, plusieurs autres travaux démontrent la contribution de la voie MEK/ERK/RSK dans l'inhibition de GSK-3. Par exemple, l'inhibition de GSK-3 par le traitement des cellules HeLa au phorbol ester est augmentée par l'expression ectopique de RSK1 (Stambolic et Woodgett, 1994). Dans les fibroblastes NIH 3T3, la suppression de GSK-3 induite par *l'epidermal growth factor* (EGF) est inhibée par l'expression d'un mutant dominant négatif de MEK lequel, en l'occurrence, inhibe RSK (Eldar-Finkelman, 1995). Dans les cellules PC12, l'inhibition de GSK-3 par EGF et nerve growth factor (NGF) est bloquée par l'inhibiteur de MEK, le PD98059 (Kleijn et Proud, 2000). Finalement, RSK est impliquée dans la régulation de l'activité de GSK-3 et la stabilisation de la β -caténine dans des embryons de *Xenopus* (Torres *et al.* 1999).

1.4 Objectifs de la recherche

De par sa capacité à réparer les protéines endommagées, la PIMT occupe une place importante au sein des cellules, particulièrement au niveau du cerveau. Cela a par ailleurs été démontré par de nombreuses études analysant son implication dans plusieurs maladies neurologiques. Bien que son mécanisme d'action soit aujourd'hui clairement établi, les voies de signalisation pouvant réguler l'expression et l'activité de la PIMT ne sont encore que très peu connues. Il est essentiel de connaître la base de la régulation de cette protéine afin de mieux comprendre son rôle dans la cellule puis éventuellement d'identifier des cibles thérapeutiques, que ce soit pour le cancer, l'épilepsie ou l'Alzheimer. C'est pourquoi notre étude s'est attardée sur le lien qui pouvait exister entre la PIMT et la voie de ERK. Des recherches précédentes, effectuées par notre laboratoire, sur le lien entre la protéine GSK-3 et la PIMT ont permis d'identifier une modulation de l'expression de la PIMT en présence de lithium ou d'acide valproïque, des inhibiteurs de GSK-3. Notre étude s'est donc effectuée sur des cellules cancéreuses de cerveau humain, des glioblastomes U-87 et des neuroblastomes SH-SY5Y, qui présentent une forte concentration en PIMT. Le traitement de ces cellules avec différents inhibiteurs pharmacologiques et génétiques de la voie de ERK a démontré que l'augmentation de l'expression de la PIMT induite par l'acide valproïque est bloquée par ces inhibiteurs et ces observations démontrent que l'augmentation de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque est associée à la cascade de signalisation ERK/RSK-1/GSK-3.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériels

Les lignées cellulaires d'astrocytome U-87MG et de neuroblastome SH-SY5Y ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (Manassas, Virginie, États-Unis). L'acide valproïque provient de Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Src Kinase Inhibitor I, ZM336372, U0126 et ERK activation Peptide inhibiteur I proviennent de Calbiochem (San Diego, CA, États-Unis). Le Delta-Sleep-Inducing peptide (DSIP-isoD), un peptide synthétique portant un résidu L-isoaspartyl dans sa séquence, provient de Calbiochem. S-adénosyl-L-homocystéine (AdoHcy) et S-adénosyl-L-méthionine (AdoMet) ont été obtenus de Sigma. [3H]AdoMet provient de Dupont-New England Nuclear (Boston, MA, États-Unis). Le siRNA contre RSK-1 et le siRNA témoin négatif ont été achetés de Qiagen (Valencia, CA, États-Unis). Le siRNA contrôle (la fluorescéine conjugué)-A est de Santa Cruz biotechnologie (Santa Cruz, CA, États-Unis). La lipofectamine 2000 utilisée pour transfecter les cellules a été obtenue d'Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Un anticorps polyclonal contre la PIMT a été produit par l'Institut de recherche en biotechnologie (Montréal, QC, Canada) tel que décrit (Lanthier et Desrosiers, 2004). L'anticorps α -tubuline est de Santa Cruz Biotechnology. Les anticorps monoclonaux reconnaissant phospho-ERK-1 (Thr202/Tyr204) et phospho-ERK-2 (Thr185/Tyr187), ERK1/2, phospho-RSK-1 (Thr359/Ser363), RSK1 et β -caténine ont été obtenus de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, États-Unis). L'anticorps phospho-GSK-3 β (Ser9) provient de Biovision (Mountain View, CA, États-Unis). L'anticorps monoclonal contre GSK-3 est de Calbiochem (San Diego, CA, États-Unis). Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris ont été acquis de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, États-Unis).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire d'astrocytome U-87MG a été cultivée dans du milieu *modified Eagle's medium* (MEM) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) complétée avec 1 mM de pyruvate de sodium et 10% de sérum bovin (BS). La lignée cellulaire de neuroblastome SH-SY5Y a été maintenue dans du milieu D-MEM/F-12 (Invitrogen) complétée avec 1 mM pyruvate de sodium et 10% de sérum bovin fœtal (FBS).

2.2.2 Traitements des cellules avec différents inhibiteurs

Les cellules ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée de 5% de CO₂ à 37°C. Les cellules U-87 MG (50 000 cellules / puits) et les SH-SY5Y (200 000 cellules / puits) ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits (34,8 mm de diamètre) et cultivées pendant 48 h dans un milieu de culture contenant du sérum. Les cellules ont ensuite été traitées avec l'acide valproïque, la carbamazépine (CBZ) et les inhibiteurs pharmacologiques durant 24 h comme décrit dans les légendes de figures. Lorsqu'il est utilisé comme véhicule, la concentration finale de DMSO a été maintenue à 0,1% (v / v). Après le temps d'incubation approprié, les cellules ont été lysées et l'expression de leurs protéines a été vérifiée par immunobuvardage de type Western.

2.2.3 Transfection des cellules avec un siRNA contre RSK-1

Les cellules U-87MG et les SH-SY5Y ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de 50 000 et 200 000 cellules par puits respectivement, et incubées dans un milieu MEM avec sérum pendant 24 heures. Par la suite, le milieu de culture est remplacé par du milieu MEM avec sérum frais pour 1 h et les cellules sont mises en présence d'une solution contenant du milieu MEM sans sérum, un agent de transfection (lipofectamine 2000) avec ou sans le siRNA contre RSK-1 de manière à obtenir une concentration finale de 20 nM. Le traitement avec siRNA a été de 48 heures. Par la suite

les cellules ont été lysées et l'expression de RSK-1 en présence du siRNA a été vérifiée par immunobuvardage de type Western.

Avant de traiter les cellules avec le siRNA, des mélanges avec les différents siRNA contre RSK-1 ou siRNA contrôle négatif ou de siRNA contrôle (fluorescéine conjuguée)-A et de lipofectamine 2000 ont été préparés comme suit: 20 $\mu\text{g/ml}$ de lipofectamine 2000 ont été mélangés avec les siRNA dans le milieu de culture sans sérum à température pièce pendant 45 min. Les cellules ont ensuite été incubées avec ces mélanges dans un milieu de culture frais avec sérum pendant 48 h à 37°C.

2.2.4 Lyse cellulaire

Après les traitements, les cellules ont été lavées avec de la solution phosphate saline tamponnée (PBS) froide (4°C). Ensuite, les cellules ont été lysées sur la glace pendant 30 min dans le tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Nonidet P - 40, 0,5% deoxycholate) contenant 1 mM fluorure de sodium (NaF), 1 mM de vanadate de sodium (Na_3VO_4) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les lysats cellulaires ont été clarifiés par centrifugation à 10 000 g pour 10 minutes.

2.2.5 Électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage de type western

Les protéines contenues dans les différents échantillons ont été dosées par la méthode de micro-BCA de Pierce (Rockford, IL, États-Unis). Par la suite, 15 μg de protéines ont été prélevées et mélangées avec un tampon d'échantillon pour électrophorèse (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 10% glycérol, 2 % SDS, 5% β -mercaptoéthanol et 0,00625% bleu de bromophénol) puis chauffées à 100°C pendant 4 minutes. Les échantillons ainsi préparés ont ensuite été déposés sur gels de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli (1970). Les gels de séparation utilisés contenaient 12,5% (p/v) d'acrylamide et 0,3 % (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 0,375 M de Tris/HCl à pH 8,8, 0,1% (v/v) de SDS, 0,5 $\mu\text{l/ml}$ de N,N,N',N-tétraméthylènediamine (TEMED) et 0,5 mg/ml de persulfate d'ammonium (APS). Les gels d'entassement contenaient 3,8% (p/v) d'acrylamide et

0,1% (p/v) de N,N- méthylène-bis-acrylamide, 0,125 M de Tris/HCl pH 6,8, 0,1% (v/v) de SDS, 1 μ l/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS. La migration des protéines s'est effectuée à 120 volts pendant 30 minutes et s'est poursuivie à 170 volts jusqu'à ce que le bleu de bromophénol sorte du gel.

Suite à l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF) ayant une porosité de 0,45 μ m. Les transferts ont été effectués à 80 mA pour chaque gel pendant 1 heure dans un tampon de transfert (96 mM glycine, 10 mM Tris et 10% méthanol). Les membranes ont ensuite été incubées à température pièce pendant 1 heure dans un tampon de blocage Tris salin (TBS) (150 mM NaCl et 20 mM Tris/HCl pH 7,5) contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre.

2.2.6 Immunodétection des protéines

Après le blocage des sites de liaisons non spécifiques, les membranes ont subi trois lavages successifs de 15 minutes dans un tampon TBS contenant 0,3% de Tween-20. Par la suite, les membranes ont été incubées à 4°C pendant toute la nuit en présence de l'anticorps primaire approprié. Les anticorps ont été dilués dans un tampon TBS contenant 0,1% de Tween-20 et 3% d'albumine de sérum bovin (BSA) sauf pour l'anticorps contre la PIMT. Les dilutions d'anticorps étaient les suivantes : PIMT 1 :200 000, GSK-3 α/β 1 :1000, phosphoGSK-3 β 1 :1000, β -caténine 1 :1 000, α -tubuline 1 :1000, phospho-ERK-1 1 :1000, ERK1/2 1 :1 000, phospho-RSK-11 :1 000 et RSK-11 :1 000. Par la suite, les membranes ont de nouveau subi trois lavages successifs de 15 minutes dans un tampon TBS contenant 0,3% de Tween-20 puis ont été incubées pendant 1 heure à température pièce en présence des anticorps secondaires couplés à la peroxydase et dilués 1 :2500 dans un tampon TBS contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre. Suivant cette incubation, les membranes de PVDF ont été mises en présence d'une solution permettant d'obtenir un signal de chimioluminescence (ECL) pendant une minute puis, elles ont été exposées sur des films Fuji pour la détection des protéines d'intérêt. L'analyse de l'intensité relative des différentes protéines détectées

sur les autoradiogrammes a été effectuée à l'aide d'un logiciel de densitométrie intégré à un système d'imagerie numérique.

2.2.7 Activité méthyltransférase

Les lysats cellulaires ont été dosés pour l'essai de l'activité carboxyméthyltransférase de la PIMT. Le test a été effectué dans un milieu contenant 50 µg de protéines, 100 mM Hepes-Tris pH 7.0, 50 µM (2 µCi) [³H]AdoMet and 1 mM DSIP-isoD comme substrat dans un volume final de 30 µL. La réaction méthyltransférase a été effectuée à 37°C pendant 60 min. Puis, 5 mM d'AdoHcy ont été ajoutés pour arrêter la réaction. L'incorporation de la radioactivité dans le peptide DSIP-isoD a été mesurée en hydrolysant les groupements méthyl ester en utilisant la méthode phase vapeur en équilibre décrite précédemment (Lanthier *et al.*, 2002).

2.2.8 Analyses statistiques

Les analyses densitométriques des protéines immunodétectées ont été réalisées avec un scanner Epson 3490 (Epson Canada Ltée, Toronto, ON, Canada) et avec le programme TotalLab (Dynamique non linéaire, Durham, NC, États-Unis). Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences et les données sont présentées comme la moyenne ± SD. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le « *Student's t-test* » lorsqu'un groupe a été comparé avec le groupe témoin. La comparaison statistique de trois groupes ou plus a été obtenue en utilisant le one-way analysis of variance (ANOVA) suivie par le *Bonferroni test*. Toutes les analyses statistiques ont été obtenues en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, États-Unis). Seulement des différences significatives ($p < 0,05$) sont indiquées sur les figures.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Cinétique de l'expression de la PIMT en présence d'une concentration thérapeutique d'acide valproïque

Récemment, des travaux dans notre laboratoire ont démontré que des traitements avec des concentrations thérapeutiques de lithium et d'acide valproïque, deux médicaments utilisés pour traiter les troubles de l'humeur, augmentent les niveaux de PIMT dans les cellules d'astrocytome humain U-87 MG (Lamarre et Desrosiers, 2008). Les concentrations thérapeutiques d'acide valproïque utilisées pour traiter l'épilepsie varient entre 0,6 et 1 mM (Li *et al.*, 2005). Nous avons donc étudié l'expression de la PIMT dans des cellules U-87 MG traitées avec 1 mM d'acide valproïque durant différents temps.

Les analyses d'immunobuvardage de la PIMT ont indiqué que son expression était significativement augmentée dans les cellules traitées pendant au moins 24 h et que cet effet est maintenu jusqu'à 5 jours, en l'occurrence la plus longue période d'incubation examinée (figure 3.1). De plus, la capacité d'un second agent anti-épileptique à réguler l'expression de la PIMT a également été évaluée. À 100 μM , la carbamazépine (CBZ) stimule l'expression de la PIMT similairement à l'acide valproïque (figure 3.1). Toutefois, les concentrations thérapeutiques de CBZ chez l'humain varient entre 17 et 51 μM (Shen, Elin et Soldin, 2001). L'expression de l' α -tubuline, utilisée comme un contrôle, est restée stable en présence de l'acide valproïque et de CBZ (figure 3.1). Ainsi, les résultats démontrent que l'exposition aux cellules à deux anticonvulsivants, l'acide valproïque et la carbamazépine, à des concentrations similaires à celles utilisées cliniquement, stimule l'expression de la PIMT sur une période de quelques jours.

3.2 L'acide valproïque stimule l'expression de la PIMT dans deux lignées de tumeurs cérébrales

Les effets de l'augmentation de la concentration de l'acide valproïque sur l'expression de la PIMT ont ensuite été étudiés lorsque les cellules ont été incubées avec le médicament pendant 24 h. Des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y en plus des cellules d'astrocytome humain U-87MG ont été employées comme modèles cellulaires dans le but d'étudier l'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque, car ce médicament a des applications thérapeutiques dans des maladies neurologiques telles que le trouble de l'humeur et surtout l'épilepsie. L'induction maximale de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque est d'environ 2 fois par rapport au contrôle et a été atteint avec une concentration de 5 mM avec les cellules U-87 MG (figure 3.2A) et de 1 mM avec les SH-SY5Y (figure 3.2B). L'expression α -tubuline n'a pas été affectée dans ces conditions (figure 3.2A et B). Ainsi, l'acide valproïque stimule l'expression de la PIMT dans deux lignées de cellules cérébrales humaines établissant un lien clair entre les traitements avec l'acide valproïque et l'expression de la PIMT.

3.3 L'acide valproïque augmente l'activité méthyltransférase dans les U-87MG et les SH-SY5Y

Pour confirmer l'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque, son activité enzymatique a été évaluée suite à un traitement avec le médicament. L'activité de la PIMT a été déterminée en utilisant un essai de carboxyméthylation effectué en présence du substrat DSIP-isoD, un peptide synthétique portant un résidu L-isoaspartyl dans sa séquence. Les résultats démontrent que le traitement des cellules avec l'acide valproïque augmente significativement de 2 fois l'activité de la PIMT par rapport aux cellules non traitées dans les deux lignées de cellules, les astrocytomes U-87 MG et les neuroblastomes SH-SY5Y (figure 3.3). Ainsi, l'augmentation similaire de l'expression et de l'activité de la PIMT par l'acide valproïque démontrent que l'enzyme induite est également fonctionnelle.

3.4 L'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque est régie par la voie de signalisation ERK.

Nous avons ensuite étudié les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de la PIMT par l'acide valproïque. D'une part, parmi ses nombreux mécanismes d'action, il a été démontré que l'acide valproïque module différentes cascades de signalisation notamment la voie de ERK. Par exemple, des études ont montré que l'acide valproïque augmente la phosphorylation de ERK1/2 dans le cortex préfrontal et l'hippocampe chez le rat (Einat *et al.*, 2003; Hao *et al.*, 2004) ainsi que dans des cellules en culture (Yuan *et al.*, 2001; Michaelis *et al.*, 2005; Michaelis *et al.*, 2006). Ainsi, nous avons donc examiné si l'induction de la PIMT par l'acide valproïque est contrôlée par la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules U-87 MG.

Comme on pouvait s'y attendre, les traitements avec 5 mM d'acide valproïque pendant 24 h augmentent significativement l'expression de la PIMT d'environ 2 fois (figures 3.4A, B, C et D). De plus, la phosphorylation de ERK-1 (Thr202/Tyr204) et ERK-2 (Thr185/Tyr187) a aussi été significativement induite de 1,7 et 2 fois dans ces conditions (figure 3.4A, B, C et D). Ces observations suggèrent donc que la voie de signalisation de ERK1/2 peut être un mécanisme par lequel l'acide valproïque augmente l'expression de la PIMT. Par conséquent, nous avons testé différents inhibiteurs contre les kinases clés qui régulent ou participant à la voie de signalisation de ERK dans les cellules traitées avec l'acide valproïque.

Dans ces expériences, les cellules U-87 MG ont été traitées avec 5 mM d'acide valproïque durant 24 h en présence ou absence d'inhibiteurs contre Src, c-Raf, MEK1/2 et ERK1/2 et leurs effets ont été suivis avec les niveaux de phosphorylation de ERK1/2. L'activation de la sérine/thréonine kinase c-Raf requiert son ancrage à la membrane par Ras où elle est phosphorylée par les diverses kinases y compris la tyrosine kinase Src (Ziogas, Moelling et Radziwill, 2005). L'inhibition de Src avec le Src kinase inhibitor I, qui interagit avec le site de liaison à l'ATP et les sites de liaison peptidiques, empêche totalement la stimulation de phospho-ERK1/2 et l'induction de la PIMT par l'acide

valproïque (figure 3.4A). De plus, en absence d'acide valproïque, le Src kinase inhibitor I réduit le niveau de base de phosphorylation de ERK1/2 ainsi que le niveau de PIMT (figure 3.4A). Ces résultats montrent que le niveau basal d'expression de la PIMT et celui stimulé par l'acide valproïque sont régulés par la kinase Src et pourraient impliquer la voie de signalisation de ERK.

De plus, pour valider si l'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque dépend de l'activation de la voie de signalisation de ERK, comme en témoigne l'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 en présence d'acide valproïque, des inhibiteurs sélectifs de c-Raf, MEK1/2 et ERK1/2 ont été ensuite utilisés. Ainsi, les cellules ont été pré-traitées avec ZM 336372, un inhibiteur de c-Raf, avec U0126, un inhibiteur connu de MEK1/2 et avec ERK activation peptide I qui se lie à ERK2 et empêche son interaction avec MEK. En effet, les résultats obtenus montrent que tous ces inhibiteurs de kinases impliquées dans la cascade de signalisation de ERK bloquent de façon significative l'augmentation de phosphorylation de ERK1/2 induite par l'acide valproïque (figures 3.4B, C et D). Parallèlement, l'inhibition de l'activation de la voie de ERK par l'acide valproïque est accompagnée par l'inhibition significative de l'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque (figures 3.4B, C et D). Ainsi, ces données soutiennent l'hypothèse que l'acide valproïque stimule l'expression de la PIMT via l'activation de la voie de ERK.

3.5 L'activation de RSK1 par l'acide valproïque dans les cellules U-87MG et SH-SY5Y inhibe GSK-3 β et stimule l'expression de la PIMT

L'augmentation de l'expression et de la phosphorylation de RSK-1 par l'acide valproïque peut dépendre de l'activation de la voie de signalisation de ERK. En effet, la protéine de 90 kDa, RSK-1, est une sérine/thréonine kinase activée en aval de ERK1/2 et est une des principales protéines effectrices pour les multiples effets de transduction de cette voie (Carriere *et al.*, 2008). Lorsque ERK1/2 est activée, RSK-1 est phosphorylée sur son résidu Thr573 puis sur ceux de Thr359 et Ser363 situés dans la région liant les deux domaines kinasiques (Dalby *et al.*, 1998).

Un anticorps reconnaissant à la fois les résidus Thr359/Ser363 phosphorylés a donc été utilisé pour étudier le lien entre l'activation de la voie ERK par l'acide valproïque et l'état de phosphorylation RSK-1. Lorsque les cellules d'astrocytome U-87 MG et de neuroblastome SH-SY5Y ont été incubées en présence d'acide valproïque, des niveaux similaires et significatifs d'induction d'environ 2 fois de la phosphorylation de ERK1/2 et la phosphorylation de RSK-1 ont été observés pour les deux lignées cellulaires (figures 3.5A et B). Contrairement à l'expression de ERK1/2 qui est demeurée stable, celle de RSK-1 a été sensiblement augmentée de 1,6 fois en présence d'acide valproïque dans les deux lignées cellulaires (figures 3.5A et B).

D'autre part, avec les cellules pré-traitées avec U0126 pour inhiber MEK1/2, nous observons, tel que prévu, une inhibition de l'induction de la phosphorylation de ERK1/2 par l'acide valproïque (figures 3.5A et B). De plus, l'inhibition de MEK1/2 par U0126 empêche l'induction de l'expression de RSK-1 stimulée par l'acide valproïque, mais provoque surtout l'abrogation de la phosphorylation RSK-1 à des niveaux près de la moitié de ceux observés dans les conditions contrôles (figures 3.5A et B). Par ailleurs, l'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque a également été partiellement bloquée suite à l'inhibition de MEK1/2 dans les cellules de neuroblastomes SH-SY5Y et d'astrocytomes U-87 MG (figures 3.5A et B). Ensemble, ces résultats suggèrent que l'induction de la PIMT par l'acide valproïque se produit via l'activation de la voie de ERK et de son effecteur RSK-1 situé en aval.

Également, l'acide valproïque, via la signalisation de ERK, inhibe GSK-3 et stabilise β -caténine. Effectivement, il a récemment été démontré dans notre laboratoire que le traitement avec l'acide valproïque ou le lithium durant une heure stimule l'expression de la PIMT. Cette augmentation implique l'inhibition de GSK-3 β via sa phosphorylation sur la Ser9 ainsi que l'accumulation de la β -caténine dans les cellules U-87 MG (Lamarre et Desrosiers, 2008). D'autres études ont aussi démontré que RSK-1 peut phosphoryler GSK-3 β sur la Ser9 *in vitro* (Stambolic et Woodgett, 1994) et que ERK1/2, via RSK-1, induit également la phosphorylation sur la Ser9 de GSK-3 β (Ding *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent ainsi que

l'induction de la PIMT par l'acide valproïque, via l'inhibition de GSK-3 et l'accumulation de la β -caténine, peut être due à l'activation de la voie de ERK.

Afin d'obtenir de plus amples informations sur les mécanismes moléculaires régissant l'augmentation de l'expression de la PIMT par le médicament, nous avons utilisé un anticorps contre la forme phosphorylée de GSK-3 β (Ser9) pour suivre son état d'inhibition. L'incubation des cellules U-87 MG avec l'acide valproïque, 5 mM pour 24 h, stimule significativement la phosphorylation de GSK-3 β sur la Ser9 de 2,7 fois et entraîne une accumulation importante de la β -caténine de 1,8 fois (figure 3.5A), ce qui est en accord avec les résultats antérieurs obtenus (Lamarre et Desrosiers, 2008). De plus, des résultats similaires ont été observés pour la phosphorylation de GSK-3 β sur la Ser9 et pour les niveaux d'expression de la β -caténine dans les cellules de neuroblastomes SH-SY5Y traitées avec l'acide valproïque (figure 3.5B). Parallèlement, les niveaux de phosphorylation de GSK-3 β et d'expression de β -caténine ont été significativement diminués (figures 3.5A et B) lorsque les deux lignées cellulaires ont été pré-incubées avec l'inhibiteur de MEK1/2, le U0126, et ensuite traités avec l'acide valproïque. Ces résultats appuie l'hypothèse que l'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque est dépendante de GSK-3 β / β -caténine, elle même contrôlée par l'activation de RSK-1 via ERK1/2.

3.6 L'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque via GSK-3 β / β -caténine requiert RSK-1.

Ayant démontré que la stimulation de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque est dépendante de l'activation de ERK1/2 et RSK-1 (figure 3.5), nous avons décidé d'évaluer plus précisément la contribution de RSK-1 dans la régulation de la PIMT. D'une part, les cellules U-87 MG ont été transfectées avec différents ARN interférants contre l'ARNm de RSK-1 à 20 nM pendant 48 h dans le but d'identifier le plus efficace. L'analyse densitométrique des immunobuvardage a démontré que tous les siRNA testés réduisent les niveaux protéiniques de RSK-1 et que le siRNA # 3 est le plus efficace

avec une inhibition de 66% (figure 3.6A). Aucun effet n'a été observé sur RSK-1 avec le contrôle siRNA (figure 3.6A).

Ensuite, les cellules d'astrocytomes U-87 MG et de neuroblastomes SH-SY5Y ont été traitées ou non avec le meilleur siRNA contre RSK-1 et la capacité de l'acide valproïque à réguler la voie de GSK-3 β / β -caténine et la PIMT a été analysée. Les analyses montrent qu'un traitement avec le siRNA bloque l'augmentation de l'expression et de la phosphorylation de RSK-1 habituellement observée en présence d'acide valproïque (figures 3.6B et C). En plus, dans ces mêmes conditions, l'augmentation de la phosphorylation de GSK-3 β et l'accumulation de la β -caténine observées en présence d'acide valproïque ont été aussi fortement inhibées (figures 3.6B et C). En l'occurrence, l'induction de la PIMT par le médicament a également été bloquée dans les deux lignées de cellules (figures 3.6B et C). Ainsi, ces données confirment que l'acide valproïque requiert RSK-1 pour réguler la voie de GSK-3 β / β -caténine et pour stimuler l'expression de la PIMT.

Par la suite, nous avons étudié la contribution de la RSK-1 sur le niveau de base de l'expression de la PIMT. Lorsque les cellules d'astrocytomes U-87 MG et de neuroblastomes SH-SY5Y ont été traitées avec un siRNA contre RSK-1, les niveaux d'expression de la PIMT ont été réduits respectivement de 35% et à 43% (figures 3.6B et C). Ces résultats démontrent que RSK-1 joue un rôle clé dans la stimulation d'expression de la PIMT par l'acide valproïque, mais également dans sa régulation en absence d'acide valproïque.

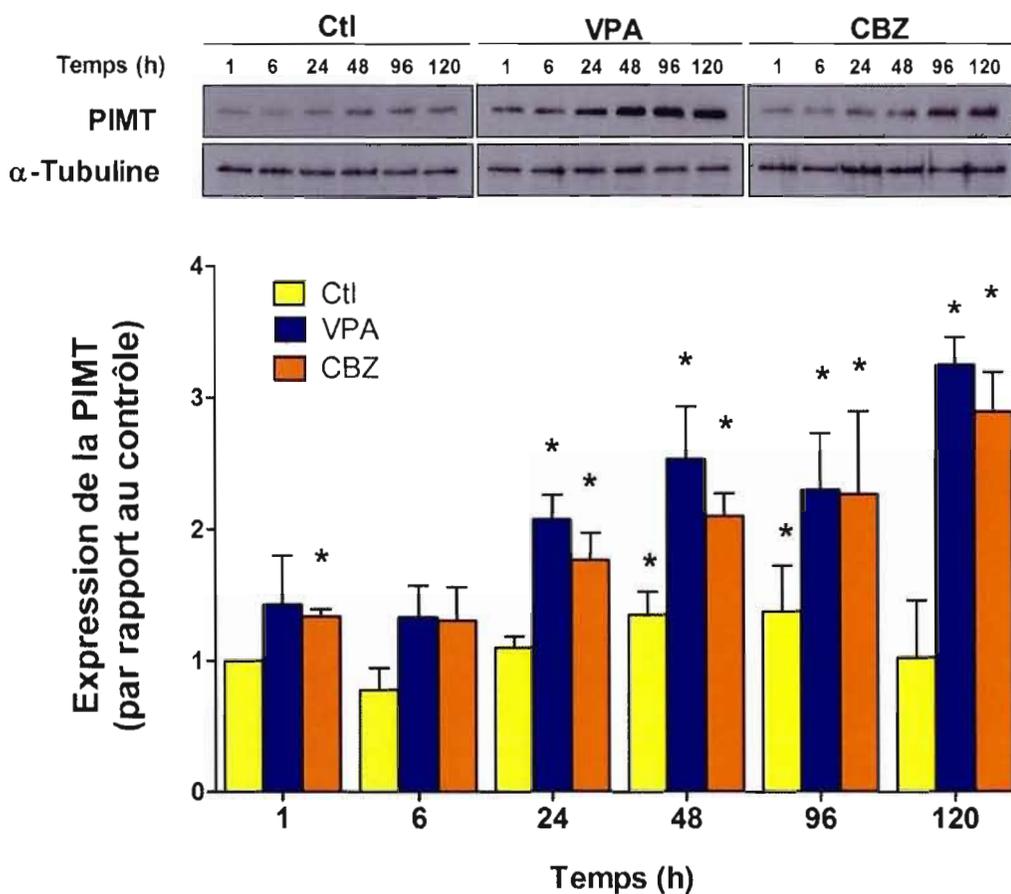


Figure 3.1 Cinétique de l'expression de la PIMT en présence d'une concentration thérapeutique d'acide valproïque. Les cellules U-87 MG ont été incubées avec ou sans (Ctl) 1 mM VPA et 100 μ M CBZ pour différentes périodes de temps. L'expression de la PIMT et de l' α -tubuline des lysats cellulaires a été analysée par SDS-PAGE et immunobuvardage de type western. L'histogramme représente l'expression de la PIMT dans les cellules traitées avec VPA et CBZ par rapport à l'expression de la PIMT dans les cellules non traitées, calculée suite à l'analyse densitométrique des protéines immunodétectées. Chaque colonne représente la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le student's t test indique les valeurs significativement différentes (* $p < 0.05$) des cellules contrôles pour la même période d'incubation.

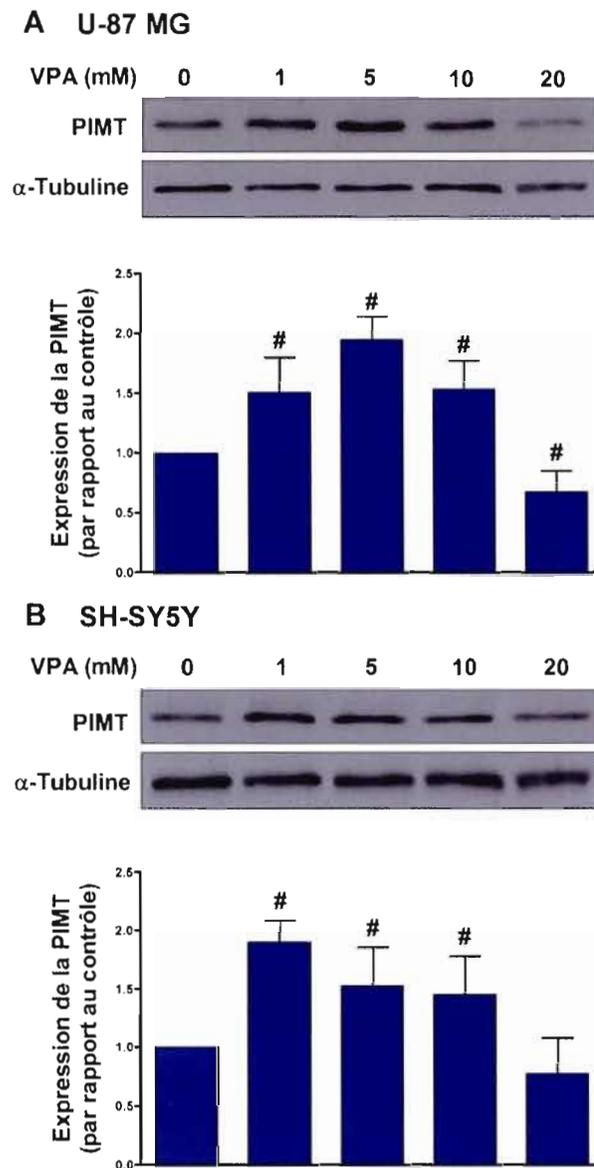


Figure 3.2 L'acide valproïque stimule l'expression de la PIMT dans deux lignées de tumeurs cérébrales humaines. Les cellules U-87 MG (A) et les cellules SH-SY5Y (B) ont été incubées avec les concentrations de VPA indiquées durant 24 h. Les protéines ont été soumises à une électrophorèse SDS-PAGE et l'expression de la PIMT et de l' α -tubuline ont été analysées par immunobuvardage de type Western. Les histogrammes représentent le ratio du niveau de PIMT dans les cellules traitées par rapport à celui dans les cellules témoins, calculés par analyse densitométrique. Chaque colonne représente la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. L'analyse One-way ANOVA suivi du test de Bonferroni indique les valeurs significativement différentes (# $p < 0.05$) de celles mesurées dans les cellules non traitées.

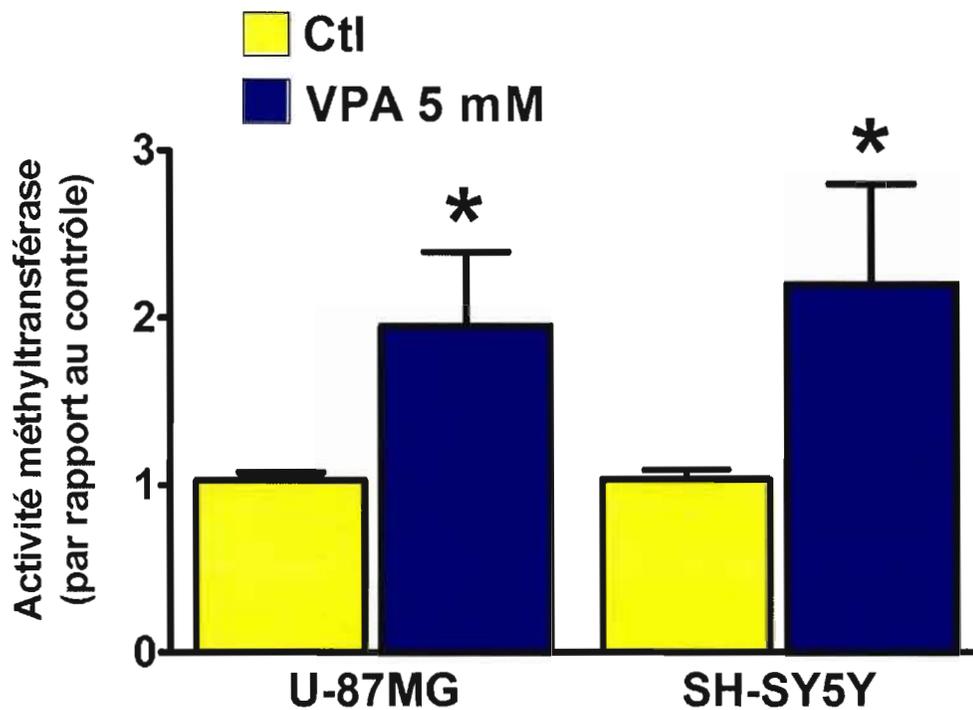


Figure 3.3 L'acide valproïque augmente l'activité méthyltransférase dans les U-87MG et les SH-SY5Y. Les lysats des cellules traitées avec 5 mM VPA durant 24 h et des cellules contrôles (Ctl) ont été utilisés pour mesurer l'activité de la PIMT. L'incorporation de groupements méthyles de l' $[^3\text{H}]$ AdoMet dans le substrat DSIP-isoD a été mesurée par la méthode de diffusion du méthanol radioactif. Ces résultats sont représentatifs de trois essais effectués en triplicata et chaque colonne représente la moyenne \pm SEM. Le student t test indique les valeurs significativement différentes (* $p < 0.05$) des cellules contrôles pour la même période d'incubation.

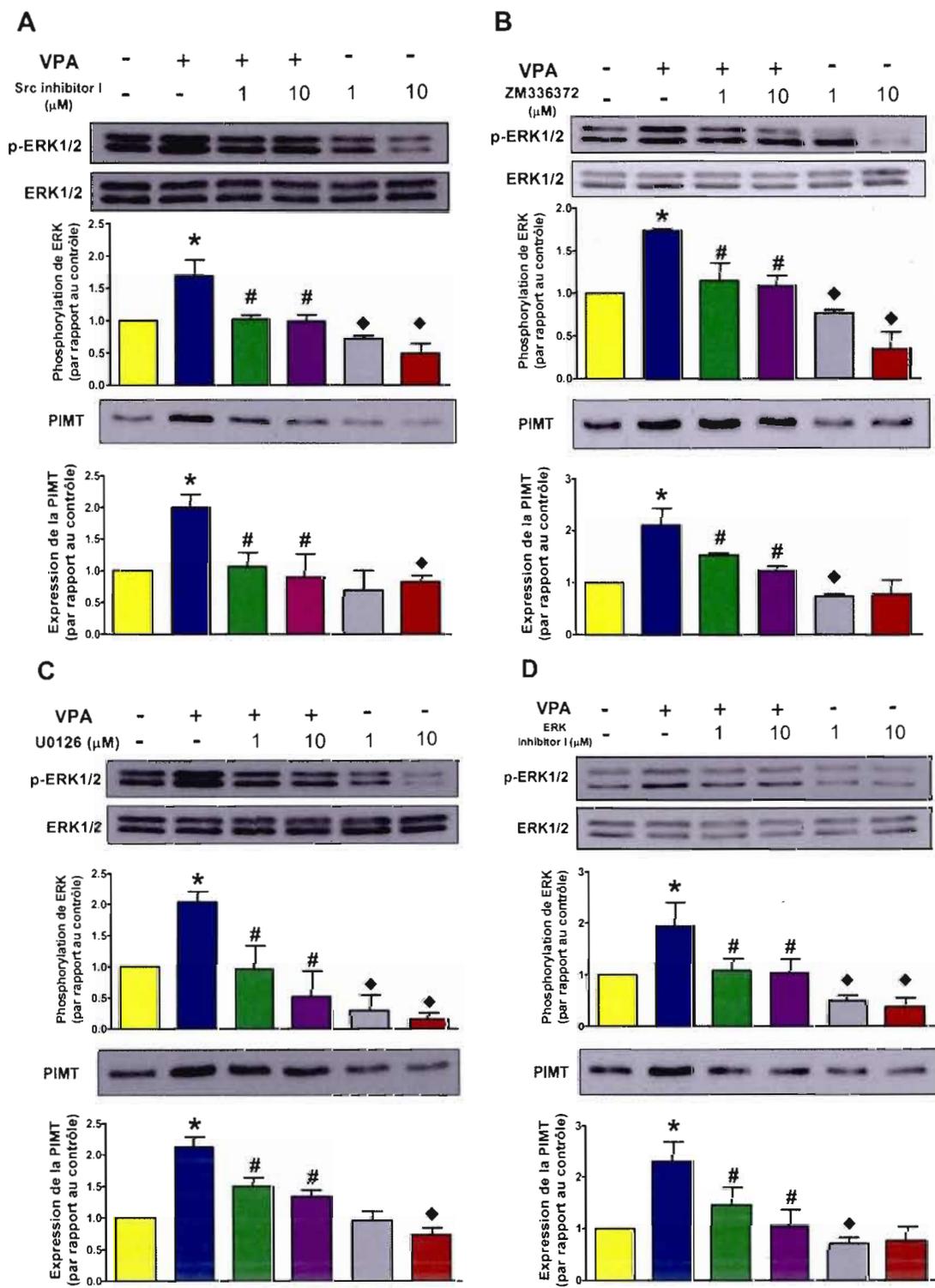
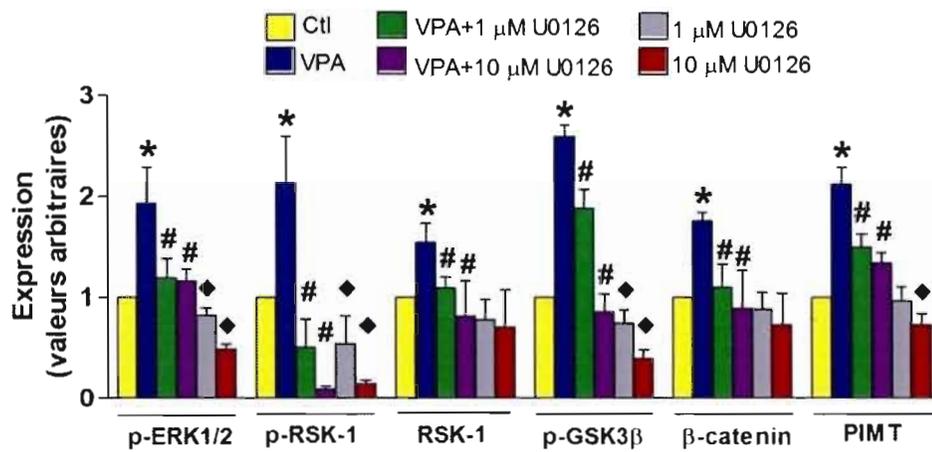
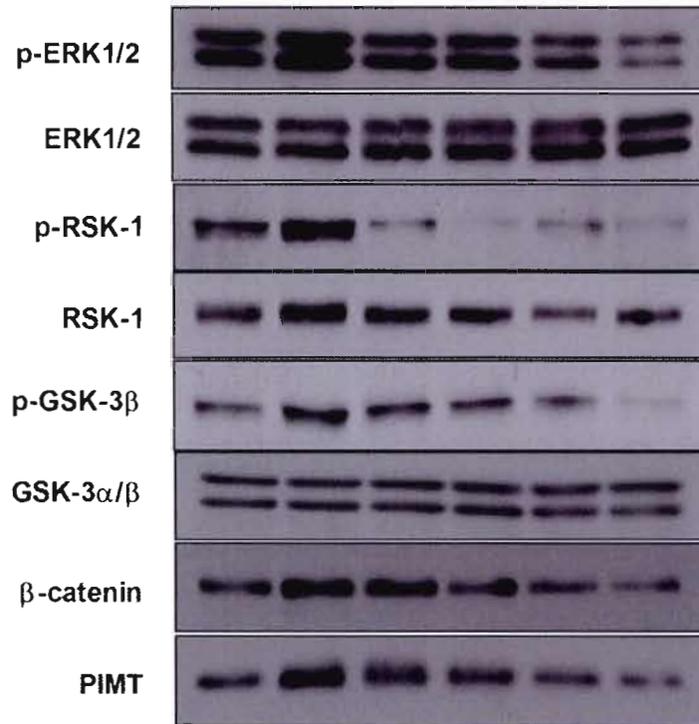


Figure 3.4 L'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque est dépendante de la voie de signalisation ERK. Les cellules U-87 MG ont été pré-incubées durant 1 h avec 1 ou 10 μM de *Src kinase inhibitor I* (A), ZM 336372 (B), U0126 (C) et ERK activation inhibitor peptide I (D). Le véhicule, DMSO, a été utilisé comme contrôle dans les cellules non traitées. Les cellules ont ensuite été incubées avec ou sans 5 mM VPA pour 24 h. Les cellules ont été lysées et les protéines ont été soumises à une électrophorèse SDS-PAGE. L'expression de ERK1/2 phosphorylé (p-ERK1/2), de ERK1/2 et de la PIMT a été analysée par immunobuvardage de type western. Les histogrammes représentent le ratio des niveaux des protéines des cellules traitées par rapport aux cellules contrôles, calculé par analyse densitométrique. Les deux isoformes phosphorylées de ERK ont été considérées comme une pour les analyses densitométriques. Chaque colonne représente la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le student t test indique les valeurs significativement différentes (* $p < 0.05$) des cellules traitées avec VPA par rapport aux cellules contrôles pour la même période d'incubation. L'analyse One-way ANOVA suivi du test de Bonferroni indique les valeurs significativement différentes par rapport aux cellules traitées avec VPA seulement (# $p < 0.05$) ou des cellules non traitées ($\diamond p < 0.05$).

A U-87 MG

VPA	-	+	+	+	-	-
U0126 (μ M)	-	-	1	10	1	10



B SH-SY5Y

VPA	-	+	+	+	-	-
U0126 (μ M)	-	-	1	10	1	10

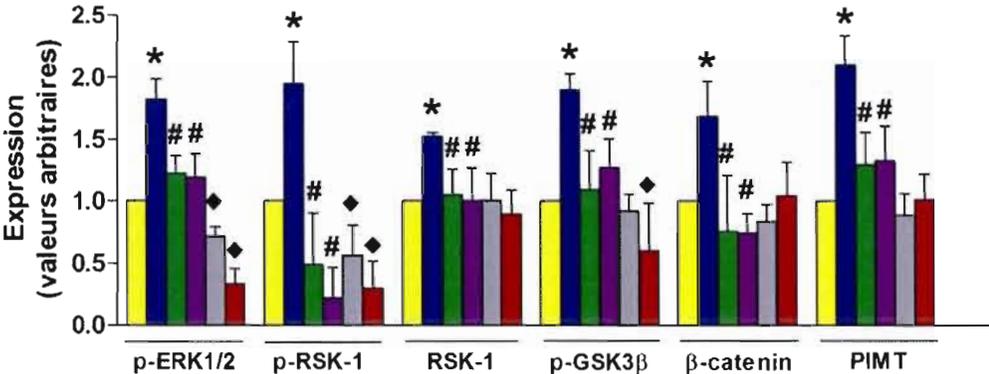
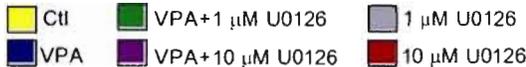
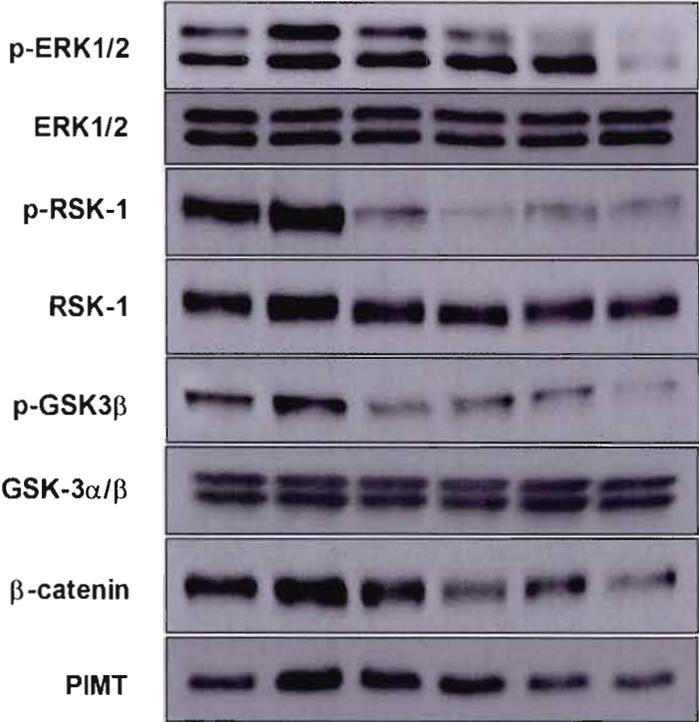
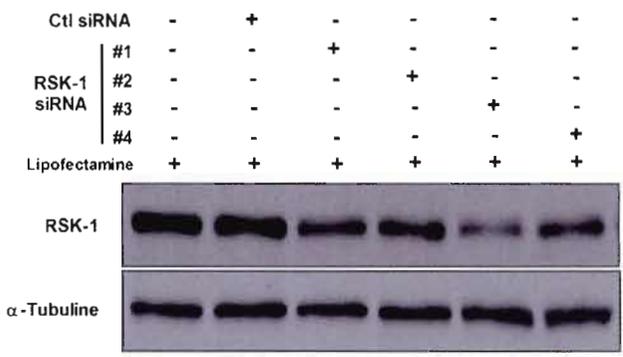
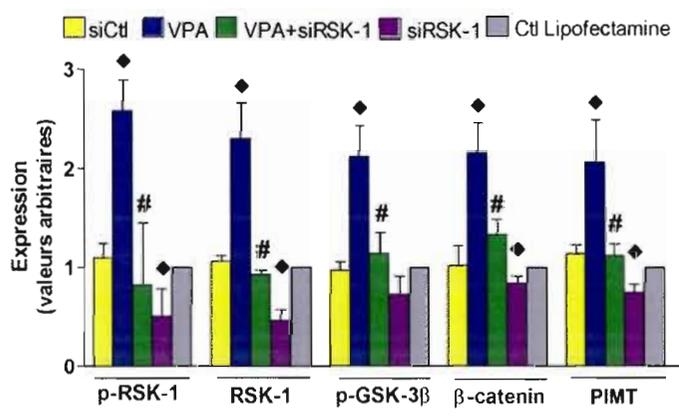
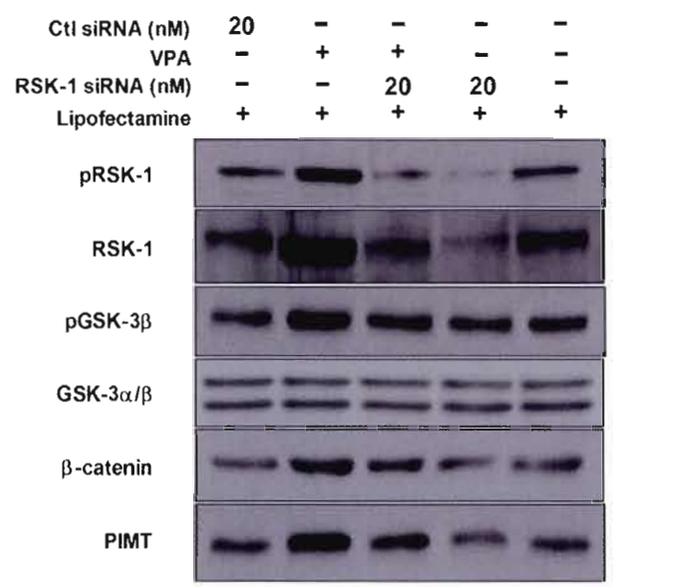


Figure 3.5 L'activation de RSK1 par l'acide valproïque dans les cellules U-87MG et SH-SY5Y inhibe GSK-3 β et stimule l'expression de la PIMT. Les cellules U-87 MG (A) et les cellules SH-SY5Y (B) ont été pré-incubées avec 1 ou 10 μ M U0126 pendant 1 h pour inhiber l'activité de la kinase MEK1/2. Le véhicule DMSO a été ajouté aux cellules contrôles. Les cellules ont ensuite été traitées avec ou sans 5 mM VPA pour 24 h. Les cellules ont été lysées et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. Après le transfert, les membranes PVDF ont été incubées avec les différents anticorps pour immunodétecter ERK1/2 phosphorylé (p-ERK1/2), ERK1/2, RSK-1 phosphorylée (p-RSK-1), RSK-1, GSK-3 β phosphorylées (p-GSK-3 β), GSK-3 α/β , β -caténine et la PIMT. Les histogrammes représentent le ratio des niveaux des protéines des cellules traitées par rapport aux cellules contrôles, calculés par analyse densitométrique. Les deux isoformes phosphorylées de ERK ont été considérées comme une seule pour les analyses densitométriques. Chaque colonne représente la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le student t test indique les valeurs significativement différentes (* $p < 0.05$) des cellules traitées avec VPA par rapport aux cellules contrôles pour la même période d'incubation. L'analyse One-way ANOVA suivie du test de Bonferroni indique les valeurs significativement différentes (# $p < 0.05$) des cellules traitées avec VPA seulement ou des cellules non traitées ($\blacklozenge p < 0.05$).

A

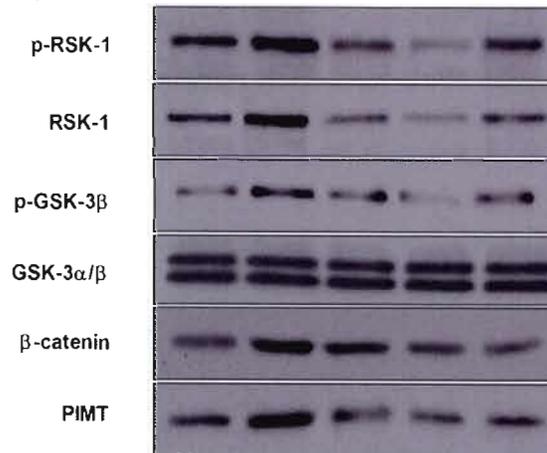


B U-87 MG



C SH-SY5Y

Ctl siRNA (nM)	20	-	-	-	-
VPA	-	+	+	-	-
RSK-1 siRNA (nM)	-	-	20	20	-
Lipofectamine	+	+	+	+	+



■ siCtl
 ■ VPA
 ■ VPA+siRSK-1
 ■ siRSK-1
 ■ Ctl Lipofectamine

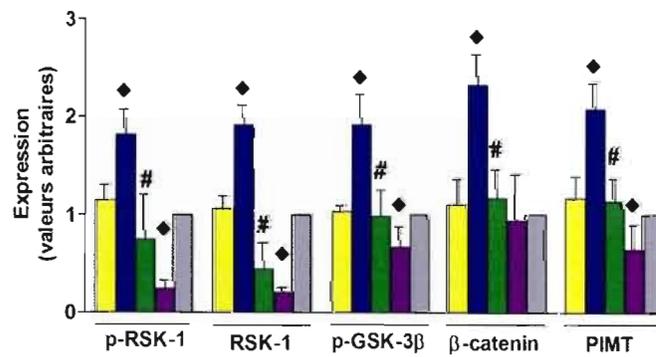


Figure 3.6 L'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque via GSK-3 β / β -caténine requiert RSK-1. (A) Les cellules U-87 MG ont été transfectées avec quatre différents ARN interférents dirigés contre RSK-1 ou avec un ARN interférent contrôle négatif (Ctl siRNA) à la concentration de 20 nM durant 48 h. Les cellules contrôles ont été maintenues en présence de lipofectamine. Lorsque les cellules ont été traitées avec le contrôle siRNA (fluorescein conjugate)-A, l'efficacité de transfection était d'environ 80%. Les lysats cellulaires ont été analysés par immunobuvardage de type Western avec un anticorps contre RSK-1. Ensuite, les cellules U-87 MG (B) et SH-SY5Y (C) ont été incubées avec 20 nM siRNA # 3 contre RSK-1 ou un siRNA contrôle négatif pendant 48 h. De la lipofectamine a été ajoutée aux cellules contrôles. Puis, les cellules ont été traitées avec ou sans 5 mM VPA durant 24 h. Les protéines des lysats cellulaires ont été séparées par SDS-PAGE et l'expression de RSK-1 phosphorylé (p-RSK-1), RSK-1, GSK-3 β phosphorylé (p-GSK-3 β), GSK-3 α/β , β -catenin et la PIMT a été analysée par immunobuvardage de type Western. Les histogrammes représentent le ratio des niveaux des protéines des cellules traitées par rapport aux cellules contrôles, calculé par analyse densitométrique. Les cellules incubées avec la lipofectamine ont servi de contrôle pour celles traitées avec VPA et les cellules incubées avec le contrôle siRNA ont été utilisées comme contrôle pour les cellules traitées avec le siRNA contre RSK-1. Chaque colonne représente la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le student t test indique les valeurs significativement différentes des cellules traitées avec le siRNA contre RSK-1 plus VPA de celles des cellules traitées avec VPA seulement (# $p < 0.05$) pour la même période d'incubation. L'analyse One-way ANOVA suivit du test de Bonferroni indique les valeurs significativement différentes des cellules incubées avec la lipofectamine seulement ($\blacklozenge p < 0.05$).

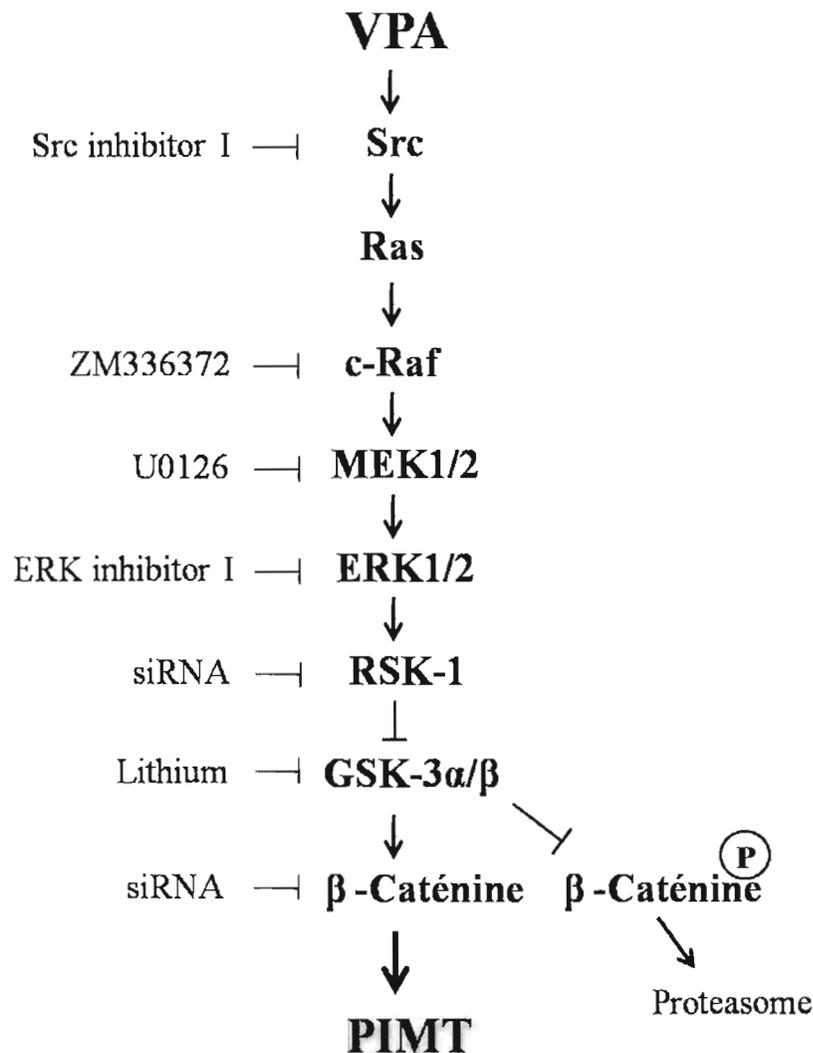


Figure 3.7 Représentation schématique des voies de signalisation responsable de l'induction de la PIMT par l'acide valproïque. L'activation de la voie de signalisation de ERK par VPA conduit à une augmentation de l'expression de RSK-1 et de sa phosphorylation au niveau des résidus Thr359/Ser363. La stimulation de RSK-1 inhibe GSK-3 β via sa phosphorylation sur la Ser9, ce qui favorise 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. Ce modèle est construit selon les résultats précédemment publiés dans notre laboratoire et ceux de la présente étude qui démontrent l'inhibition de l'expression de la PIMT stimulée par VPA obtenue avec des inhibiteurs directs contre les kinases Src, c-Raf, MEK1/2 et ERK1/2 ainsi qu'avec des siRNA contre RSK-1 et β -caténine. Alternativement, l'inhibition de GSK-3 par des inhibiteurs pharmacologiques comme le lithium stimule l'expression de la PIMT mimant la phosphorylation de GSK-3 dépendante de RSK-1.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La principale fonction connue de la PIMT est de réparer les protéines anormales ayant des résidus L-isoaspartyls comme il a été démontré pour le collagène de type I isolé de rats âgés (Lanthier et Desrosiers, 2004). En plus de s'accumuler avec l'âge, ces protéines anormales sont également associées à différents troubles neurologiques, ce qui suggère que la PIMT pourrait jouer un rôle essentiel dans diverses pathologies humaines telles la maladie d'Alzheimer (Shimizu et al, 2000), les tumeurs cérébrales (Lapointe et al, 2005) et l'épilepsie (Kim et al, 1997; Yamamoto, Takagi et Kitamura, 1998; Lanthier et al, 2002). Par exemple, il a été rapporté dans notre laboratoire que les niveaux d'expression de la PIMT sont 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). Ces données suggèrent donc qu'une déficience de PIMT pourrait favoriser l'accumulation de protéines anormales avec des résidus L-isoaspartyl qui pourraient, notamment, contribuer à l'étiologie ou à la progression de l'épilepsie. La pertinence de la fonction de la PIMT dans le cerveau est bien illustrée avec les souris déficientes pour la PIMT qui accumulent fortement les protéines avec des résidus L-isoaspartyls dans les fractions cytosoliques du cerveau (Kim *et al.*, 1997) et meurent de crises tonico-cloniques (Kim *et al.*, 1997; Yamamoto, Takagi et Kitamura, 1998). Ensemble, ces résultats illustrent ainsi l'importance d'étudier davantage les mécanismes moléculaires qui participent à la régulation de la PIMT, ce qui aidera à mieux comprendre son rôle dans l'épilepsie et probablement dans d'autres maladies neurologiques.

Récemment, il a été constaté dans notre laboratoire qu'un traitement de 1 h à des concentrations thérapeutiques d'acide valproïque et de lithium, deux médicaments possédant des propriétés pour stabiliser l'humeur, stimulent l'expression de la PIMT dans les cellules d'astrocytomes U-87 MG (Lamarre et Desrosiers, 2008). Ici, nous démontrons que l'expression et l'activité enzymatique de la PIMT sont augmentées par

l'acide valproïque dans deux lignées cellulaires de cerveau humain, les astrocytomes U-87 MG et les neuroblastomes SH-SY5Y. L'induction de l'expression de la PIMT est dépendante à la fois des concentrations et du temps d'incubation en présence d'acide valproïque. L'expression de la PIMT est aussi augmentée par CBZ, un autre anticonvulsivant. La figure 3.7 résume les voies de signalisation démontrées dans cette étude ainsi que celles précédemment identifiées (Lamarre et Desrosiers, 2008) activées par l'acide valproïque et stimulant l'expression de la PIMT. Donc, nous démontrons dans cette étude que l'acide valproïque 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. Les inhibiteurs dirigés contre Src, c-Raf, MEK1/2 et ERK1/2 suppriment l'activation de ERK1/2 par l'acide valproïque ce qui bloque l'induction de la PIMT par le médicament. En outre, l'inhibition de MEK1/2 avec U0126 en co-traitement avec l'acide valproïque empêche l'augmentation de la phosphorylation de RSK-1 sur la Thr359/Ser363 et de GSK-3 β sur la Ser9 ainsi que l'augmentation de l'expression de RSK-1, de β -caténine et de la PIMT. De plus, les traitements avec un siRNA contre RSK-1 bloquent l'augmentation de l'expression de RSK-1, β -caténine et de la PIMT ainsi que l'augmentation de la phosphorylation de RSK-1 sur les résidus Thr359/Ser363 et de GSK-3 β sur la Ser9 induite par l'acide valproïque. Précédemment, il a été démontré dans notre laboratoire que l'inhibition pharmacologique de GSK-3 qui conduit à l'accumulation de la β -caténine augmente subséquemment l'expression de la PIMT, puisque la dégradation protéosomale de la β -caténine qui se produit suite à sa phosphorylation par GSK-3 est bloquée (Lamarre et Desrosiers, 2008). En outre, il a aussi été démontré que l'inhibition de la β -caténine par ARN interférant inhibe l'expression de la PIMT en présence ou en absence d'acide valproïque et de lithium (Lamarre et Desrosiers, 2008). Ainsi, nos résultats montrent que l'induction de la PIMT par l'acide valproïque dépend de l'activation de la voie de signalisation de ERK1/2, où son effecteur RSK-1 est un médiateur important, car il est responsable de l'inactivation de GSK-3 ainsi que de la stabilisation de la β -caténine.

La capacité de l'acide valproïque à activer la voie de signalisation de ERK dans les cellules d'astrocytomes et de neuroblastomes est en accord avec les travaux précédents montrant des réponses similaires dans le cortex préfrontal et l'hippocampe chez le rat (Einat *et al.*, 2003; Hao *et al.*, 2004), dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y (Yuan *et al.*, 2001), dans les cellules épithéliales pigmentées de la rétine (Michaelis *et al.*, 2005) et dans les cellules endothéliales (Michaelis *et al.*, 2006). Toutefois, les mécanismes moléculaires en amont conduisant à l'activation de la voie de ERK par l'acide valproïque demeurent incompris. Dans cette étude, nous avons constaté que l'inhibition de Src supprime totalement l'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 et l'expression de la PIMT provoqués par l'acide valproïque. Ainsi, ces données sont en accord avec l'hypothèse que l'activation des deux processus pourrait être contrôlée par la kinase Src. La famille de protéin-tyrosine kinases non-récepteurs Src est largement exprimée dans les neurones et joue un rôle essentiel dans la plasticité synaptique (Kalia, Gingrich et Salter, 2004). La kinase Src est nécessaire à l'activation de c-Raf par sa phosphorylation sur la Tyr341 (Mason *et al.*, 1999) permettant l'activation de la voie de signalisation de ERK. Ainsi, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de l'acide valproïque au cours du traitement de l'épilepsie et au niveau de l'induction de la PIMT, il serait pertinent d'enquêter dans des expériences futures comment ce médicament affecte la kinase Src, tel son état de phosphorylation sur les résidus Tyr416 et Tyr527, son recrutement et son association avec des protéines membranaires ainsi que ses interactions protéiniques au niveau de complexes de signalisation.

L'ajout de l'acide valproïque aux cellules U-87 MG et SH-SY5Y entraîne une augmentation de phosphorylation de RSK-1 qui coïncide avec celle de ERK1/2. Ces inductions sont néanmoins bloquées avec l'inhibition de MEK1/2 par U0126, ce qui est en accord avec la phosphorylation de RSK-1 qui est dépendante de ERK (Carriere *et al.*, 2008). De plus, des augmentations similaires et significatives, d'environ 2 fois des niveaux d'expression et de phosphorylation de RSK-1 sur les résidus Thr359/Ser363 sont observées en présence d'acide valproïque. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la phosphorylation de RSK-1, via l'activation de ERK, dans les cellules traitées avec l'acide valproïque reflète probablement l'abondance accrue de

RSK-1. D'ailleurs, plusieurs autres mécanismes pourraient expliquer l'accumulation de RSK-1 induit par l'acide valproïque tels que l'augmentation de la transcription ou de la transduction de l'ARNm ou une plus grande stabilité de la protéine ou de l'ARNm. Toutefois, les mécanismes d'action exacts activés par l'acide valproïque étant responsables de l'accumulation de RSK-1 restent à investiguer.

Néanmoins, les résultats montrent que l'induction de la PIMT par l'acide valproïque implique l'activité de RSK puisque l'effet du médicament est bloqué suite à l'inhibition de RSK-1 par ARN interférant. De plus, le niveau basal de PIMT est également diminué respectivement de 35% et 43% dans les cellules U-87 MG et SH-SY5Y traitées avec le siRNA contre RSK-1 pendant 48 h. Ensemble, ces données soutiennent l'hypothèse que RSK-1 est un régulateur clé de l'expression de la PIMT en condition basale et en réponse à l'acide valproïque. Les différentes isoformes de RSK sont activées par une multitude de molécules de signalisation extracellulaire tels que les facteurs de croissance, les hormones peptidiques, les neurotransmetteurs ainsi que par d'autres stimuli (Frödin et Gammeltoft, 1999; Carriere *et al.*, 2008). Toutefois, la principale kinase située en amont et responsable de l'activation de RSK demeure ERK1/2. De ce fait, nous avons démontré que RSK-1 est l'un des principaux effecteurs en aval de l'activation de ERK1/2 suite au traitement d'acide valproïque et ce dernier est requis pour l'induction de l'expression de la PIMT. Les membres de la famille des RSK sont impliqués dans une multitude de processus biologiques, y compris la régulation du cycle cellulaire, la survie cellulaire, la signalisation nucléaire et la transcription des gènes. En plus des facteurs de transcription qui sont des substrats de RSK, la régulation de l'expression des gènes par RSK peut également se produire indirectement par l'intermédiaire de la phosphorylation et l'inhibition de GSK-3, ce qui favorise l'accumulation nucléaire de la β -caténine (Stambolic et Woodgett, 1994; Ding *et al.*, 2005). Conséquemment, il a été démontré dans notre laboratoire que l'induction de l'ARNm de la PIMT par l'acide valproïque est abolie par l'actinomycine D (Lamarre et Desrosiers, 2008), ce qui suggère que la transcription du gène de la PIMT est induite par le médicament. Ici, nous démontrons que RSK-1 est donc une kinase pivot dans l'induction de l'expression de la PIMT en réponse à l'acide valproïque. Effectivement,

suite à l'inhibition de RSK-1 par ARN interférant, nos résultats montrent clairement qu'il existe un lien entre la voie de ERK et la voie de GSK-3/ β -caténine pour stimuler l'expression de la PIMT suite au traitement avec le médicament anti-épileptique acide valproïque.

En plus d'être l'un des anticonvulsivants le plus fréquemment prescrit, l'acide valproïque est également utilisé pour le traitement de plusieurs affections neurologiques non-épileptiques comme la douleur neuropathique, la migraine ainsi que les troubles psychiatriques, y compris l'anxiété, la schizophrénie et le trouble bipolaire (Bowden, 2007). Suite à nos résultats démontrant la stimulation de la voie de ERK et la voie de GSK-3/ β -caténine (Lamarre et Desrosiers, 2008) par l'acide valproïque, on peut postuler que la modulation de ces voies de signalisation par l'acide valproïque stimule probablement l'expression de la protéine de réparation PIMT dans les différents troubles psychiatriques où ce médicament anti-épileptique est utilisé. Cela est corroboré par les constatations qu'à la fois l'acide valproïque et le lithium, employés comme stabilisateurs d'humeur pour traiter le trouble bipolaire, augmentent l'expression de la PIMT (Lamarre et Desrosiers, 2008). En revanche, il pourrait être pertinent d'étudier si l'expression de la PIMT est réduite chez des patients souffrant de divers troubles psychiatriques en plus de l'épilepsie (Lanthier *et al.*, 2002). Cela ouvre de nouvelles voies de recherche pour étudier la dérégulation des mécanismes biochimiques qui sont impliqués dans différents troubles psychiatriques. En raison du fait que la PIMT joue un rôle essentiel à travers la réparation des protéines endommagées au niveau des résidus L-isoaspartyls et qu'elle est le plus fortement exprimée dans le cerveau, des études supplémentaires seraient nécessaires pour identifier des substrats de la PIMT dans les désordres psychiatriques ou dans des maladies neurologiques comme l'épilepsie et les désordres bipolaires qui sont traités avec l'acide valproïque. Les protéines altérées pourraient contribuer au développement de ces différents troubles psychiatriques ou de maladies neurologiques. Leur identification favoriserait la compréhension des mécanismes d'action de la PIMT suite à son induction par le traitement avec l'acide valproïque.

CONCLUSION

La protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase est une enzyme de réparation des protéines endommagées qui, comme son nom l'indique, permet le transfert d'un groupement méthyle sur un résidu L-isoaspartate. Au cours du vieillissement, les protéines ont tendance à accumuler davantage de tels dommages, de sorte que le rôle de la PIMT devient fondamental avec le temps. Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré l'implication de cette protéine dans plusieurs maladies neurologiques et ont ainsi illustré l'importance de cette protéine dans la cellule. Il devient donc essentiel d'identifier les voies de signalisation qui régissent les fonctions de cette protéine. À cet effet, notre étude a permis d'établir un lien entre la voie de ERK et la PIMT. Ainsi, nous avons démontré que l'inhibition de la voie de ERK avec différents inhibiteurs pharmacologiques bloque significativement l'augmentation de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque dans deux lignées de cellules cérébrales, les astrocytomes U-87 et les neuroblastomes SH-SY5Y. De plus, l'augmentation de la PIMT par l'acide valproïque est abrogée par un ARN interférent contre RSK-1 et dans ces conditions, l'induction de phospho- GSK-3 β et β -caténine est inhibée. Ainsi, nos résultats démontrent que l'induction de l'expression de la PIMT par l'acide valproïque requiert l'activation de la voie de ERK1/2 incluant RSK-1 qui est responsable de l'inactivation de GSK-3 et en occurrence, la stabilisation de la β -caténine. On peut donc postuler que la modulation de ces voies de signalisation par l'acide valproïque stimule probablement l'expression de la protéine de réparation PIMT dans les différents troubles psychiatriques où ce médicament anti-épileptique est utilisé. Somme toute, cette nouvelle voie de signalisation régulant l'expression de la PIMT ouvre la porte à de nouvelles hypothèses, à savoir si la réparation des protéines endommagées par la PIMT, via la cascade de signalisation ERK/RSK-1/GSK-3 β / β -caténine, est impliquée dans d'autres processus cellulaire ou dans d'autres troubles neurologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 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. 10714-10721.
- Aswad, D. W. 1995. «Purification and properties of protein L-isoaspartyl methyltransferase». In *Deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins*, sous la dir. de D. W. Aswad (éd.), p. 31-46. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Aswad, D. W., Paranandi, M. V. et B. T. Schurter. 2000. «Isoaspartate in peptides and proteins : formation, significance, and analysis». *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 21, p. 1129-1136.
- Axelrod, J. et J. Daly. 1965. «Pituitary gland: enzymic formation of methanol from S-adenosylmethionine». *Science*, vol. 150, p. 892-893.
- Barten, D. M. et R. F. O'Dea. 1990. «The function of protein carboxyl methyltransferase in eucaryotic cells». *Life Sci.*, vol. 47, p. 181-194.
- Bazil, C. W. et T. A. Pedley. 1998. «Advances in the medical treatment of epilepsy». *Annu. Rev. Med.*, vol. 49, p. 135-162.
- Bennett, E. J., Bjerregaard, J. J., Knapp, E., Chavous, D. A., Friedman, A. M., Royer Jr, W. E. et C. M. O'Connor. 2003. «Catalytic implications from the Drosophila protein L-isoaspartyl methyltransferase structure and site-directed mutagenesis». *Biochemistry*, vol. 42, p. 12844-12853.
- Blaheta, R. A. et J. Cinatl Jr. 2002. «Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug». *Med Res Rev.* vol. 22, p. 492-511.
- Boisvert, F. M., Côté, J. M., Boulanger, C. et S. Richard. 2003. «A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes». *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 2, p. 1319-1330.
- Boivin, D., Gingras, D. et R. Béliveau. 1993. «Purification and characterization of a membrane-bound protein carboxyl methyltransferase from rat kidney cortex». *J. Biol. Chem.*, vol. 268, p. 2610-2615.
- Boivin, D., Bilodeau, D. et R. Béliveau. 1995. «Immunochemical characterization of L-isoaspartyl-protein carboxyl methyltransferase from mammalian tissues». *Biochem. J.*, vol. 309, p. 993-998.

- Boulanger, M. C., Miranda, T. B., Clarke, S., Di Fruscio, M., Suter, B., Lasko, P. et S. Richard. 2004. «Characterization of the *Drosophila* protein arginine methyltransferases DART1 and DART4». *Biochem. J.*, vol. 379, p. 283-289.
- Bowden, C. L. 2007. «Spectrum of effectiveness of valproate in neuropsychiatry». *Expert Rev Neurother.*, vol. 7, p. 9-16.
- Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D. H., McMahon, A. P., Sommer, L., Boussadia, O. et R. Kemler. 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. 1253-1264.
- Brennan, T. V. et S. Clarke. 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.), p. 65-90. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Burton, B. S. 1882 «On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate». *Journal of American Chemistry*, vol. 3, p. 385-395.
- Campos, V. E., Du, M. et Y. Li. 2004. «Increased seizure susceptibility and cortical malformation in β -catenin mutant mice». *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 320, p. 606-614.
- Carriere, A., Ray, H., Blenis, J. et P. P. Roux. 2008. «The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade». *Front Biosci.*, vol. 13, p. 4258-4275.
- Chazin, W. J. et A. A. Kossiakoff. 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.), p. 193-206. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Chang, F., Steelman, L. S., Lee, J. T., Shelton, J. G., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., Franklin, R. A. et J. A. McCubrey. 2003. «Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention». *Leukemia*, vol. 17, p. 1263-1293.
- Chen, G., Huang, L. D., Jiang, Y. M. et H. K. Manji. 1999. «The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3». *J Neurochem.*, vol. 72, p. 1327-1330.
- Chen, G., Zeng, W. Z., Yuan, P. X., Huang, L. D., Jiang, Y. M., Zhao, Z. H. et H. K. Manji. 1999. «The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS». *J Neurochem.*, vol. 72, p. 879-882.

- Chen, G. et H. K. Manji. 2006. «The extracellular signal-regulated kinase pathway: an emerging promising target for mood stabilizers». *Curr. Opin. Psychiatry*, vol. 19, p. 313-23.
- Clarke, S. 1985. «Protein carboxyl methyltransferases: two distinct classes of enzymes». *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 54, p. 479-506.
- Clarke, S. 1992. «Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues». *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 61, p. 355-386.
- 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. 263-285.
- D'Angelo, S., Ingrosso, D., Perfetto, B., Baroni, A., Zappia, M., Lobianco, L. L., Tufano, M. A. et P. Galletti. 2001. «UVA irradiation induces L-isoaspartyl formation in melanoma cell proteins». *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 31, p. 1-9.
- David, C. L., Szumlanski, C. L., DeVry, C. G., Park-Hah, J. O. et S. Clarke. 1997. «Human erythrocyte protein L-isoaspartyl methyltransferase: heritability of basal activity and genetic polymorphism for thermal stability». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 346, p. 277-286.
- DeVry, C. G., Tsai, W. et S. Clarke. 1996. «Structure of the human gene encoding the protein repair L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 335, p. 321-332.
- DeVry, C. G. et S. Clarke. 1999. «Polymorphic forms of the protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase involved in the repair of age-damaged proteins». *J. Hum. Genet.*, vol. 44, p. 275-288.
- Diliberto, E. J. et J. Axelrod. 1974. «Characterization and substrate specificity of a protein carboxymethylase in the pituitary gland». *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 71, p. 1701-1704.
- Diliberto, E. J. et J. Axelrod. 1976. «Regional and subcellular distribution of protein carboxymethylase in brain and other tissues». *J. Neurochem.*, vol. 26, p. 1159-1165.
- Ding, Q., Xia, W., Liu, J. C., Yang, J. Y., Lee, D. F., Xia, J., Bartholomeusz, G., Li, Y., Pan, Y., Li, Z., Bargou, R. C., Qin, J., Lai, C. C., Tsai, F. J., Tsai, C. H. et M. C. Hung. 2005. «Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin». *Mol Cell.*, vol. 19, p.159-170.
- Doble, B. W. et J. R. Woodgett. 2003 «GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase». *J Cell Sci.*, vol. 116, p. 1175-1186.

- Dalby, K. N., Morrice, N., Caudwell, F. B., Avruch, J. et P. Cohen. 1998. «Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK». *J. Biol. Chem.*, vol. 273, p. 1496-1505.
- Dümmler, B. A., Hauge, C., Silber, J., Yntema, H. G., Kruse, L. S., Kofoed, B., Hemmings, B. A., Alessi, D. R. et M. Frodin. 2005. «Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types». *J. Biol. Chem.*, vol. 280, p. 13304-13314.
- Einat, H., Yuan, P., Gould, T. D., Li, J., Du, J., Zhang, L., Manji, H. K. et G. Chen. 2003. «The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation». *J. Neurosci.*, vol. 23, p. 7311-7316.
- Eldar-Finkelman, H., Argast, G. M., Foord, O., Fischer, E. H. et E. G. Krebs. 1996. «Expression and characterization of glycogen synthase kinase-3 mutants and their effect on glycogen synthase activity in intact cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 93, p. 10228-10233.
- Fanéus, I. et R. R. Desrosiers. 2008. «Reactive oxygen species generated by thiol-modifying phenylarsine oxide stimulate the expression of protein L-isoaspartyl methyltransferase». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 27, p. 203-208.
- Farrar, C. et S. Clarke. 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. 27856-27863.
- Fountoulakis, K. N., Vieta, E., Sanchez-Moreno, J., Kaprinis, S. G., Goikolea, J. M. et G. S. Kaprinis. 2005. «Treatment guidelines for bipolar disorder: a critical review». *J. Affect. Disord.*, vol. 86, p. 1-10.
- Frödin, M. et S. Gammeltoft. 1999. «Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction». *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 151, p. 65-77.
- Frödin, M., Jensen, C. J., Merienne, K. et S. Gammeltoft. 2000. «A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1». *EMBO J.*, vol. 19, p. 2924-2934.
- Frödin, M., Antal, T. L., Dümmler, B. A., Jensen, C. J., Deak, M., Gammeltoft, S. et R. M. Biondi. 2002. «A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation». *EMBO J.*, vol. 21, p. 5396-5407.
- Galletti, P., Ingrosso, D., Manna, C., Clemente, G. et V. Zappia. 1995. «Protein damage and methylation-mediated repair in the erythrocyte». *Biochem. J.*, vol. 306, p. 313-325.

- Gingras, D., Boivin, D., Bilodeau, D., Pelletier, J. et R. Béliveau. 1994. «Les protéines carboxyle méthyltransférase des eucaryotes : deux classes distinctes d'enzymes». *Médecine/Science*, vol. 10, p. 55-64.
- Gingras, D., Ménard, P. et R. Béliveau. 1991. « Protein carboxyl methylation in kidney brush border membranes ». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1066, p.261-267.
- Quiroz, J. A., Singh, J., Gould, T. D., Denicoff, K. D., Zarate, C. A. et H. K. Manji. 2004. «Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: clues from the molecular pathophysiology». *Mol. Psychiatry*. vol. 9, p.756-776.
- Gould, T.D. et H.K. Manji. 2002. «The Wnt signaling pathway in bipolar disorder». *Neuroscientist*, vol. 8, p.497-511.
- Hao, Y., Creson, T., Zhang, L., Li, P., Du, F., Yuan, P., Gould, T. D., Manji, H. K. et G. Chen. 2004. «Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis». *J. Neurosci.*, vol. 24, p. 6590-6599.
- Henry, T. R. 2003. «The history of valproate in clinical neuroscience». *Psychopharmacology Bulletin*, vol. 37, p. 5-16.
- Hetman, M., Cavanaugh, J. E., Kimelman, D. et Z. Xia. 2000. «Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal». *J. Neurosci.*, vol. 20, p. 2567-2574.
- Hauge, C. et M. Frödin. 2006. «RSK and MSK in MAP kinase signaling». *J. Cell. Sci.*, vol. 119, p. 3021-3023.
- Hoffmann, K., Brosch, G., Loidl, P. et M. Jung. 2000. «First non-radioactive assay for in vitro screening of histone deacetylase inhibitors». *Pharmazie*, vol. 55, p.601-606.
- Huebscher, K. J., Lee, J., Rovelli, G., Ludin, B., Matus, A., Stauffer, D. et P. Furst. 1999. «Protein isoaspartyl methyltransferase protects from Bax-induced apoptosis». *Gene*, vol. 240, p. 333-341.
- Ikegaya, Y., Yamada, M., Fukuda, T., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T. et N. Nishiyama. 2001. «Aberrant synaptic transmission in the hippocampal CA3 region and cognitive deterioration in protein-repair enzyme-deficient mice». *Hippocampus*, vol. 11, p. 287-298.
- Ingrosso, D., Fowler, A., Bleibaum, J. et S. Clarke. 1989. «Sequence of the D-aspartyl/L-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. Common sequence motifs for protein, DNA, RNA, and small molecule S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases». *J. Biol. Chem.*, vol. 264, p. 20131-20139.

- Ingresso, D., D'Angelo, S., Perna, A. F., Iolascon, A., Miraglia del Giudice, E., Perrotta, S., Zappia, V. et P. Galletti. 1995. «Increased membrane-protein methylation in hereditary spherocytosis. A marker of cytoskeletal disarray». *Eur. J. Biochem.*, vol. 228, p. 894-898.
- Ingresso, D., D'angelo, S., di Carlo, E., Perna, A. F., Zappia, V. et P. Galletti. 2000. «Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress». *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, p. 4397-4405.
- Johannessen, C. U. 2000. «Mechanisms of action of valproate: a commentary». *Neurochem. Int.*, vol. 37, p.103-110.
- Johnson, B. A., Freitag, N. E. et D. W. Aswad. 1985. «Protein carboxyl methyltransferase selectively modifies an atypical form of calmodulin. Evidence for methylation at deamidated asparagine residues». *J. Biol. Chem.*, vol. 260, p. 10913-10916.
- Johnson, B. A., Langmack, E. L. et D. W. Aswad. 1987. «Partial repair of deamidation-damaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferase». *J. Biol. Chem.*, vol. 262, p. 12283-12287.
- Johnson, B. A. et D. W. Aswad. 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.
- Johnson, C. M., Hill, C. S., Chawla, S., Treisman, R. et H. Bading. 1997. «Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade». *J. Neurosci.* vol. 17, p. 6189-6202.
- Jones, S. W., Erikson, E., Blenis, J., Maller, J. L. et R. L. Erikson. 1988. A Xenopus ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, p. 3377-3381.
- Kalia, L. V., Gingrich, J. R. et M. W. Salter. 2004. «Src in synaptic transmission and plasticity». *Oncogene*, vol. 23, p. 8007-8016
- Kim, S. et W. K. Paik. 1970. «Purification and properties of protein methylase II». *J. Biol. Chem.*, vol. 245, p. 1806-1813.
- Kim, S. 1973. «Purification and properties of protein methylase II». *Arch. Biochem. Biophys.* vol. 157, p. 476-484.

- Kim, S., Choi, J. et G. J. Jun. 1983. « Purification and characterization of protein methylase II from human erythrocytes ». *J. Biochem. Biophys. Meth.*, vol. 8, p.9-14.
- Kim, E., Lowenson, J. D., Clarke, S. et S. G. Young. 1999. «Phenotypic analysis of seizure-prone mice lacking L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase». *J. Biol. Chem.*, vol. 274, p. 20671-20678.
- Kim, E., Lowenson, J. D., MacLaren, D. C., Clarke, S. et S. G. Young. 1997. «Deficiency of a protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth, and fatal seizures in mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, p. 6132-6137.
- Kindrachuk, J., Parent, J., Davies, G. F., Dinsmore, M., Attah-Poku, S. et S. Napper. 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. 50880-50886.
- Kleijn, M. et C. G. Proud. 2000. «The activation of eukaryotic initiation factor (eIF)2B by growth factors in PC12 cells requires MEK/ERK signalling». *FEBS Lett.*, vol. 476, p. 262-265.
- Kort, E. N., Goy, M. F., Larsen, S. H. et J. Adler. 1975. «Methylation of a membrane protein involved in bacterial chemotaxis». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 72, p. 3939-3943.
- Krämer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H. P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M. A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T. et M. Göttlicher. 2003. «The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2». *EMBO J.* vol. 22, p. 3411-3420.
- Kruman, I. I., Kumaravel, T. S., Lohani, A., Pedersen, W. A., Cutler, R. G., Kruman, Y., Haughey, N., Lee, J., Evans, M. et M. P. Mattson. 2002. «Folic acid deficiency and hyperhomocysteinemia impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease». *J. Neurosci.*, vol. 22, p. 1752-1762.
- Ladino, C. A., et C. M. O'Connor. 1992. «Methylation of atypical protein aspartyl residues during the stress response of HeLa cells». *J. Cell. Physiol.*, vol. 153, p. 297-304.
- Laemmli, U. K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature*, vol. 227, p.680-685.
- Lamarre, M. et R. R. Desrosier. 2008. «Up-regulation of protein l-isoaspartyl methyltransferase expression by lithium is mediated by glycogen synthase kinase-

- 3 inactivation and beta-catenin stabilization». *Neuropharmacology*, vol. 6, sous presse.
- Lanthier, J., Bouthillier, A., Lapointe, M., Demeule, M., Béliveau, R. et R. R Desrosiers. 2002. «Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin». *J. Neurochem.*, vol. 83, p. 581-591.
- Lanthier, J. et R. R. Desrosiers. 2004. «Protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs abnormal aspartyl residues accumulated in vivo in type-I collagen and restores cell migration». *Exp. Cell Res.*, vol. 293, p.96-105.
- Lapointe, M., Lanthier, J., Moundjian, R., Régina, A. et R. R Desrosiers. 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. et H. Berial. 1964. «Pharmacodynamic properties of 2,2-dipropylacetic acid. 2nd report on its anti-epileptic properties». *Thérapie*, vol. 19, p. 451-456.
- Lee, A. V., Gooch, J. L., Oesterreich, S., Guler, R. L. et D. Yee. 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 inhibition». *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, p. 1489-1496.
- Lee, S. M., Tole, S., Grove, E. et A. P. McMahon. 2000. «A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus». *Development*, vol. 127, p. 457-467.
- Li, X. N., Shu, Q., Su, J. M., Perlaky, L., Blaney, S. M. et C. C. Lau. 2005. «Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC». *Mol. Cancer Ther.*, vol. 4, p. 1912-1922.
- Lindner, H. et W. Helliger. 2001. «Age-dependent deamidation of asparagine residues in proteins». *Exp. Gerontol.*, vol. 36, p. 1551-1563.
- Liss, M., et L. M. Edelstein. 1967. «Evidence for the enzymatic methylation of crystalline ovalbumin preparations». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 26, p. 497-504.
- Liss, M. et A. M. Maxam. 1967. «Methylation of ovalbumin and human serum albumin by a purified enzyme from calf spleen». *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 140, p. 555-557.

- Liss, M., Maxam, A. M. et L. J. Cuprak. 1969. «Methylation of protein by calf spleen methylase. A new protein methylation reaction». *J. Biol. Chem.*, vol. 244, p. 1617-1622.
- Löscher, W. 1989. «Valproate enhances GABA turnover in the substantia nigra». *Brain Res.*, vol. 501, p.198-203.
- Lowenson, J. D. et S. Clarke. 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. 5985-5995.
- Lowenson, J. D., Kim, E., Young, S. G. et S. Clarke. 2001. «Limited accumulation of damaged proteins in l-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase-deficient mice». *J. Biol. Chem.*, vol. 276, p. 20695-20702.
- MacLaren, D. C., Kagan, R. M. et S. Clarke. 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. 277-283.
- Mann, D. M. 1985. «The neuropathology of Alzheimer's disease: a review with pathogenetic, aetiological and therapeutic considerations». *Mech. Ageing Dev.*, vol. 31, p. 213-255.
- Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J. et R. Marais. 1999. «Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation». *EMBO J.*, vol. 18, p. 2137-2148.
- Meunier, H., Carraz, G., Neunier, Y., Eymard, P. et M. Aimard. 1963 «Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid». *Therapie.*, vol. 18, p. 435-438.
- Michaelis, M., Suhan, T., Reinisch, A., Reisenauer, A., Fleckenstein, C., Eikel, D., Gümbel, H., Doerr, H.W., Nau, H. et J. Cinatl, Jr. 2005. «Increased replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells by valproic acid depends on histone deacetylase inhibition». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 46, p. 3451-3457.
- Michaelis, M., Suhan, T., Michaelis, U. R., Beek, K., Rothweiler, F., Tausch, L., Werz, O., Eikel, D., Zörnig, M., Nau, H., Fleming, I., Doerr, H. W. et J. Cinatl Jr. 2006. «Valproic acid induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and inhibits apoptosis in endothelial cells». *Cell Death Differ.*, vol. 13, p. 446-453.
- Morin, A. M., et M. Liss. 1973. «Evidence for a methylated protein intermediate in pituitary methanol formation». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 52, p. 373-378.

- Murray Jr., E. D. et S. Clarke. 1984. «Synthetic peptid substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. Detection of a new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues». *J.Biol.Chem.*, vol. 259, p. 10722-10732.
- Newton, S. S. et R. S. Duman. 2006. «Chromatin remodeling: a novel mechanism of psychotropic drug action». *Mol Pharmacol.*, vol. 70, p. 440-443.
- Ota, I. M., Gilbert, J. M. et S. Clarke. 1988. «Two major isozymes of the protein D-aspartyl/L-isoaspartyl methyltransferase from human erythrocytes». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 151, p. 1136-1143.
- Paik, W. K. et S. Kim. 1990. «Reevaluation of the enzymology of protein methylation». In *Protein methylation*, sous la dir. de W. K. Paik et S. Kim (éd.), p. 23-31. Boca Raton (FL) : CRC Press.
- Pascale, R. M., Simile, M. M., De Miglio, M. R. et F. Feo. 2002. «Chemoprevention of hepatocarcinogenesis : S-adenosyl-L-methionine». *Alcohol.* vol. 27, p. 193-198.
- Perucca, E. 2002 «Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience». *CNS Drugs*, vol. 16, p. 695-714.
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A. et P. S. Klein. 2001. «Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen». *J. Biol. Chem.*, vol. 276, p. 36734-36741.
- Potter, S. M., Johnson, B. A., Henschen, A., Aswad, D. W. et A. W. Guzzetta. 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. 6339-6347.
- Radtke, F. et K. Raj. 2003. «The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor»? *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, p. 756-767.
- Reissner, K. J. et D. W. Aswad. 2003. «Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals?». *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 60, p. 1281-1295.
- Robinson, N. E. et A. B. Robinson. 2004. «Amide molecular clocks in drosophila proteins : potential regulators of aging and other processes». *Mech. Ageing Dev.*, vol. 125, p. 259-267.
- Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Wolkow, C., Wang, R., Cotter, R. J., Reardon, I. M., Zurcher, N. H., Heinrikson, R. L., Ball, M. J. et R. D. Greenberg. 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. 3072-3083.
- Roux, P.P., Ballif, B.A., Anjum, R., Gygi, S.P. et J. Blenis J. 2004. «Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase». *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, vol. 37, p. 13489-13494.
- Ryttersgaard, C., Griffith, S. C., Sawaya, M. R., MacLaren, D. C., Clarke, S. et T. O. Yeates. 2002. «Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase». *J. Biol. Chem.*, vol. 277, p. 10642-10646.
- Saido, T. C., Toyoshima, S. et T. J. Osawa. 1987. «Protein-O-carboxyl methyltransferase from cytosol and membranes of chicken erythrocytes». *J. Biochem.*, vol. 102, p. 319-326.
- Sellinger, O. Z. et C. M. Kramer. 1988. «The carboxylmethylation of membrane-bound proteins in the aging rat brain». *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 231, p. 269-280.
- Shen, S., Elin, R. J. et S. J. Soldin. 2001. «Characterization of cross reactivity by carbamazepine 10,11-epoxide with carbamazepine assays». *Clin Biochem.*, vol. 34, p. 157-158.
- Shirasawa, T., Endoh, R., Zeng, Y. X., Sakamoto, K. et H. Mori. 1995. «Protein L-isoaspartyl methyltransferase: developmentally regulated gene expression and protein localization in the central nervous system of aged rat». *Neurosci. Lett.*, vol. 188, p. 37-40.
- Shimizu, T., Watanabe, A., Ogawara, M., Mori, H. et T. Shirasawa. 2000. «Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 381, p. 225-234.
- Shimuzu, T., Ikegami, T., Ogawara, M., Suzuki, Y., Takahashi, M., Morio, H. et T. Shirasawa. 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. 341-352.
- Shimuzu, T., Matsuoka, Y. et T. Shirasawa. 2005. «Biological significance of isoaspartate and its repair system». *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, p.1590-1596.
- Skinner, M. M., Puvathingal, J. M., Walter, R. L. et A. M. Friedman. 2000. «Crystal structure of protein isoaspartyl methyltransferase: a catalyst for protein repair». *Structure*, vol. 8, p. 1189-1201.
- Smith, C. D., Carson, M., Friedman, A. M., Skinner, M. M., Delucas, L., Chantalat, L., Weise, L., Shirasawa, T. et D. Chatopadhyay. 2002. «Crystal structure of human

- 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. 11, p. 625-635.
- 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. et F. Van Leuven. 2002. «Neonatal neuronal overexpression of glycogen synthase kinase-3 beta reduces brain size in transgenic mice». *Neuroscience*, vol. 4, p. 797-808.
- Stambolic, V., Ruel, L. et J. R. Woodgett. 1996. «Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells». *Curr. Biol.* vol. 6, p.1664-1668.
- Stambolic, V. et J. R. Woodgett. 1994. «Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation». *Biochem. J.*, vol. 303, p. 701-704.
- Stock, J. 1990. «Role of protein carboxyl methyltransferase in bacterial chemotaxis». In *Protein methylation*, sous la dir. de W. K. Paik et S. Kim (éd.), p. 275-284. Boca Raton (FL) : CRC Press.
- Sutherland, C., Leighton, I. A., et P. Cohen. 1993. «Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling». *Biochem. J.*, vol. 296, p. 15-19.
- Torres, M. A., Eldar-Finkelman, H., Krebs, E. G. et R. T. Moon. 1999. «Regulation of ribosomal S6 protein kinase-p90(rsk), glycogen synthase kinase 3, and beta-catenin in early *Xenopus* development». *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, p. 1427-1437.
- Tsai, W. et S. Clarke. 1994. «Amino acid polymorphisms of the human L-isoaspartyl/D-aspartyl methyltransferase involved in protein repair». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 203, p. 491-497.
- Tunnicliff, G. 1999. «Actions of sodium valproate on the central nervous system». *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 50, p. 347-65.
- Van den Berg, R. J., Kok, P. et R. A. Voskuyl. 1993. «Valproate and sodium currents in cultured hippocampal neurons». *Exp. Brain Res.*, vol. 93, p. 279-87.
- Van Lint, C., Emiliani, S. et E. Verdin. 1996. «The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation». *Gene Expr.* vol. 5, p. 245-253.

- Watanabe, A., Takio, K. et Y. Ihara. 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. 7368-7378.
- Vik, T. A. et J. W. Ryder. 1997. «Identification of serine 380 as the major site of autophosphorylation of Xenopus pp90rsk». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 235, p. 398-402.
- Wright, H. T. 1991. «Sequence and structure determinants of the nonenzymatic deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins». *Protein Eng.*, vol. 4, p. 283-294.
- Xie, H., et S. Clarke. 1994. «An enzymatic activity in bovine brain that catalyzes the reversal of the C-terminal methyl esterification of protein phosphatase 2A». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 203, p. 1710-1715.
- Yamamoto, A., Takagi, H. et D. Kitamura. 1998. «Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy». *J. Neurosci.*, vol. 18, p. 2063-2074.
- 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. et T. Shirasawa. 1998. «Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy». *J. Neurosci.*, vol. 18, p. 2063-2074.
- Young, W. G., Hoofring, S. A., Mamula, M. J., Doyle, H. A., Bunick, G. J., Hu, Y. et D. W. Aswad. 2005. «Protein L-Isoaspartyl Methyltransferase Catalyzes in Vivo Racemization of Aspartate-25 in Mammalian Histone H2B». *J. Biol. Chem.*, vol. 280, p. 26094-26098.
- Yuan, P. X., Huang, L. D., Jiang, Y. M., Gutkind, J. S., Manji, H. K. et G. Chen. 2001. «The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth». *J Biol Chem.*, vol. 276, p. 31674-31683.
- Ziogas, A., Moelling, K. et G. Radziwill. 2005. «CNK1 is a scaffold protein that regulates Src-mediated Raf-1 activation». *J Biol Chem.*, vol. 280, p. 24205-24211.