

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ANALYSE PROTÉOMIQUE DES VOIES DE SIGNALISATION
CONTRÔLÉES PAR LA PIMT

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
FANNIE AMIOT

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

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche pour ses conseils, sa disponibilité et ses encouragements qui m'ont permis de réaliser mon projet de recherche dans les meilleures conditions. Je tiens également à le remercier de m'avoir fait confiance et d'avoir répondu à mes aspirations en me donnant la possibilité d'effectuer un travail de recherche en protéomique.

Je souhaite aussi remercier M. Michel Marion pour son aide et ses conseils techniques.

J'aimerais également remercier ma famille et mes amis qui ont su me soutenir moralement tout au long de ma maîtrise.

Finalement, je tiens à remercier mon amoureux, Philippe, de m'avoir encouragé et soutenu moralement lors de cette étape importante de ma vie.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
RÉSUMÉ	x
CHAPITRE I	1
1.1 La protéine L-isoaspartyl (D-aspartate) O-méthyltransférase	1
1.1.1 Historique de la PIMT.....	1
1.1.2 Formation des protéines endommagées et réparation par la PIMT	5
1.1.3 Les protéines endommagées et la PIMT	8
1.1.4 Les fonctions biologiques de la PIMT	12
1.2 Voies de signalisation activées par la suppression <i>in vivo</i> de la PIMT.....	14
1.2.1 Voie de signalisation des MEK-ERK	14
1.2.2 Voie de signalisation de PI3K/AKT/GSK3 β	16
1.3 L'enrichissement des phosphoprotéines	17
1.4 Les phosphoprotéines ERK, RSK et AKT impliqués dans les voies de signalisation.	19
1.5 Objectif de recherche.....	23
CHAPITRE II	24
MATÉRIEL ET MÉTHODES	24
2.1 Matériel	24
2.2 Méthodes	24
2.2.1 Culture cellulaire.....	24
2.2.2 Traitements des cellules avec des siRNAs contre PIMT et contre TrxR	25
2.2.3 Traitements des cellules avec l'acide valproïque.....	25
2.2.4 Lyse cellulaire.....	25
2.2.5 Enrichissement des phosphoprotéines.....	26
2.2.6 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunobuvardage de type Western	28
2.2.7 Immunodétection des protéines.....	28
2.2.8 Coloration des gels avec le Pro-Q Diamond	29
2.2.9 Coloration de l'ensemble des protéines sur gel avec le bleu de Coomassie.....	29
2.2.10 Essais de méthylation pour les substrats de la PIMT	30
2.2.11 Déphosphorylation des protéines par la lambda phosphatase	30
2.2.12 Analyse protéomique par micro-puces d'anticorps.....	31
2.2.13 Analyses statistiques	31

CHAPITRE III	32
RÉSULTATS	32
3.1 Le Pro-Q Diamond colore les phosphoprotéines du surnageant post-nucléaire ainsi que l'ovalbumine du standard de bas poids moléculaire.	32
3.2 Effets de quantités croissantes de trioxyde d'aluminium et de la présence de SDS dans le tampon d'éluion sur le rendement en phosphoprotéines.	32
3.3 Une seule étape est suffisante afin d'éluer la majorité des phosphoprotéines.	33
3.4 Le tampon d'éluion contenant 1% de SDS est optimal pour éluer les phosphoprotéines.....	34
3.5 Fractionnement des phosphoprotéines par la chromatographie d'affinité.	34
3.6 Enrichissement des phosphoprotéines par la chromatographie d'affinité.....	35
3.7 La chromatographie d'affinité fractionne les protéines selon le degré de phosphorylation.	35
3.8 L'inhibition de la PIMT par le siRNA est élevée.	36
3.9 ERK1, ERK2, RSK1, RSK2 et AKT1 sont des protéines ayant un niveau d'expression distinct lors de l'inhibition de la PIMT.	36
3.10 L'inhibition de la PIMT réduit la phosphorylation de ERK1/2 mais stimule celle de Akt1 et de RSK1/2.	37
3.11 L'acide valproïque stimule l'expression de la PIMT et de RSK1 et active Akt1 et RSK1/2.	38
3.12 L'inhibition de la PIMT par le siRNA n'entraîne pas une accumulation de substrats.....	40
CHAPITRE IV	53
DISCUSSION	53
BIBLIOGRAPHIE	61

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Formation, hydrolyse et racémisation de la molécule L-succinimide5
Figure 1.2	Pourcentage des produits résultant de l'hydrolyse spontanée du L-succinimide6
Figure 1.3	Substrats de la PIMT.....6
Figure 1.4	Mécanisme de réparation de la PIMT7
Figure 1.5	La molécule S-adenosylméthionine7
Figure 1.6	Voies de signalisation sous le contrôle du récepteur EGF 14
Figure 1.7	Activation de Ras par la dimérisation du récepteur tyrosine kinase..... 15
Figure 1.8	Voie de signalisation PI3K/AKT stimulée par IGF-I et/ou l'insuline..... 16
Figure 1.9	Stratégies protéomiques de type chromatographique permettant l'enrichissement des phosphoprotéines 18
Figure 1.10	Voie de signalisation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases)20
Figure 1.12	Sites de phosphorylation de RSK 1 et RSK221
Figure 1.11	Voies de signalisation impliquant Akt22
Figure 3.1	Coloration des protéines issues de surnageants post-nucléaires suite à l'incubation avec la lambda phosphatase.41
Figure 3.2	Efficacité d'élution des phosphoprotéines en fonction de différentes quantités de matrice de trioxyde d'aluminium et de la présence de SDS.....42
Figure 3.3.	Évaluation de l'efficacité d'élution des phosphoprotéines de la matrice de trioxyde d'aluminium.....43
Figure 3.4	Efficacité relative d'élution des phosphoprotéines avec un tampon contenant 1% et 4% SDS.....44
Figure 3.5	Fractionnement des phosphoprotéines provenant d'un surnageant post-nucléaire45
Figure 3.6	Enrichissement des phosphoprotéines provenant d'un surnageant post-nucléaire.....46
Figure 3.7	Affinité de certaines protéines pour la matrice de trioxyde d'aluminium, la PIMT, phospho-ERK 1/2 et phospho-RSK 1/2.47

Figure 3.8	Inhibition de l'expression de la PIMT par siRNA.	48
Figure 3.9	Analyse protéomique par micro-puces d'anticorps des surnageants post-nucléaires de cellules U-87 traitées avec un siRNA contre la PIMT.	49
Figure 3.10	Effet de l'inhibition de la PIMT par siRNA sur l'expression et la phosphorylation de ERK1/2, Akt1 et RSK1 fractionnées par chromatographie d'affinité sur la matrice de trioxyde d'aluminium.	50
Figure 3.11	Effet de l'acide valproïque lors de l'inhibition de la PIMT par siRNA sur l'expression et la phosphorylation de RSK1 et Akt1.	51
Figure 3.12	Quantification des substrats de la PIMT au sein des surnageants post-nucléaires issus des cellules U-87 traitées avec des siRNAs contre la PIMT et Trxr.	52

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Exemples de protéines comportant des résidus aspartates anormaux	9
Tableau 1.2	Substrats majeurs de la PIMT dans le cerveau et les neurones de la souris	10
Tableau 1.3	Caractéristiques des protéines à l'étude.....	19

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3H	<i>Hydrogen-3</i>
AdoMet	S-adenosylméthionine
APS	Persulfate d'ammonium
ARNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide désoxyribonucléique messenger
CaMKI	<i>Calmodulin Kinase 1</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CRMP2	Collapsin response mediator protein 2
EDTA	<i>Ethylenediamine-tetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK1/2	<i>Extracellular Regulated Kinase 1/2</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GRB2	<i>Growth factor Receptor-Binding protein 2</i>
GSK-3	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HCl	Chlorure d'hydrogène
HDAC	<i>Histone désacétylase</i>
HeLa	Lignée de cellules cancéreuses issues du cerveau de Henrietta Lacks
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfonic acid</i>
IGF-I	<i>Insulin like Growth Factor 1</i>
IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
kDa	KiloDalton
MAP2	<i>microtubule associated protein 2</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MES	acide 2-(N-Morpholino) éthanesulfonique
MnCl₂	Dichlorure de manganèse
MOAC	<i>metal oxide/hydroxide affinity chromatography</i>
MRL	<i>Murphy Roths Large</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	Paire de base
PCI2	Lignée de cellules cancéreuses issues de la glande médullaire du rat
PK1	<i>Phosphoinositol-Dependent protein Kinase 1</i>
PEBP	<i>phosphatidylethanolamine binding protein</i>
pI	Point isoélectrique
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIMT	Protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase
PIP3	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PKB	<i>Protein Kinase B</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
Prp-c	<i>Prion protein binding Cooper</i>
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RKIP	<i>Raf kinase inhibitor protein</i>

RSK	<i>Ribosomal S6 Kinase</i>
SAH	S-adénosyl-homocystéine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SH2	<i>Src Homology 2 domain</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
TBS	Tampon Tris Salin
TEMED	N,N,N',N-tétraméthylènediamine
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TrxR	Thiorédoxine réductase
UCH-L1	<i>C-terminal hydrolase L1</i>
UVA	Rayons UV de type A
VPA	Acide valproïque

RÉSUMÉ

Une chute d'expression de l'enzyme L-isoaspartyl (D-aspartate) méthyltransférase (PIMT), connue pour réparer les protéines endommagées qui ont accumulé des résidus aspartates anormaux, a été démontrée chez le rat atteint de troubles neurologiques à caractère épileptique et dans les glioblastomes humains. Dans cette étude, un profil protéomique correspondant au phénomène de l'inhibition de la PIMT a été dressé, suite à la combinaison de la technologie de l'ARN interférent (siRNA) et de la technologie de micro-puces d'anticorps (microarray). Un changement du niveau d'expression de plusieurs protéines, sous leur forme totale et phosphorylée, dont Erk et phospho-Erk, RSK et phospho-RSK ainsi que Akt et phospho-Akt a été observé. Ces résultats ont été confirmés par immunodétection, conjointement à la validation d'une méthode d'enrichissement des phosphoprotéines par chromatographie d'affinité dont la matrice est composée de trioxyde d'aluminium. Par la suite, un traitement combinant l'inhibition de la PIMT et l'utilisation de l'acide valproïque, un médicament utilisé pour traiter l'épilepsie, a permis d'observer un effet sur l'activation d'Akt et de RSK ainsi que sur l'expression de RSK1. Parallèlement, le traitement à l'acide valproïque a permis d'observer que celui-ci stimule l'expression de la PIMT. L'identification de ces protéines et de leur régulation lors de l'inhibition de la PIMT, suggère que la PIMT contrôle des voies de signalisation dont celle des *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) passant par ERK ainsi que d'autres voies de signalisation impliquant Akt et RSK. Lors de l'inhibition de la PIMT de concert avec le traitement à l'acide valproïque, ces voies de signalisation semblent être davantage activées. Bien que ce travail de recherche ne procure que des résultats préliminaires sur le contrôle que peut avoir la PIMT sur les voies de signalisation intracellulaires, ceux-ci font place à des hypothèses intéressantes qui une fois confirmées, permettront de trouver des cibles pharmacologiques qui aideront à contrer le développement des neuropathologies telles que l'épilepsie et les tumeurs cérébrales.

Mots clés : AKT, cellules gliales cancéreuses, ERK, *Immobilized metal-affinity chromatography*, phosphoprotéomique, PIMT, RSK.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La protéine L-isoaspartyl (D-aspartate) O-méthyltransférase

1.1.1 *Historique de la PIMT*

Le vieillissement est un processus complexe au cours duquel les différentes fonctions d'un organisme déclinent de façon irréversible. À cette transformation cellulaire participent de manière intrinsèque des facteurs génétiques et de manière extrinsèque des facteurs environnementaux. L'environnement de la cellule influence fortement l'état du protéome et une perturbation de celui-ci favorise l'endommagement des protéines. Celles-ci peuvent ainsi s'accumuler et entraîner un dysfonctionnement biologique donnant naissance à des pathologies. La protéine L-isoaspartyl méthyltransférase (PIMT) est une enzyme qui répare certaines de ces protéines endommagées. Elle catalyse le transfert d'un groupement méthyle de la molécule S-adenosylméthionine (AdoMet) au groupement α -carboxyle du résidu L-isoaspartate anormal d'une protéine (Aswad, 1995).

C'est par Axelrod et Daly en 1965 que l'activité de la PIMT fût détectée pour la première fois. Ils observèrent la formation de méthanol radioactif dans des extraits provenant de la glande hypophyse, auquel la molécule AdoMet radioactive fût préalablement ajoutée (Axelrod et Daly, 1965). Ainsi, ils nommèrent la PIMT « enzyme formant du méthanol ». À ce moment, ils ne soupçonnèrent guère l'existence de l'état intermédiaire méthylé précédant la formation du méthanol. Deux ans plus tard, l'équipe de Liss et ses collaborateurs rapportèrent la méthylation de l'ovalbumine et de l'albumine du sérum humain par des extraits provenant de la peau, de la rate et de deux différents types de tumeurs du rat. Ils découvrirent que la méthylation est dépendante de la molécule AdoMet en mesurant la production de groupements méthyles volatiles lors de l'hydrolyse acide ou basique de ces protéines (Liss et Edelstein, 1967). Subséquemment, Liss et son équipe purifièrent partiellement une enzyme de méthylation provenant de la rate de rat et démontrèrent la production de méthanol (Liss, Maxam et Cuprak, 1969). Cette enzyme fût par la suite nommée protéine méthylase I (Aswad, 1995). Un an plus tard, Kim et Paik, purifièrent du thymus de rat une enzyme dont l'activité de méthylation est dépendante de AdoMet et la nommèrent protéine méthylase II (Kim et Paik, 1970). Trois ans plus tard, Morin et Liss démontrèrent que l'hypophyse contient une enzyme qui méthyle le groupement carboxyle et qui entraîne la formation de méthanol (Morin et Liss, 1973). La même année, Kim démontra l'activité de la méthylase II dans un extrait d'hypophyse et démontra la formation de

méthanol (Kim, 1973). Dans l'année qui suivit, Diliberto et Axelrod, confirmèrent les travaux de Kim par la présence d'une activité carboxylméthylase dans l'hypophyse et démontrèrent du même coup que la méthylation de l'adrénocorticotropine est deux fois plus importante que la méthylation de l'ovalbumine (Diliberto et Axelrod, 1974). Ainsi, il devint donc clair que la méthylase I, la méthylase II et l'enzyme découverte par Axelrod et Daly sont en fait la même enzyme.

Entre 1975 et 1984, plus d'une soixantaine d'articles portant sur les propriétés et/ou les fonctions possibles de la protéine carboxylméthylase chez les eucaryotes furent publiés. Les fonctions suggérées pour cette protéine proposèrent des rôles dans la libération des vésicules, dans l'entreposage des hormones, dans l'activité de la calmoduline et dans la chémotaxie des leucocytes. D'ailleurs, il fût démontré en 1975 chez les bactéries chémotactiques, que l'activité enzymatique de la méthylation du carboxyle des protéines membranaires joue un rôle clé dans la modulation de la réponse chémotactique (Aswad, 1995).

Entre 1982 et 1984, la capacité de la PIMT à reconnaître les résidus aspartates endommagés fût pour la première fois démontrée pour l'enzyme humaine et l'enzyme d'origine bovine (McFadden et Clarke, 1982; Aswad, 1984; Murray et Clarke, 1984). Lorsque les chercheurs constatèrent qu'il y a formation d'un groupement ester méthyle et que celui-ci est spontanément hydrolysé dans le processus de réparation des résidus L-aspartates normaux, un nouveau modèle impliquant la réparation des protéines endommagées par la PIMT fût établi (McFadden et Clarke, 1982; Johnson *et al.*, 1987a,b; McFadden et Clarke, 1987). Il fût démontré par la suite que la PIMT reconnaît les résidus aspartates sous la forme L-isoaspartate et D-aspartate. Par contre, la spécificité de la PIMT pour les résidus L-isoaspartate fût montrée pour être de 1500 à 20000 fois plus forte que pour les résidus D-aspartate (Lowenson et Clarke, 1991, 1992). Ainsi, en 1992, l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire nomma la PIMT avec le nom que l'on connaît aujourd'hui, soit la protéine L-isoaspartate (D-aspartate) O-méthyltransférase (Aswad, 1995). Entre 2000 et 2004 la PIMT cristallographiée provenant de bactéries thermophiles vivant à 90°C, comme *Thermotoga maritima*, *Pyrococcus furiosus* et *Sulfolobus tokodaii*, ainsi que la PIMT cristallographiée de l'humain, a permis de confirmer la spécificité de l'enzyme pour les résidus D-aspartate et L-isoaspartate (Skinner *et al.*, 2000; Griffith *et al.*, 2001; Ryttersgaard *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2004).

La PIMT possède une large distribution phylogénétique. En effet, la PIMT fût découverte dans des extraits de bactéries (*Salmonella Typhimurium*) et d'oocytes d'amphibiens (*Xenopus laevis*) (O'Connor, 1985). Elle fût également découverte chez le mollusque (grande limace), chez le crustacé

terrestre (cloporte), chez le champignon et chez plusieurs espèces d'animaux et de plantes (Johnson, Ngo et Aswad, 1991; Kagan *et al.*, 1997; Mudgett, Lowenson et Clarke, 1997). De plus, il fût découvert que la séquence de la PIMT présente une impressionnante conservation entre les différents organismes vivants. Effectivement, la séquence de la PIMT chez les plantes et chez *Escherichia coli* a 31% d'homologie et la séquence de la PIMT chez les plantes et chez l'érythrocyte humain a 50% d'homologie (Gagnon, Veeraragavan et Coulombe, 1988). De plus, la distribution de la PIMT dans les organes est également diversifiée. Effectivement, la PIMT a été identifiée dans le foie, le rein, les yeux, les testicules et le cerveau (Bouchard *et al.*, 1980; Boivin, Gingras et Béliveau, 1993; Komada *et al.*, 1995; Shirasawa *et al.*, 1995, Kharbanda *et al.*, 2007). La PIMT est majoritairement exprimée dans le cerveau et il a été démontré que son expression augmente avec l'âge dans les neurones de l'hippocampus et du cortex cérébral du rat (Shirasawa *et al.*, 1995). D'un point de vue cellulaire, la PIMT se retrouve chez différents types de cellules. Effectivement, en plus d'être présente dans les cellules sanguines telles que les érythrocytes, la PIMT se retrouve dans les cellules germinales (Barber et Clarke, 1984; Bouchard *et al.*, 1980; Desrosiers, Romanik et O'Connor, 1990), dans les neurones, dans les cellules gliales et dans les cellules oligodendrocytes (Shirasawa *et al.*, 1995). En ce qui concerne la localisation intracellulaire de la PIMT, celle-ci est principalement présente dans le cytosol, mais elle est également présente dans le noyau et les membranes cellulaires (Diliberto et Axelrod, 1976). Vue l'étendue de sa distribution phylogénétique, tissulaire et cellulaire, la PIMT est donc importante pour les systèmes biologiques.

En 1988, deux isozymes de la PIMT, soient PIMT I et PIMT II, furent découvertes au sein du cytosol des érythrocytes humains et bovins. C'est Ota et ses collaborateurs qui en firent la découverte et ils établirent une première distinction entre ces deux isoformes. En effet, le point isoélectrique de la PIMT I est de 6,5 et de la PIMT II est de 5,6 (Ota, Gilbert et Clarke, 1988; Gilbert *et al.*, 1988). Par la suite, les travaux des équipes d'Ingrosso et Henzel, permirent de déterminer une deuxième caractéristique différentielle des deux isozymes dans leur structure primaire. Effectivement, la PIMT I a une séquence de 226 acides aminés et la PIMT II a une séquence de 227 acides aminés (Ingrosso *et al.*, 1989; Henzel *et al.*, 1989). L'établissement de la structure primaire de l'isoforme de type I a permis également de trouver un poids moléculaire de 24,5 kDa. Par ailleurs, d'autres travaux se rattachant à la structure primaire des isozymes démontrèrent une différence dans la séquence d'acides aminés en C-terminale telle que -SRWK pour la PIMT I et -SRDEL pour la PIMT II (Ingrosso, Kagan et Clarke, 1991; Potter *et al.*, 1992; Maclaren, Kagan et Clarke, 1992). En 1995, l'équipe de Takeda, démontra au sein des cellules érythroïdes d'un humain atteint de leucémie, la présence d'un transcrit de 1660 bp se scindant en deux pour donner naissance à un transcrit de 907 bp et un transcrit de 1553

bp codant pour la PIMT. Ils suggérèrent ainsi l'épissage alternatif comme l'origine de la naissance des isozymes (Takeda *et al.*, 1995). D'autre part, la séquence -RDEL est une séquence connue pour être un signal de rétention au niveau du réticulum endoplasmique, proposant ainsi que la PIMT II ait un rôle de réparation des protéines endommagées dans le réticulum endoplasmique ou, peut-être, dans un autre compartiment spécialisé de la cellule (Potter *et al.*, 1992). Par contre, rien n'a encore été démontré à ce sujet. Une troisième isoforme de la PIMT, avec un point isoélectrique se situant entre les deux autres, a été observée, mais celle-ci n'est pas assez abondante pour être purifiée et caractérisée (Ingrosso, Kagan et Clarke, 1991). L'analyse potentielle de l'épissage alternatif de l'ARNm de la PIMT prédit également cette troisième forme avec une séquence en C-terminale telle que -SR (Maclaren, Kagan et Clarke, 1992).

Le gène humain de la PIMT est situé sur le chromosome 6 (locus 6q22.3-6q24), mesure 60 kb et est composé de 7 exons interrompus de 6 introns (Maclaren *et al.*, 1992; DeVry, Tsai et Clarke, 1996). L'analyse de l'ADN de 30 individus correspond à l'exon 2, 5 et 7 du gène de la PIMT a permis de détecter deux formes de polymorphisme dans ces régions. Effectivement, le codon correspondant à l'acide aminé 119 peut coder pour une isoleucine ou pour une valine et le codon correspondant à l'acide aminé 205 peut coder pour la leucine ou pour l'arginine. Le polymorphisme majeur retrouvé est celui en position 119 et cette modification génétique augmente les risques du spina bifida (Zhu *et al.*, 2006a). Lors du vieillissement normal, les deux allèles sont présents. Il a aussi découvert que le gène de la PIMT comporte du polymorphisme dans les régions introniques, mais que celui-ci n'affecte pas l'activité de l'enzyme. À l'heure actuelle, aucune pathologie connue n'est associée à cette forme de polymorphisme. Par contre, le changement d'acides aminés causé par le polymorphisme au niveau des exons, peut affecter la capacité de la PIMT à reconnaître et catalyser la réparation des résidus aspartates endommagés dans le processus du vieillissement (Devry et Clarke, 1999; Tsai et Clarke, 1994).

1.1.2 Formation des protéines endommagées et réparation par la PIMT

Le rôle physiologique de la PIMT est de limiter l'accumulation des résidus L-isoaspartates et D-aspartates sur les protéines intracellulaires (McFadden et Clarke 1982; Aswad et Johnson, 1984; Clarke, 1985). Ces dommages se produisent spontanément avec l'âge à partir de l'acide aminé L-aspartate et L-asparagine. L'attaque nucléophile de l'atome d'azote au carbonyle de la fonction carboxylique au sein de ces deux résidus, favorise le départ d'un groupe partant tel qu'une molécule d'eau pour le résidu L-aspartate et d'une molécule d'ammoniaque pour le résidu L-asparagine (Figure 1.1). Le L-succinimide qui en résulte s'hydrolyse spontanément en L-aspartate et en L-isoaspartate et se racémise également en D-succinimide qui s'hydrolyse spontanément en D-aspartate et en D-isoaspartate.

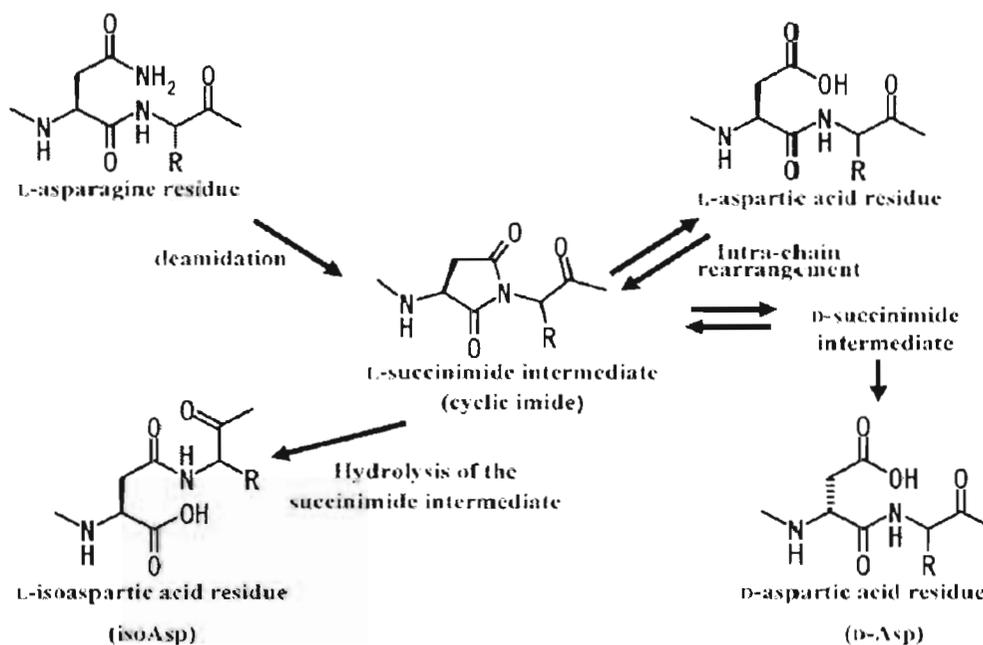


Figure 1.1 Formation, hydrolyse et racémisation de la molécule L-succinimide

(Tirée de Furuchi et Homma, 2007)

La transformation du L-succinimide en L-aspartate et en L-isoaspartate est respectivement de 3 pour 1 (Geiger et Clarke, 1987) (Figure 1.2). Par contre, le ratio de formation D-aspartate : D-isoaspartate à partir du D-succinimide n'est pas connu.

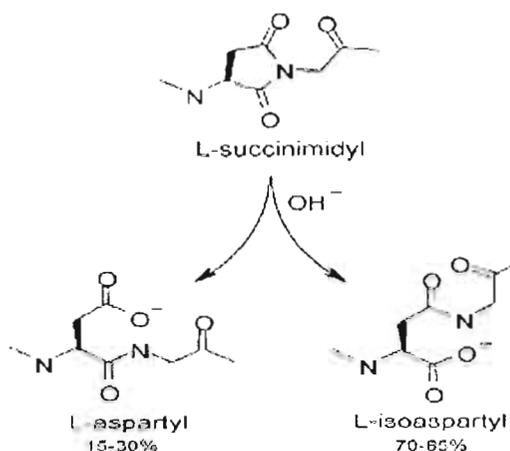


Figure 1.2 Pourcentage des produits résultant de l'hydrolyse spontanée du L-succinimide (Tirée de Young et al, 2005)

Des quatre résidus formés suite à l'hydrolyse du L-succinimide ou D-succinimide, le L-isoaspartate et le D-aspartate sont ceux qui sont reconnus par la PIMT (Figure 1.3). Effectivement, ces substrats sont ceux qui une fois méthylés par la PIMT se transforment plus aisément en L-succinimide dû à la facilité du groupe méthylester à être libéré dans le milieu sous forme de méthanol (McFadden et Clarke, 1987) (Figure 1.4) Par contre, le résidu L-isoaspartate est celui qui est majoritairement méthylé par la PIMT (Lowenson et Clarke, 1991; 1992).

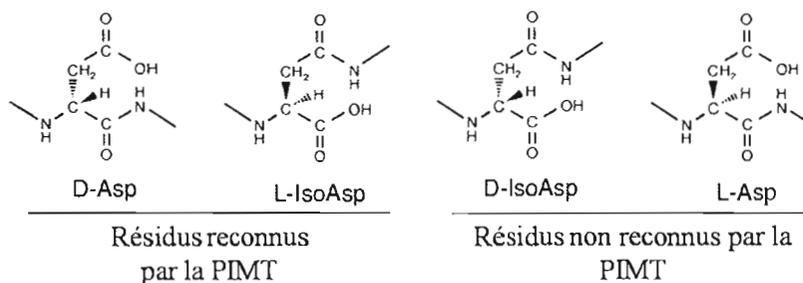


Figure 1.3 Substrats de la PIMT (Tirée de Shimizu, Matsuoka et Shirasawa, 2005)

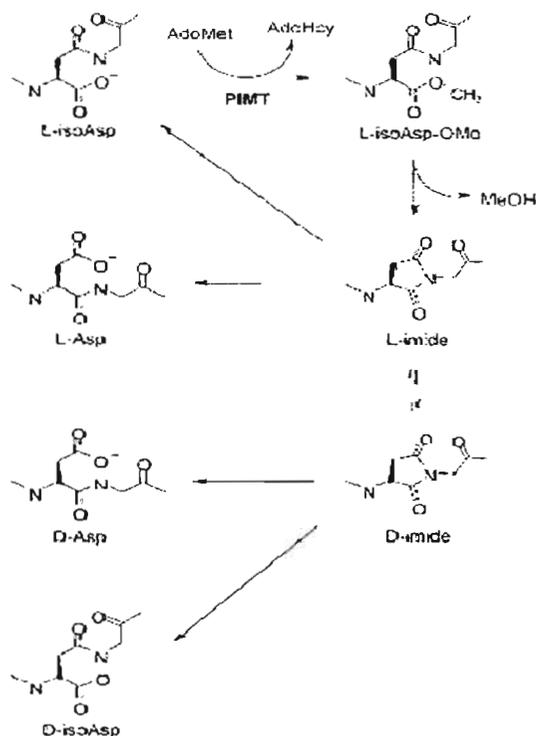


Figure 1.4 Mécanisme de réparation de la PIMT (Tirée de Young *et al.*, 2005)

La molécule AdoMet est la source de groupements méthyles dans les systèmes biologiques (Agrimi *et al.*, 2004). La PIMT, comme toutes les autres enzymes ayant une activité méthyltransférase, utilise donc cette molécule au sein du cytoplasme (Figure 1.5). La PIMT transfère le groupement méthyle de l'AdoMet sur le groupe α -carboxyle du résidu L-isoaspartate et du D-aspartate (Clarke, 2003; Reissner et Aswad, 2003). Une fois que l'AdoMet a donné son groupement méthyle, celle-ci se transforme en S-adenosylhomocystéine (SAH). Cette dernière servira à la synthèse du propionyl CoA et la molécule AdoMet sera générée par la dégradation de la méthionine (Voet et Voet, 1998)



Figure 1.5 La molécule S-adenosylméthionine (Tirée de PubChem SID 176451)

La méthylation est une étape cruciale dans la réparation des résidus aspartates endommagés. Effectivement, une étude a mentionné que le traitement des cellules cancéreuses de la lignée PC12 du rat avec un inhibiteur de la méthylation (adénosine dialdéhyde) entraîne l'accumulation de résidus aspartate anormaux (Johnson, Najbauer et Aswad, 1993). De plus, il semblerait qu'un équilibre du ratio AdoMet : SAH est important dans les systèmes biologiques. Une étude a démontrée chez le rat consommant de l'alcool, qu'un renversement du ratio AdoMet : SAH, initialement anormal, a permis de restaurer l'activité de la PIMT suite à l'administration de bétaïne (Kharbanda *et al.*, 2007). D'ailleurs, la molécule SAH est l'inhibiteur naturel de la réaction enzymatique de la PIMT, puisqu'une condition favorisant la surproduction de SAH, telle l'hyperhomocystéinémie, inhibe l'activité de la PIMT (Perna *et al.*, 2001a). De plus, la littérature mentionne que le ratio AdoMet : SAH est important pour maintenir le potentiel excitatoire dans le cerveau (Farrar et Clarke, 2002).

Le mécanisme de réparation des résidus aspartates anormaux est également valable pour la PIMT elle-même. En effet, des résidus L-isoaspartate et D-aspartate ont déjà été retrouvés sur la PIMT et il a été démontré que ceux-ci sont réparés par les autres molécules de PIMT environnantes (Lindquist et McFadden, 1994; Lindquist, Barofsky et McFadden, 1996).

1.1.3 Les protéines endommagées et la PIMT

L'isomérisation du résidu L-aspartate et la déamidation du résidu L-asparagine cause la formation du résidu L-isoaspartate sous des conditions physiologiques normales. Ce résidu endommagé s'accumule dans les protéines avec l'âge. Cette accumulation a été observée chez le rat et également *in vitro*. Effectivement, le rat accumule des protéines endommagées au niveau du foie (Ghandour *et al.*, 2002) et la tubuline endommagée s'accumule au niveau du cerveau (Najbauer, Orpiszewski et Aswad, 1996). *In vitro*, la synapsine I, a été rapportée pour accumuler progressivement des résidus aspartates anormaux lors d'une incubation progressive sous des conditions mimant celles physiologiques (Paranandi et Aswad, 1995). Le processus de réparation semble donc augmenter en fonction de l'augmentation des résidus aspartates anormaux. *In vivo*, il a été noté chez le rat que le niveau d'expression de la PIMT est synergique au développement de certains tissus, comme des testicules et que cette expression reste élevée dans certains tissus ayant atteint la maturation comme le cerveau (Mizobuchi *et al.*, 1994).

Les conditions de stress provoquent la formation des résidus aspartates anormaux et stimulent l'expression de la PIMT. Effectivement, il a été cité que le stress oxydatif induit par H₂O₂ augmente l'altération des résidus aspartates sur les protéines membranaires des érythrocytes humains (Ingrosso *et al.*, 2000). D'ailleurs, chez les humains atteints du syndrome de Down, pour qui le stress oxydatif est chronique et le vieillissement est prématuré, il a été observé que les érythrocytes de ces personnes présentent une forte isomérisation des protéines au niveau de la membrane (Galletti *et al.*, 2007). La chaleur peut également être un stress inducteur de formation de résidus L-isoaspartates. En effet, il a été rapporté que le niveau de méthylation des protéines augmente en réponse au stress thermique dans les cellules HeLa (Ladino et O'Connor, 1992). Une étude mentionne que la PIMT permet de prolonger la viabilité de *Escherichia coli* à 55°C (Li et Clarke, 1992). Les facteurs environnementaux sont aussi sources de stress. Il a été observé que les UVA augmentent la formation des résidus L-aspartates sur les protéines des mélanomes (D'Angelo *et al.*, 2001). Chez les plantes, il a été démontré que l'activité de la PIMT augmente au sein des tissus végétatifs en réponse à la dessiccation, au vieillissement, et au stress environnemental (Mudgett et Clarke, 1994).

La formation de résidus aspartates anormaux a été observée dans des protéines ayant des fonctions variées et chez différents organismes. Chez le porc et la souris, par exemple, la pro-opiomélanocortine a été rapportée pour contenir des résidus aspartates altérés (Tableau 1.1). Les études ayant permis de vérifier la présence de résidus aspartates anormaux sur ces protéines, n'ont pas démontrées si celles-ci sont des substrats majeurs de la PIMT. Par contre, des études protéomiques réalisées en 2006, ont permis d'identifier les substrats majeurs de la PIMT dans le cerveau et les neurones de la souris (Tableau 1.2). Ces substrats sont impliqués dans plusieurs fonctions diverses telles que la stabilisation et la constitution des microtubules, le processus d'endocytose et de sécrétion, l'entreposage du calcium intracellulaire, la transmission synaptique, l'inactivation de la voie des MAPK par l'inhibition de Raf-1 et la dé-ubiquitination des protéines.

Tableau 1.1

Exemples de protéines comportant des résidus aspartates anormaux.

Nom de la protéine	Provenances	Références
Calmoduline	Érythrocytes humains	Ota et Clarke, 1990
Hémoglobuline	Érythrocytes humains	O'Connor et Yutzey, 1988
Pro-opiomélanocortine	Souris et porc	Toney <i>et al.</i> , 1993
Alpha globuline	Érythrocytes humains	Ladino et O'Connor, 1991

Tableau 1.2

Substrats majeurs de la PIMT dans le cerveau et les neurones de la souris

Nom de la protéine	Sources	Références
CRMP2	Neurones	Zhu <i>et al.</i> , 2006b
Dynamine I	Neurones	Zhu <i>et al.</i> , 2006b
Tubuline	Neurones	Zhu <i>et al.</i> , 2006b
Synapsine I	Neurones	Zhu <i>et al.</i> , 2006b
Synapsine II	Neurones	Zhu <i>et al.</i> , 2006b
MAP2	Cerveau	Vigneswara <i>et al.</i> , 2006
Calréticuline	Cerveau	Vigneswara <i>et al.</i> , 2006
Clathrine	Cerveau	Vigneswara <i>et al.</i> , 2006
UCH-L1	Cerveau	Vigneswara <i>et al.</i> , 2006
PEPB	Cerveau	Vigneswara <i>et al.</i> , 2006
Stathmine	Cerveau	Vigneswara <i>et al.</i> , 2006
Beta-synucléine	Cerveau	Vigneswara <i>et al.</i> , 2006
Alpha-synucléine	Cerveau	Vigneswara <i>et al.</i> , 2006

En ce qui concerne les microtubules, la stathmine, la protéine MAP-2 et la tubuline ont été identifiés pour être fortement réparées par la PIMT. La stathmine est une protéine qui déstabilise les microtubules. Lorsqu'elle est phosphorylée et activée par Rac sur la sérine 16 et par Cdc42 sur la sérine 38, qui elles sont activées par EGF (*Epidermal Growth Factor*), cet effet déstabilisateur est inhibé (Daub *et al.*, 2001). La protéine MAP2 (*microtubule associated protein 2*) est également impliquée dans la stabilisation des microtubules lorsqu'elle est activée par ERK1/2 sur la sérine 136. Elle est désactivée par GSK-3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) via la phosphorylation sur la thréonine 1620 et sur la thréonine 1623 (Berling *et al.*, 1994; Sánchez, Pérez et Avila, 2000). De plus, la tubuline, constituant les microtubules a été identifiée pour être un substrat majeur de la PIMT. Au sujet du processus d'endocytose et de sécrétion, la clathrine et la dynamine-1 ont été identifiées pour être des protéines accumulant des résidus aspartates anormaux et étant des substrats majeurs de la PIMT. La clathrine est une protéine majeure des structures membranaires responsables de l'internalisation des molécules dans la voie de l'endocytose (Rodriguez-Boulan, Kreitzer et Müsch, 2005) et la dynamine-1 est une GTPase responsable de la formation des vésicules pour le processus d'endocytose et de la sécrétion par interaction avec la protéine PKC (*Protein Kinase C*) (Ahn *et al.*, 1999 ; McNiven *et al.*, 2000). En ce qui concerne le développement des neurones, la PIMT répare fortement la protéine CRMP-2 (*Collapsin response mediator protein 2*) qui est responsable de l'élongation des axones impliquant la tubuline et passant par la voie de signalisation PI3K/Akt et

inhibée par GSK3 β via la phosphorylation de la sérine 514 (Yoshimura *et al.*, 2005). Au sujet de l'entreposage du calcium intracellulaire, la PIMT réduit l'accumulation de résidus aspartates anormaux de la calréticuline, une protéine responsable de l'entreposage du calcium dans le réticulum endoplasmique (Groenendyk, Lynch et Michalak, 2004). En ce qui concerne la voie de MEK-ERK, la PIMT répare prioritairement la protéine RKIP (*Raf kinase inhibitor protein*), une protéine qui se lie au phosphatidyléthanolamine et qui inhibe Raf-1 empêchant ainsi l'activation de MEK et donc de ERK (Yeung *et al.*, 2000). Le processus de désubiquitination nécessite la réparation de la protéine UCH-L1 (*C-terminal hydrolase 11*) par la PIMT. Il s'agit d'une enzyme spécialisée dans la désubiquitination. De plus, la perte de l'activité d'UCH-L1 est impliquée dans le développement de certaines neuropathologies, telles que la maladie d'Huntington, le Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Gong et Leznik, 2007). En ce qui concerne la transmission synaptique, la PIMT répare majoritairement la synapsine I et la synapsine II, des protéines responsables de la régulation de la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Leur inactivation, telle une inhibition de la liaison avec les phospholipides, est effectuée via la phosphorylation de la sérine 9 par PKA (*protein kinase A*) ou CaMKI (*CaM Kinase I*) et est responsable de la dissociation de ces protéines dans les vésicules synaptiques (Hosaka, Hammer et Südhof, 1999).

Les effets de la présence des résidus aspartates anormaux sur les protéines sont multiples et diversifiés. En effet, il a été observé chez la souris auto-immune MRL que l'accumulation des résidus L-isoaspartates est associée à une prolifération défectueuse des cellules T (Yang *et al.*, 2006). Chez *Escherichia coli*, cette accumulation réduit sa viabilité (Visick, Cai et Clarke, 1998).

Des études sur certaines pathologies ont permis d'identifier la présence de protéines endommagées ayant des résidus aspartates anormaux. Effectivement, il a été rapporté que les enchevêtrements neurofibrillaires associés à la maladie d'Alzheimer contiennent un nombre sensiblement plus grand de résidus aspartates anormaux que les protéines inchangées de la matière grise environnante ou dans les préparations comparables à partir des cerveaux normaux (Payan *et al.*, 1992). De plus, la littérature mentionne que la protéine Prp-c impliquée dans le développement de l'encéphalopathie spongiforme bovine présente des résidus aspartates altérés (Weber, McFadden et Caughey, 1998 ; Sandmeier *et al.*, 1999). Il a également été observé que la membrane des érythrocytes chez les patients atteints de sphérocytose héréditaire est beaucoup plus méthylée que la membrane des érythrocytes des patients normaux (Ingrosso *et al.*, 1995). Des études ont aussi permis de constater que la quantité de protéines plasmatiques présentant des résidus L-isoaspartates, augmente chez les patients souffrants d'insuffisance rénale chronique (Perna *et al.*, 2001).

1.1.4 Les fonctions biologiques de la PIMT

Plusieurs phénomènes suite à l'abolition ou à la mutation du gène de la PIMT chez l'humain, le *Caenorhabditis elegans* et la souris ont été observés. En effet, le polymorphisme du gène de la PIMT chez certains humains altère la maintenance de l'immunité périphérique (Doyle, Gee et Mamula, 2003) et entraîne un risque de spina-bifida chez la souris (Zhu *et al.*, 2006b). Chez le *Caenorhabditis elegans*, une mutation dans le gène de la PIMT nuit à sa longévité et inhibe l'autophagie durant le développement du ver suggérant ainsi une perturbation des voies de dégradation des protéines (Gomez *et al.*, 2007). En ce qui concerne l'abolition du gène de la PIMT, il a été mentionné dans la littérature que l'histone H2B chez la souris déficiente en PIMT présente une accumulation de résidus L-isoaspartates 80 fois plus grande que la protéine chez une souris normale (Young *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré chez la souris déficiente en PIMT, un retard significatif de croissance, une augmentation du nombre de cellules granuleuses dans le gyrus dentelé, une épilepsie progressive et des attaques d'origine cérébrale fatales à 42 jours d'existence (Kim *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Farrar *et al.*, 2005).

Certaines différences au niveau de l'expression de la PIMT ont été observées chez des organismes sains et des organismes atteints de certaines pathologies. Effectivement, chez les patients atteints d'Alzheimer, la PIMT est surexprimée dans les neurones dégénérants et son expression est associée aux enchevêtrements neurofibrillaires (Shimizu *et al.*, 2000). Dans les cataractes, la PIMT est moins exprimée que dans le cristallin normal (Komada *et al.*, 1995). De plus, la littérature mentionne des résultats expérimentaux mettant en relation l'expression de la PIMT avec l'épilepsie. Effectivement, chez l'humain épileptique, l'activité de la PIMT est réduite de 50% dans l'hippocampe (Lanthier *et al.*, 2002). De plus, une étude a démontrée que l'expression transgénique de la PIMT, dans le cerveau des souris déficientes en PIMT et atteintes d'épilepsie, leur permet de survivre (Shimizu *et al.*, 2002). Chez les patients atteints de cancer, l'expression et l'activité de la PIMT diminue progressivement en fonction du stage de progression des tumeurs astrocytaires (Lapointe *et al.*, 2005). Bien qu'il ne s'agisse pas d'une pathologie, le stress oxydatif et la formation des espèces oxygénées réactives qui en découle chez les glioblastomes, stimulent l'expression de la PIMT (Fanéus et Desrosiers, 2008).

La PIMT est impliquée dans quelques phénomènes cellulaires. En effet, lorsque la PIMT répare les résidus L-isoaspartates sur le collagène I, celle-ci restaure la migration cellulaire (Lanthier et Desrosiers, 2004). De plus, la PIMT protège contre l'apoptose induite par Bax (Huebscher *et al.*, 1999).

Des études ont aussi démontrées des pistes sur les voies de signalisation modulant l'expression de la PIMT. En effet, l'expression de la PIMT est stimulée par le détachement et inhibée par l'adhésion cellulaire via l'activation de l'intégrine $\alpha\beta3$. De plus, la diminution de l'expression de la PIMT est contrôlée par une voie impliquant PI3K et la dégradation par le protéasome, lors de l'adhésion cellulaire (Lanthier et Desrosiers, 2006).

Il est incontestable de prétendre que la PIMT est importante pour divers systèmes biologiques et que la normalité de son expression est essentielle afin de maintenir une bonne santé. À l'heure actuelle, le mécanisme de réparation des résidus aspartates anormaux par la PIMT est bien compris. Par contre, les voies de signalisation contrôlant son expression et les voies de signalisation pouvant être affectées par un niveau d'expression anormal, soit trop faible ou trop élevé, sont très peu connues. Très peu de travaux de recherche se sont consacrés à la connaissance de l'impact de l'expression de la PIMT sur les voies de signalisation intracellulaires. Toutefois, certaines études ont rapportées que la suppression de la PIMT a un effet sur certaines d'entre elles. Effectivement, chez les cellules rénales d'embryons humains incubées en présence du facteur de croissance EGF, pour lesquelles la PIMT est inhibée par un plasmide exprimant le siRNA, il y a suractivation de la voie de signalisation MEK-ERK. (Kosugi *et al.*, 2008). De plus, chez la souris déficiente en PIMT, il y a activation de la voie de PI3K/AKT (Farrar, Houser et Clarke, 2003).

1.2 Voies de signalisation activées par la suppression *in vivo* de la PIMT

1.2.1 Voie de signalisation des MEK-ERK

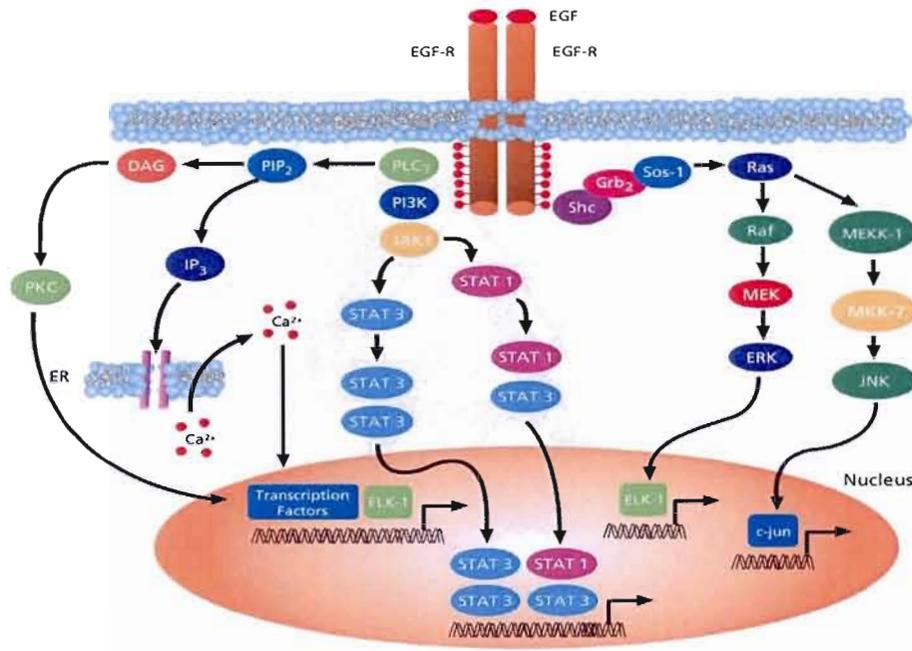


Figure 1.6 Voies de signalisation sous le contrôle du récepteur EGF

(Tirée de www.sigmaldrich.com)

La famille des récepteurs du facteur de croissance (EGF) comporte des récepteurs tyrosine kinases et se compose de quatre membres tels qu'EGF-R (ErbB1), ErbB2, ErbB3, et ErbB4. Tous ont un domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire, et un domaine extracellulaire impliqué dans la liaison avec le ligand et la dimérisation du récepteur. Par contre, ErbB2 ne se lie à aucun ligand et ErbB3 possède une très faible activité tyrosine kinase. L'activation d'EGF-R déclenche diverses voies de signalisation intracellulaires (Figure 1.6). La dimérisation du récepteur EGF-R active sa phosphorylation et entraîne une cascade de signalisation aboutissant à la prolifération cellulaire ou à l'apoptose (Wells, 1999). Lorsque celui-ci est activé par EGF, la phosphorylation du récepteur est reconnue par le complexe cytoplasmique SOS-GRB2. Cette liaison est reconnue par la protéine SOS et ainsi active l'hydrolyse du GTP en GDP de RAS, une GTPase (Figure 1.7) (Margolis et Skolnik, 1994).

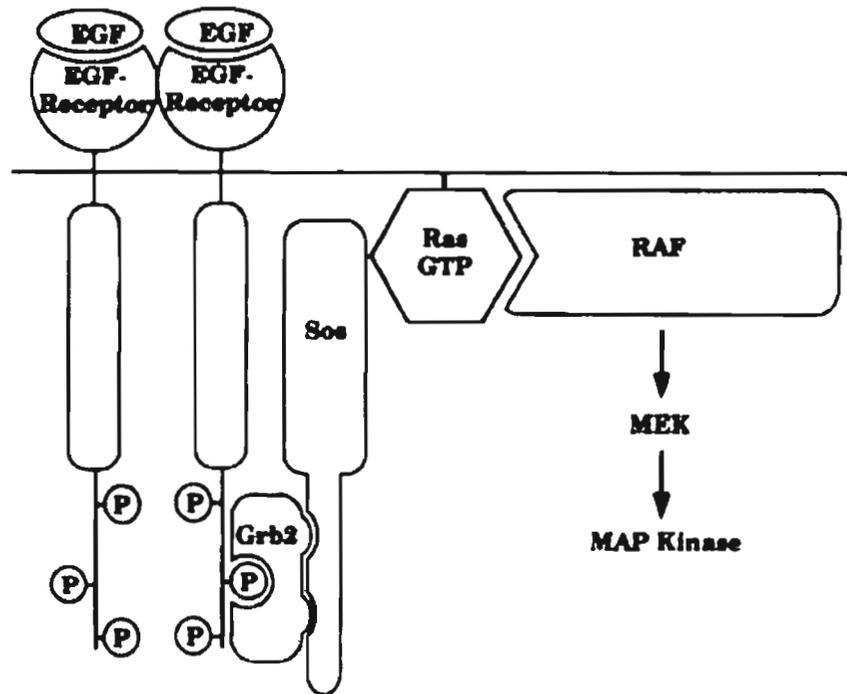


Figure 1.7 Activation de Ras par la dimérisation du récepteur tyrosine kinase
(Tirée de Margolis et Skolnik, 1994)

Par la suite, Ras, permet l'autophosphorylation de Raf-1 sur la sérine 338. Ainsi activé, Raf-1 phosphoryle MEK1/2 sur la sérine 217 et 221 qui a son tour devient activé et phosphoryle ERK1/2 sur la thréonine 202 (Zebish *et al.*, 2006). Les travaux de l'équipe de Kosugi, démontrent donc une augmentation du niveau de phosphorylation de Raf-1, MEK1/2 et ERK1/2 et associent cette hyperphosphorylation avec l'épilepsie myoclonique progressive de Lafora, suggérant que la suppression de la PIMT inhibe l'activité d'une phosphatase, entraînant cette pathologie (Kosugi *et al.*, 2008).

1.2.2 Voie de signalisation de PI3K/AKT/GSK3 β

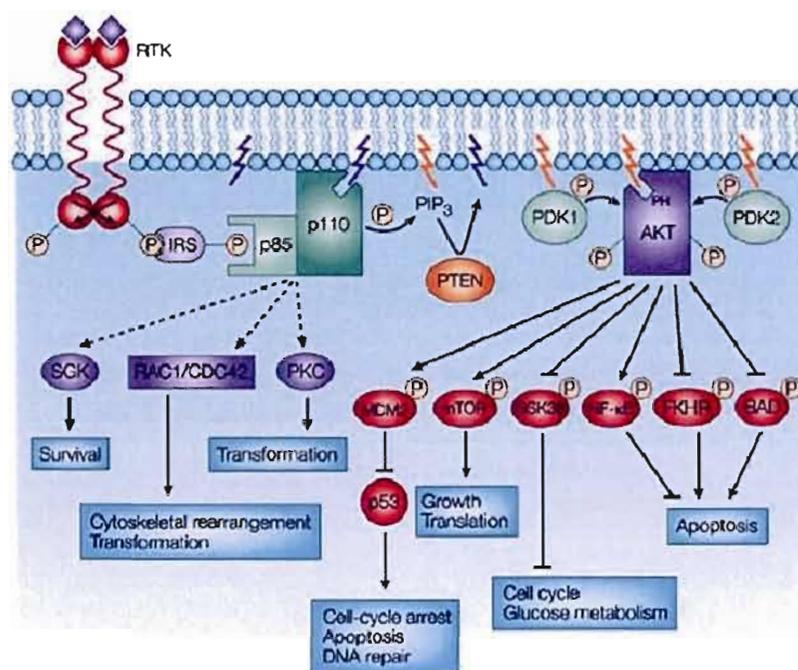


Figure 1.8 Voie de signalisation PI3K/AKT stimulée par IGF-I et/ou l'insuline
(Tirée de Pollak, Schernhammer et Hankinson, 2004)

Les travaux de l'équipe de Farrar (2005), ont démontré une augmentation de l'expression du récepteur de l'insuline et/ou d'IGF-I de concert avec l'activation de l'axe de signalisation PDK-1, Akt1 et GSK3 β dans l'hippocampe de la souris déficiente en PIMT. L'induction du signal intracellulaire du récepteur de l'insuline et/ou d'IGF-I, stimule plusieurs voies de signalisation et ainsi plusieurs fonctions cellulaires, dont la stimulation du métabolisme du glucose (Figure 1.8). La liaison de l'insuline ou du facteur de croissance I (IGF) au récepteur IGF-I mène à l'autophosphorylation des sous-unités β et à la phosphorylation des résidus tyrosines de la protéine IRS. Ainsi, le domaine SH2 de la sous-unité p85 de PI3K se lie aux résidus phosphotyrosines d'IRS et phosphoryle à son tour PIP₂ pour former PIP₃. Par la suite, PIP₃ recrute la protéine PDK-1 au niveau membranaire et ainsi induit son activation. PDK-1 ainsi activée phosphoryle Akt1 sur la thréonine 308. Akt1 ainsi activé inhibe GSK3 β par une phosphorylation sur la sérine 9 (Horn *et al.*, 2004) et de ce fait active la synthèse du glycogène.

L'étude fait par l'équipe de Farrar (2005) démontre une forte concentration sanguine d'insuline due à l'augmentation de la concentration sanguine de glucose, et également, à une augmentation de la masse du cerveau lorsque la PIMT est inhibée chez la souris. Ils considèrent dans leur étude que l'inhibition de GSK3 β active la β -caténine et que cette dernière stimule la croissance cellulaire. Ils considèrent également que l'inhibition de GSK3 β augmente la synthèse du glycogène. Ainsi, leur conclusion stipule que l'inhibition de GSK3 β dans le contexte d'inhibition de la PIMT, suggère que la PIMT est un régulateur critique du métabolisme et de la croissance cellulaire (Farrar *et al.*, 2005).

1.3 L'enrichissement des phosphoprotéines

L'ensemble des gènes codant pour les protéines d'un organisme est appelé protéome (Griffiths *et al.*, 2001). Le phosphoprotéome est un sous-ensemble du protéome et représente les protéines sous leurs formes phosphorylées. Celui-ci représente 30% du protéome. La phosphorylation est une modification post-transductionnelle des protéines jouant un rôle critique dans le contrôle de beaucoup de processus cellulaires tels que la croissance et la différenciation ainsi que l'apoptose. L'activation des protéines par la phosphorylation se produit via le résidu sérine, le résidu thréonine et le résidu tyrosine pour un taux respectif de phosphorylation de 1000 / 100 / 1. L'identification des protéines phosphorylées et la caractérisation des sites de phosphorylation est cruciale pour comprendre divers événements de signalisation lié au phosphoprotéome. (Schmidt, Schweikart et Andersson, 2007).

Plusieurs méthodes chromatographiques existent actuellement pour enrichir les phosphoprotéines à partir d'un lysat cellulaire et ainsi analyser le phosphoprotéome (Figure 1.9). Ces méthodes sont basées sur les caractéristiques des phosphoprotéines comme critères de sélection. Tout d'abord, l'altération de la charge nette de la protéine selon son point isoélectrique, permet une séparation par une chromatographie d'échange ionique ou une chromatographie selon un gradient de pH précis (*chromatofocusing*). Puisque le point isoélectrique (pI) d'une protéine correspond au pH auquel la protéine n'a pas de charge, si le pH < pI, la charge globale est positive, car la molécule a tendance à conserver ses protons ou à en capter du milieu acide. Si le pH > pI, la charge globale est négative, car la molécule a tendance à céder ses protons au milieu basique. De plus, il est possible d'enrichir un échantillon en phosphoprotéines par l'immunoprécipitation. Cette technique permet de précipiter les phosphoprotéines par ajout d'un anticorps dirigé et jumelé à une bille contre la sérine, la thréonine ou la tyrosine phosphorylée. Par contre, l'efficacité de cette méthode est très discutable. Et

finalement, il est possible d'enrichir les phosphoprotéines par l'affinité du groupement phosphate pour les ions métalliques.

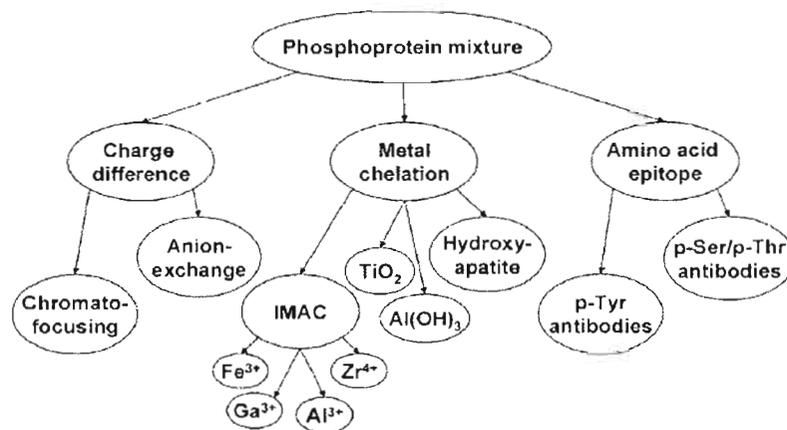


Figure 1.9 Stratégies protéomiques de type chromatographique permettant l'enrichissement des phosphoprotéines (Tirée de Schmidt, Schweikart et Andersson, 2007)

Ce dernier critère de sélection regroupe trois types de chromatographies tels que l'IMAC (*immobilised metal ion affinity chromatography*), l'hydroxyapatite et les oxydes métalliques (Figure 1.9). L'IMAC est une chromatographie utilisant une résine, une membrane ou des billes magnétiques associées à un complexe acide-ion métallique tel que celui composé de l'acide iminoacétique ou de l'acide nitriloacétique avec un ion métallique trivalent comme le fer et le gallénium. Ces métaux attirent ainsi les groupements phosphates des phosphoprotéines dans un intervalle de pH se situant entre 2,0 et 3,5 et l'éluion se fait par un changement de pH. L'efficacité de cette chromatographie a été améliorée en complexant deux atomes de zinc avec l'acide iminoacétique ou l'acide nitriloacétique. Effectivement, ce complexe entraîne la formation d'un pont alkoxyde qui permet ainsi une liaison avec les phosphoprotéines dans un pH physiologique. Le second type de chromatographie utilise l'hydroxyapatite comme matrice d'affinité pour les phosphoprotéines. Il s'agit d'un complexe de calcium et de phosphate ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Son rendement est faible puisque les acides aminés chargés négativement se lient à la matrice et ainsi favorise la liaison des protéines non-spécifiques. Finalement, le dernier type fait intervenir un oxyde métallique tel que le dioxyde de titane (TiO_2) ou le trioxyde d'aluminium ($\text{Al}(\text{OH})_3$). L'utilisation du TiO_2 donne un bon rendement, mais le principe de liaison des phosphoprotéines avec le métal n'a pas encore été démontré. Par contre, la méthode d'enrichissement des phosphoprotéines faisant intervenir le trioxyde d'aluminium est une nouvelle méthode mise au point par l'équipe de Wolschin. Elle est efficace et peut coûteuse (Wolschin, Wienkoop et Weckwerth, 2005; Schmidt, Schweikart et Andersson, 2007).

1.4 Les phosphoprotéines ERK, RSK et AKT impliqués dans les voies de signalisation.

Le tableau 1.3 représente les protéines étudiées au cours de ce travail de recherche et leurs caractéristiques. La protéine ERK1 et la protéine ERK2 ont été choisis comme protéines d'étude puisqu'il a été démontré que la PIMT est impliquée dans l'épilepsie et que l'acide valproïque, un médicament prescrit pour contrôler cette pathologie, agit sur la voie de signalisation de MEK1/2-ERK1/2.

ERK1 et ERK2 font parties de la famille des MAPK (Mitogen-activated protein kinase) qui sont des protéines kinases de type sérine/thréonine impliquées dans beaucoup de phénomènes cellulaires tels que la prolifération de cellules, la différenciation, la motilité, et la mort cellulaire (Sundaram, 2006). Comme présenté au tableau 1.3, ERK1 et ERK2 n'ont pas le même poids moléculaire. De plus, il a été démontré que ERK1 agit de manière antagoniste à ERK2 lorsqu'activée par MEK, diminuant ainsi l'activation d'ERK2 par MEK. (Lloyd, 2006).

Tableau 1.3

Caractéristiques des protéines à l'étude

Nom de la protéine	Poids moléculaire (kDa)	pI	Nombre de sites de phosphorylation	Sites de phosphorylation à l'étude
ERK1	44	6,28	2	T202 et Y204
ERK2	42	6,53	3	T185 et Y187
RSK1	90	7,68	8	S221
RSK2	90	6,41	8	S227
AKT1	60	5,75	11	T308

(Données tirées de www.phosphosite.org)

La voie de signalisation des MAPK (ERK1/2) est une voie qui peut être activée en réponse à une gamme diverse de stimuli extracellulaires comprenant des mitogènes, des facteurs de croissance, et des cytokines et est une cible importante dans le diagnostic et le traitement du cancer. En effet, comme la voie des MAPK stimule la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires, et que cette voie est généralement altérée dans différentes pathologies, il est apparu qu'elle pourrait être une bonne cible d'action thérapeutique. Ainsi, la modulation de la voie Ras-MAPK pourrait être utilisée dans le

traitement de nombreuses pathologies humaines incluant le cancer, les maladies inflammatoires, la douleur, l'hypertrophie cardiaque. Il existe des rationnels forts pour explorer le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de la voie ERK comme antitumoraux, fondés sur le fait qu'un large spectre de tumeurs humaines présente des activations des voies de signalisation ERK (> 45 %), notamment par mutation des gènes ras et raf. Trois protéines ont été retenues avec une attention particulière pour les interventions pharmacologiques de la voie ERK, il s'agit de Ras, Raf et MEK. (Roux et Blenis, 2004; Roberts et Der, 2007) (Figure 1.10).

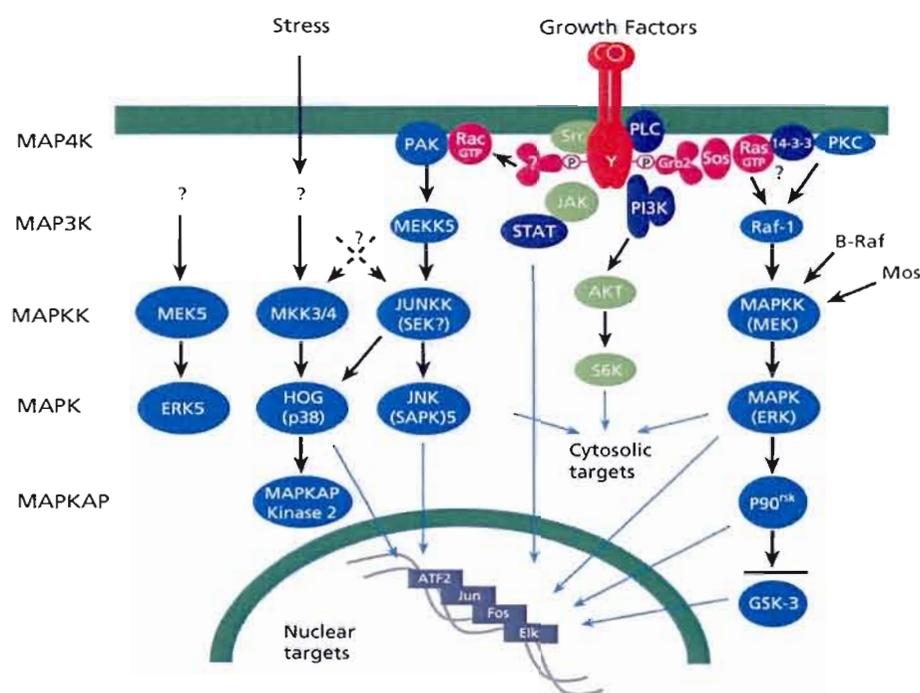


Figure 1.10 Voie de signalisation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases)
(Tirée de www.sigmaaldrich.com)

Puisque RSK1 et RSK2 sont des protéines activées par ERK1/2, ces protéines ont été choisies en ce sens. La protéine RSK1 et la protéine RSK2 (ribosomal S6 kinase) sont des protéines de type sérine/thréonine kinases. Elles sont en position terminale de la voie de ERK, et sont activées par ERK1/2 par une phosphorylation sur la sérine 369, la sérine 386 et la thréonine 577. RSK2 est également activé par PDK1 suite à la phosphorylation de la sérine 227. La figure 1.12 présente ces sites de phosphorylation sur les domaines de la protéine RSK1 et RSK2. Effectivement, la sérine 227

se retrouve dans la région N-terminale, la serine 369 et la sérine 386 se concentre sur la région centrale des deux isoformes et la thréonine 577 se situe sur le domaine C-terminal (Figure 1.12). Les isoformes de RSK, tels que RSK1, RSK2 et RSK3 sont impliqués dans des phénomènes cellulaires tels que la prolifération de cellules, la différenciation, la motilité, et la mort (Williams *et al.*, 2000; Sundaram, 2006).

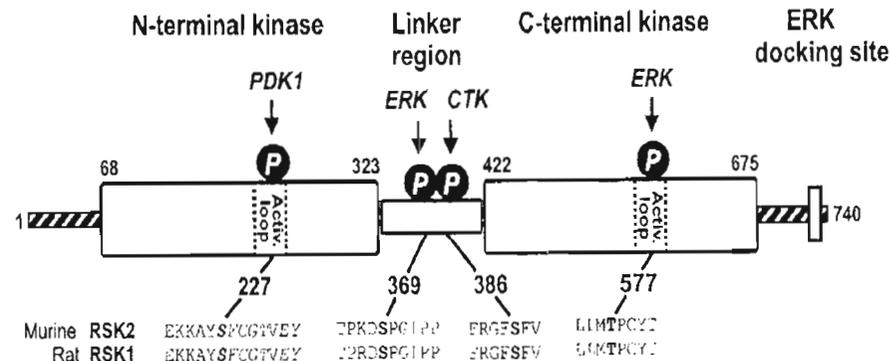


Figure 1.12 Sites de phosphorylation de RSK 1 et RSK2 (Tirée de Jensen *et al.*, 1999)

Une pathologie connue pour impliquer les protéines RSK est le syndrome de Coffin-Lowry. Il s'agit d'une affection génétique d'expression semi-dominante liée au chromosome X. Des mutations, impliquées dans la perte de fonction du gène RPS6KA3 localisé sur le chromosome Xp22.2 et codant pour la protéine RSK2, sont responsables de ce syndrome (Hanauer et Young, 2002). De plus RSK, est une cible thérapeutique actuellement étudiée dans le traitement du cancer (Nguyen, 2008).

Étant donné les travaux exécutés par l'équipe de Farrar en 2005 présentés à la page 16, la protéine Akt a été choisie comme point d'intérêt dans le cadre de ce travail de recherche. Cette protéine, également désignée sous le nom de PKB, joue un rôle critique dans le contrôle de l'apoptose et de la survie cellulaire (Franke, Kaplan et Cantley, 1997). Cette protéine kinase est activée par l'insuline ainsi que divers facteurs de croissance, comme IGF-I (Franke *et al.*, 1995). Akt est activé par la protéine PDK1 via la thréonine 308 (Alessi *et al.*, 1996) et via la sérine 473 par la protéine PDK2 (Partovian et Simons, 2004). Comme les travaux de Farrar ciblaient l'axe de signalisation PDK1-Akt-GSK3- β -caténine et que PDK1 active Akt par la phosphorylation sur la thréonine 308, ce site de phosphorylation a été choisi pour cette étude. Akt phosphoryle de nombreuses protéines et donc interagit avec de nombreuses voies de signalisation (Figure 1.11). Elle joue un rôle central dans la régulation de l'apoptose, et sa dérégulation se trouve de ce fait souvent associée à la progression de

différents cancers : la recherche d'inhibiteurs spécifiques d'Akt ouvre donc une voie intéressante vers la découverte de nouvelles substances antitumorales. Akt est également connue pour phosphoryler la protéine Huntingtin et ainsi avoir un rôle de neuroprotection, notamment dans la maladie de Huntington (Humbert et Saudou, 2005).

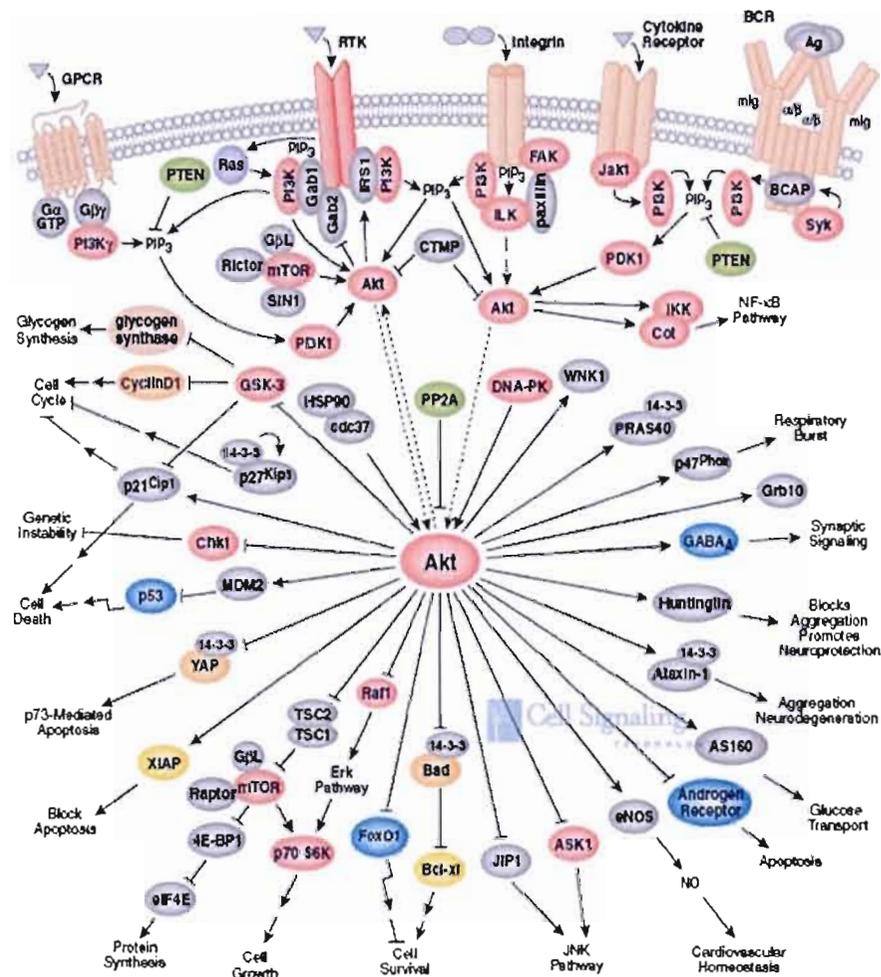


Figure 1.11 Voies de signalisation impliquant Akt (Tirée de www.cellsignal.com)

1.5 Objectif de recherche

La PIMT est une enzyme importante veillant à l'intégrité des résidus aspartates dans les protéines intracellulaires, particulièrement au niveau du cerveau. Plusieurs travaux de recherche sont parvenus à mettre en évidence qu'une altération du niveau de la PIMT est un aspect moléculaire incontestable de certaines neuropathologies. Ainsi, l'importance de connaître les retombées de la modulation de son expression et de son activité sur les voies de signalisations intracellulaires est capitale. Le présent travail de recherche s'est donc consacré à cette investigation en comparant le phosphoprotéome régié par le niveau endogène de la PIMT et le phosphoprotéome sous l'effet de l'inhibition de son expression dans les glioblastomes humains de la lignée U-87. Pour parvenir à cette fin, la technologie du siRNA, la technologie de micro-puces d'anticorps ainsi que l'enrichissement des phosphoprotéines par chromatographie d'affinité de type MOAC ont été employés. L'analyse phosphoprotéomique sous le contrôle de l'inhibition de la PIMT démontre que celle-ci inhibe la phosphorylation de ERK1/2, mais stimule la phosphorylation d'Akt1 et de RSK1/2.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

La lignée de cellules gliales cancéreuses U-87 provient d'American Type Cell Collection (ATCC) (Rockville, MA, États-Unis). L'anticorps polyclonal contre la PIMT provient du service de production d'anticorps de l'Institut de recherche en biotechnologies (Montréal, QC, Canada) et a été produit dans le lapin selon la méthode qui a été décrite par Boivin (1995). L'anticorps polyclonal contre la thioredoxine réductase 1 provient de chez Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, États-Unis). La molécule d'AdoMet radioactive ($[^3\text{H}]$ AdoMet) provient de chez Dupont-New England Nuclear (Boston, MA, États-Unis). L'anticorps monoclonal contre EKRI/2, contre phospho-ERK1/2 (Y204 et T202), contre Akt1, contre phospho-Akt1 (T308) et l'anticorps polyclonal contre RSK1 proviennent de chez Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, États-Unis). L'anticorps polyclonal contre phospho-RSK1 (S221)/RSK2 (S227) a été obtenu de chez R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, États-Unis). Les anticorps secondaires anti-lapin, anti-chèvre et anti-souris ont été acquis de Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA, États-Unis). Le colorant Pro-Q Diamond provient de chez Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada) et le standard de poids moléculaire (SDS-PAGE, low range) provient de chez Bio-Rad Laboratories (Mississauga, On, Canada). Les colonnes Centriprep Ultrafree-0.5 PBCC Biomax Membrane 5kDa ont été obtenues de chez Millipore LTD (Billerica, MA, États-Unis). La lambda phosphatase, l'anticorps secondaire de lapin, l'anticorps secondaire de souris et l'anticorps secondaire de chèvre proviennent de chez New England BioLabs (Ipswich, MA, États-Unis). La méthode BCA provient de chez Pierce (Rockford, IL, États-Unis). Les anticorps monoclonaux contre la β -actine, la molécule SAH, la molécule AdoMet ainsi que tout le reste des produits ont été obtenus de Sigma (Oakville, ON, Canada).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

Les cellules glioblastomes ont été maintenues dans un milieu MEM, obtenu chez Invitrogen (Burlington, ON, Canada), contenant 10% de sérum de veau, provenant de chez Hyclone Laboratories (Logan, UT, États-Unis) et supplémenté de 1 mM de sodium pyruvate dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2 à 37°C.

2.2.2 *Traitements des cellules avec des siRNAs contre PIMT et contre TrxR*

Chaque puits d'une plaque de six puits a étéensemencé de 100 000 cellules U-87 dans un milieu MEM avec sérum pour 48 heures. Une fois ce temps écoulé, le milieu MEM a été remplacé par du milieu frais contenant du sérum. Ensuite, un milieu sans sérum contenant l'agent transfectant, soit la lipofectamineTM 2000 obtenue d'Invitrogen, a été ajouté au puits correspondant à la condition contrôle et un milieu sans sérum contenant la lipofectamine et le siRNA contre la PIMT (séquence confidentielle) a été ajouté au puits correspondant à la condition d'inhibition de la PIMT. Finalement, dans le puits correspondant au contrôle de la spécificité du siRNA, un milieu sans sérum contenant la lipofectamine et le siRNA TrxR a été ajouté. Le siRNA TrxR a été choisit comme siRNA contrôle étant donné que la concentration requise et l'agent transfectant sont identiques pour le traitement avec le siRNA PIMT et également parce que la thiorédoxine est connue pour ne pas interférer avec la PIMT. Les siRNAs PIMT et TrxR ont été obtenus de Quiagen (Mississauga, ON, Canada). De plus, ceux-ci ont été ajoutés de façon à obtenir une concentration finale de siRNA de 100 nM dans le milieu. Après 42 heures, les cellules ont été lysées (voir section 2.2.4) et l'expression de la PIMT en présence du siRNA contre la PIMT et l'expression de la TrxR en présence du siRNA contre la TrxR ont été vérifiées par immunobuvardage de type Western.

2.2.3 *Traitements des cellules avec l'acide valproïque*

Chaque puits d'une plaque de six puits a étéensemencé de 100 000 cellules U-87 dans un milieu MEM avec sérum pour 48 heures. Une fois ce temps écoulé, le milieu MEM a été remplacé par du milieu frais contenant du sérum. Ensuite, l'acide valproïque obtenu de chez Sigma (Oakville, On, Canada) et dissout dans l'eau a été ajouté à ce milieu pour obtenir une concentration finale de 5 mM. Après 24 heures, les cellules ont été lysées et l'expression des protéines a été examinée par immunobuvardage de type Western.

2.2.4 *Lyse cellulaire*

Dans le but d'enlever le milieu MEM et le sérum, les cellules ont été lavées deux fois avec 1 mL de tampon phosphate salin (PBS) ne contenant ni calcium ni magnésium, préchauffé à 37°C. Les cellules ont ensuite été lysées dans du tampon de lyse froid, contenant 30 mM de MES (acide 2-(N-Morpholino) éthanesulfonique), 20 mM d'Imidazole, 1 mM d'EDTA et 1% de CHAPS, auquel a été

préalablement ajouté du fluorure de sodium (NaF), du sodium vanadate (Na_2VO_4) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases provenant de chez New England Biolabs pour une concentration finale dans les trois cas, de 1 mM. Les cellules ont été récoltées avec un grattoir et conservées sur la glace pour 30 minutes avec une agitation aux 10 minutes. Par la suite, les cellules ont été centrifugées à 10 000 g pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants post-nucléaires ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à ce que les échantillons soient analysés.

2.2.5 *Enrichissement des phosphoprotéines*

Ce protocole est basé sur la méthode décrite par Wolschin et son équipe (Wolschin, Wienkoop et Weckwerth, 2005) ainsi que celle de Dubrovskaya et Souchelnytskyi (2005).

En triplicata, 400 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$, a été équilibré dans un tube eppendorf de 2 mL avec 1,4 mL de tampon d'équilibration contenant 30 mM MES (acide 2-(N-Morpholino) éthanesulfonique), 20 mM Imidazole, 200 mM aspartate de potassium, 200 mM glutamate de sodium et 0,25 % de CHAPS pendant 30 minutes à température pièce sur une plaque sérologique et avec une agitation sur vortex aux 15 minutes. Par la suite, une seconde équilibration a été effectuée ; 1,4 mL de nouveau tampon d'équilibration a été ajouté après avoir retiré le surnageant suite à une centrifugation de 2 minutes à 4500 g à température pièce.

Les protéines des surnageants post-nucléaires ont été dosées avec la méthode BCA provenant de chez Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). Ensuite, 1 mg de protéines a été ajouté à chacun des trois tubes eppendorfs et les volumes finaux ont été ajustés à 1,4 mL avec le tampon d'équilibration. Les tubes eppendorfs contenant 400 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ ont été agités pendant 45 minutes à 4°C sur une plaque sérologique et ont été vortexés après 20 minutes et après 45 minutes. La fraction des protéines non-liées (NL) a été obtenue en retirant le surnageant suite à une centrifugation à 4500 g pendant 2 minutes à 4°C. Ensuite, de façon à retirer toutes les protéines non-liées, 1,4 mL de tampon d'équilibration a été ajouté à chacun des trois tubes lesquels ont été agités pendant 10 minutes à 4°C sur une plaque sérologique. De nouveau, les tampons ont été retirés à la suite d'une centrifugation de 4500 g pendant 2 minutes à 4°C. Cette étape a été répétée deux autres fois, de façon à récupérer trois fractions de lavage avec le tampon d'équilibration. De manière à éliminer les sels qui sont très abondants dans le tampon d'équilibration, la matrice a été lavée en ajoutant 1,4 mL de tampon 10 mM Tris-HCl pH 6,8 à chacun des trois tubes eppendorfs et ensuite, ceux-ci ont été agités pendant 10 minutes à 4°C sur une plaque sérologique. Les fractions de lavage ont été récupérées en retirant les

surnageants à la suite d'une centrifugation de 4500 g pendant 2 minutes à 4°C. Cette étape de lavage a ensuite été répétée.

Afin d'éluer les protéines liées à la matrice, 800 µl de tampon d'élution contenant 120 mM Tris/HCl pH 6,8 et 1% SDS fût ajouté à chacun des trois tubes eppendorfs et ceux-ci ont été agités durant 30 minutes sur une plaque sérologique à température pièce et ont été vortexés après 15 et 30 minutes. Par la suite, les trois tubes eppendorfs ont été chauffés durant 5 minutes à 95°C avec une agitation toutes les minutes. La fraction d'élution, contenant les phosphoprotéines, a ensuite été récupérée en retirant les surnageants à la suite d'une centrifugation de 4500 g pendant 2 minutes à température pièce. Afin de prévenir la déphosphorylation des protéines, du fluorure de sodium (NaF) et du sodium vanadate (Na_3VO_4) ont été préalablement ajouté au tampon de lyse.

Pour diminuer la concentration en sels dans les fractions des protéines non-liées à la matrice, 400 µl de ces fractions ont été déposées dans deux colonnes Centriprep et ont été centrifugées durant 40 minutes à 5000 g à 4°C de manière à réduire les volumes à 50 µL. Quatre dilutions ont été effectuées en ajoutant de l'eau nanopure égal au double du volume obtenu à la suite de chaque centrifugation. Par la suite, les fractions concentrées et désalées ont été obtenues en combinant les volumes récoltés de chaque Centriprep (environ 100 µl au total). Les protéines ont été précipitées avec six volumes d'acétone refroidi à -20°C (environ 600 µl) et ont été placées à -20°C pour la nuit.

Les phosphoprotéines contenues dans la fraction d'élution (E) ont été concentrées en déposant 400 µL des fractions d'élution dans deux colonnes Centriprep et celles-ci ont été centrifugées pendant 20 minutes à 5000 g à température pièce. L'ajout de 400 µL des fractions d'élution à chaque colonne Centriprep à été répété deux autres fois. Par la suite, les fractions concentrées ont été obtenues en combinant les volumes récoltés de chaque Centriprep (environ 100 µl au total). Les protéines ont été précipitées avec six volumes d'acétone refroidi à -20°C (environ 600 µl) et ont été placées à -20°C pour la nuit.

La fraction des protéines totales (PT) a été obtenue en précipitant 150 µg du lysat total de protéines avec 6 volumes d'acétone refroidi à -20°C (environ 600 µl) et placer à -20°C pour la nuit. Pour récolter les protéines des échantillons précipités à l'acétone (PT, NL et E), les surnageants ont été retirés suite à une première centrifugation de 7500 g pendant 5 minutes à température pièce et suite à une seconde centrifugation de 20 secondes afin de retirer l'acétone résiduel. Par la suite, les culots protéiques ont été asséchés sous la hotte durant 4 minutes. Les culots de la fraction NL et E ont été

solubilisés dans 90 μL de tampon de resuspension contenant 60 mM de Tris/HCl pH 6,8 et 1% de SDS. Le culot de PT a été solubilisé dans 100 μL de tampon de resuspension. Finalement, les échantillons ont été agités pour dissoudre les culots et les protéines contenues dans les fractions (PT, NL et E) ont été dosées à l'aide de la méthode BCA.

2.2.6 *Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunobuvardage de type Western*

Les quantités voulues de protéines ont été prélevées et agitées dans 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). 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 (TEMED) et 0,5 mg/ml de (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 $\mu\text{l/ml}$ de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS. La migration des protéines s'est effectuée à 110 volts pendant 15 minutes et s'est poursuivie à 150 volts jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit sorti du gel.

Suite à l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidène difluoride) ayant une porosité de 0,45 μm . Les transferts ont été effectués à 15 V 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.

2.2.7 *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. Certains anticorps ont été dilués dans un tampon TBS contenant 0,1% de Tween-20 tels que celui de la PIMT 1 : 100000, de la thiorédoxine réductase 1 : 100 et de la β -actine 1 : 500. Certains anticorps ont été dilués dans un tampon TBS contenant 0,1% de Tween-20 et 5% d'albumine bovine tels que celui de ERK1/2 1 : 1000, de phospho-ERK1/2 1 : 1000, d'Akt1 1 : 625, de phospho-Akt1 1 : 1000 et de

RSK1 1 :190. L'anticorps de phospho-RSK1(S221)/RSK2(S227) a été dilué dans un tampon TBS contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de lait 1 : 652. 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. Suivant cette incubation, les membranes de PVDF ont été mises en présence d'un tampon TBS contenant 0,1% de Tween-20 et contenant l'anticorps secondaire approprié, soit lapin 1 :2500, soit souris 1 :2500 ou soit chèvre 1 :1000, pendant 1 heure. Ensuite, les membranes ont de nouveau subi trois lavages successifs de 15 minutes dans un tampon TBS contenant 0,3% de Tween-20. Les membranes ont par la suite été mises en présence d'une solution permettant d'obtenir un signal de chemiluminescence pendant 1 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, IPLab Gel obtenu de chez BD Biosciences (Rockville, MD, États-Unis), intégré à un système d'imagerie numérique.

2.2.8 Coloration des gels avec le Pro-Q Diamond

Une fois l'électrophorèse terminée, les gels ont été incubés toute la nuit dans une solution de fixation (50% méthanol, 40% eau et 10% acide acétique). Ensuite, ceux-ci ont subi trois lavages de 10 minutes avec de l'eau. Les gels ont été colorés dans l'obscurité avec la solution de Pro-Q-Diamond (32% de Pro-Q Diamond et 68% eau), selon la méthode proposée par Agrawal et Thelen (2005). Le Pro-Q Diamond est spécifique aux résidus sérine, thréonine et tyrosine phosphorylés, donc aux phosphoprotéines. Par la suite, les gels, toujours dans l'obscurité, ont été lavés trois fois pendant 30 minutes avec une solution de décoloration (1M sodium acétate pH 4: acétonitrile : eau ; 20 : 5 : 75). Les gels ont été lavés deux fois pendant 5 minutes avec de l'eau dans l'obscurité. Par la suite, les gels ont été protégés de la lumière jusqu'à la prise de l'image, qui elle a été réalisée à l'aide de l'appareil Imager System FluorChem provenant d'Alpha Innotech Corporation (San Leandro, CA, États-Unis) et d'une source de rayonnement UV de 365 nm.

2.2.9 Coloration de l'ensemble des protéines sur gel avec le bleu de Coomassie

Suite à la coloration au Pro-Q Diamond, les gels ont été colorés pendant nuit avec le bleu de Coomassie colloïdal (0,1% (p/v) bleu de Coomassie (G-250), 34% (v/v) méthanol, 0,0005% (v/v) acide acétique, 17% (p/v) ammonium sulfate ((NH₄)₂ SO₄)). Les gels ont été décolorés avec quatre

lavages d'eau bouillante pendant 15 minutes. Par la suite, la prise de l'image a été effectuée dans le visible à l'aide de l'appareil Imager System FluorChem (Alpha Innotech Corporation).

2.2.10 Essais de méthylation pour les substrats de la PIMT

En quadruplicata, dans des tubes eppendorfs, pour la condition contrôle du bruit de fond radioactif (A), a été déposé une solution d'un volume final de 30 μ l contenant les concentrations finales des produits suivants; 0,61 μ M [3 H]Adomet, 9,39 μ M d'AdoMet froid, 0,1 M d'Hepes/Tris pH 7,0 et dont le volume final a été ajusté avec de l'eau. En quadruplicata, dans des tubes eppendorfs, pour la condition témoin de l'activité endogène de la PIMT (B) et pour la condition des échantillons traités (C), a été déposé la même solution que ci-dessus. Par la suite, ces trois séries de tubes ont été agitées quelques secondes. Ensuite, 2 μ M de PIMT recombinante a été rajouté à la série C. Par la suite, 40 μ g de protéines provenant des surnageants post-nucléaires ont été ajoutés à la partie supérieure des tubes des séries B et C. Les tubes ont été centrifugés légèrement. Ensuite, les tubes ont été incubés à 37°C dans un bain sec pendant 60 minutes. Pour arrêter la réaction de méthylation, les tubes ont été retirés du bain sec et à chacun d'entre eux 10 μ l de 15 mM de SAH, a été ajouté. Les tubes ont ensuite été agités et conservés sur glace. Afin d'hydrolyser les groupements méthyles, 40 μ l de la solution d'hydrolyse (0,2N NaOH et 1% SDS), a été ajouté à chaque tube et chacun d'eux fût agité. Par la suite, sur un papier buvard individuel et préalablement plié en accordéon, 50 μ l de chaque tube eppendorf fût déposé au centre de celui-ci. Chacun des papiers buvards a été placé délicatement dans la partie supérieure (goulot) d'un tube à scintillation contenant 20 ml de cocktail à scintillation (5% (p/v) de 2,5-diphényloxazole, 30% (v/v) de Triton X-100, 60% (v/v) de toluène, 10% (v/v) d'éthanol), de manière à éviter le contact entre le cocktail à scintillation et le papier buvard. Les tubes ont été fermés et le méthanol radioactif a diffusé pendant 2 heures. Finalement, les papiers buvards ont été retirés minutieusement des tubes et le compte de la radioactivité pour chaque tube fût effectué avec un compteur à scintillation pendant 1 minute.

2.2.11 Déphosphorylation des protéines par la lambda phosphatase

Les protéines (250 μ g) ont été prélevées et déposées dans un tube eppendorf auquel du SDS a été ajouté afin d'obtenir une concentration finale de 1% puis les tubes furent agités. Le volume a ensuite été ajusté à 975 μ l avec de l'eau et le mélange a été légèrement agité. Ensuite, 5 μ l de 20 mM de $MnCl_2$ a été ajouté et le tube eppendorf fût légèrement agité. Par la suite, 20 μ l de tampon de

lambda phosphatase (composition confidentielle) a été ajouté et le tube eppendorf fût légèrement agité. La solution a ensuite été divisée en deux volumes égaux et 0,25 μ l (100 unités) de lambda phosphatase est ajouté à un des deux volumes. Ces tubes eppendorfs furent ensuite agités quelques secondes et ont été incubés pendant 3 heures à 30°C. Ensuite, les deux échantillons ont été placés à -80°C jusqu'à l'électrophorèse.

2.2.12 Analyse protéomique par micro-puces d'anticorps

Chaque puits d'une plaque de six puits a étéensemencé de 100 000 cellules U-87 dans un milieu MEM avec sérum pour 48 heures. Une fois ce temps écoulé, le milieu MEM a été remplacé par du milieu frais contenant du sérum. Ensuite, un milieu sans sérum contenant de la lipofectamine a été ajouté au puits correspondant à la condition contrôle et un milieu sans sérum contenant la lipofectamine et le siRNA contre la PIMT a été ajouté au puits correspondant à la condition d'inhibition de la PIMT. Après 42 heures, les cellules de la condition contrôle et de la condition traitée ont été lavées deux fois avec 1 mL de PBS ne contenant ni calcium ni magnésium, préchauffé à 37°C. Ensuite les cellules ont été centrifugées à 5000 g pendant 5 minutes. Les surnageants ont été enlevés et les culots ont été congelés à -80°C jusqu'à l'analyse protéomique par micro-puces d'anticorps. Cette analyse consiste à comparer deux profils protéiques par l'incubation individuelle de deux échantillons, qui dans le cadre de cette étude, sont le lysat contrôle et le lysat traité avec le siRNA contre la PIMT. Ces échantillons sont incubés en présence d'une micro-puce sur laquelle des anticorps spécifiques ont été fixés. Le profil d'expression des protéines se dresse donc suite à l'analyse de l'intensité des signaux correspondants à la reconnaissance des protéines par leur anticorps. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de protéines reconnues dans le lysat. Pour cette étude, cette analyse fût effectuée selon un protocole confidentiel chez la compagnie Kinexus à Vancouver.

2.2.13 Analyses statistiques

Les expériences ont été réalisées au moins trois fois chacune et les moyennes et les écarts-types ont été déterminés à l'aide du logiciel Prism de Macintosh. Les analyses statistiques ont été effectuées par test païré selon la méthode du « *Student test* ».

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Le Pro-Q Diamond colore les phosphoprotéines du surnageant post-nucléaire ainsi que l'ovalbumine du standard de bas poids moléculaire.

Comme le colorant Pro-Q Diamond colore les phosphoprotéines, son efficacité dans les lysats de cellules U-87 a été vérifiée. La figure 3.1 représente des profils phosphoprotéiques pour trois groupes distincts d'échantillons pour lesquels trois conditions telles que le contrôle, et les traitements avec 100 U et 2000 U de lambda phosphatase sont comparées. Étant donné que la lambda phosphatase déphosphoryle les résidus sérines, thréonines et tyrosines, l'utilisation de celle-ci permet de renforcer la spécificité du Pro-Q Diamond pour les phosphoprotéines (Kato *et al.*, 2005). La coloration du gel avec le Pro-Q Diamond montre que l'ovalbumine réagit fortement avec le colorant (Figure 3.1, puits 1-3). Ceci est attendu car l'ovalbumine est connue pour être phosphorylée. L'intensité de la fluorescence de l'ovalbumine semble légèrement diminuer en fonction de l'augmentation de la concentration de la phosphatase (Figure 3.1, puits 1-3). Le second groupe d'échantillons (Figure 3.1, puits 4-6) représente la coloration des phosphoprotéines du surnageant post-nucléaire des cellules cultivées dans un milieu sans sérum et le troisième groupe (Figure 3.1, puits 7-9) représente la coloration des phosphoprotéines des cellules cultivées dans un milieu avec sérum. Comme le sérum est responsable en grande partie de la croissance des cellules, sa présence est donc une source de stimulation des voies de signalisation intracellulaire et ainsi à une augmentation du niveau de la phosphorylation des protéines. Cependant, la présence de sérum ne semble pas accroître la coloration des phosphoprotéines. Cela est probablement dû à la faible concentration des facteurs de croissance présents dans le sérum. Dans les deux groupes, l'intensité du signal au Pro-Q Diamond semble diminuer légèrement en fonction de la concentration de la lambda phosphatase. Étant donné sa grande spécificité pour les phosphoprotéines, la coloration au Pro-Q Diamond a donc été conservée.

3.2 Effets de quantités croissantes de trioxyde d'aluminium et de la présence de SDS dans le tampon d'élution sur le rendement en phosphoprotéines.

L'enrichissement des phosphoprotéines d'un surnageant post-nucléaire a été effectué selon la méthode d'enrichissement des phosphoprotéines décrite par l'équipe de Wolschin (2005). Étant donné

la quantité élevée de protéines de départ proposée par Wolschin et ses collaborateurs, soit 2,5 mg de protéines pour 80 mg de matrice, le rendement en phosphoprotéines avec 1 mg de protéines et différentes quantités de matrice ont été examinées. Le rendement en phosphoprotéines selon différentes conditions d'élution a également été examiné. L'élution a été effectuée avec 800 µl d'une solution contenant 100 mM de pyrophosphate, comme mentionnée par Wolschin et ses collaborateurs (2005) et celle-ci a été testée avec une quantité de matrice de 100 mg, 200 mg et 400 mg. L'augmentation de la quantité de matrice diminue le rendement en phosphoprotéines dans l'éluat (Figure 3.2, A, B et C, puit E1). De plus, l'élution a été effectuée avec 800 µl du tampon de chargement qui permet la migration des échantillons sur gel SDS-PAGE (4% SDS, 10% β-mercaptoéthanol, 16% de glycérol et 1,5 M Tris-HCl pH 8,8) avec une quantité de 400 mg de matrice. La composition de ce tampon d'élution est inspirée de celle proposée par la méthode de Dubrovskaya et Souchelnyskiy (2005) (100 mM DTT, 2% SDS, 50 mM Tris/HCl, pH 6.8). En raison de la présence du SDS et de l'opportunité de déposer directement la fraction d'élution sur gel SDS-PAGE, ce tampon a été testé. Effectivement, la présence de SDS améliore l'élution des phosphoprotéines (Figure 3.2 C et D, puit E1). Donc, le tampon d'élution contenant 4% SDS semble plus efficace que celui avec 100 mM pyrophosphate pour éluer les phosphoprotéines. Ce tampon d'élution a donc été conservé pour la suite de l'optimisation de la méthode.

3.3 Une seule étape est suffisante afin d'éluer la majorité des phosphoprotéines.

Afin d'améliorer la migration sur SDS-PAGE des protéines contenues dans la fraction d'élution, la matrice de trioxyde d'aluminium a été lavée au préalable avec 10 mM Tris/HCl pH 6.8 plutôt qu'avec les tampons riches en sels de la méthode originale (Wolschin *et al.*, 2005). De plus, comme effectué dans la méthode de Dubrovskaya et Souchelnyskiy (2005), la matrice de trioxyde d'aluminium a été chauffée à 95°C durant 5 minutes pour faciliter l'élution des phosphoprotéines. La figure 3.3 montre le fractionnement des phosphoprotéines lors des trois étapes d'élution ainsi que les phosphoprotéines encore liées à la matrice après l'élution. La coloration au Pro-Q-Diamond permet de constater que la majorité des phosphoprotéines sont éluées dans la première élution et que peu de protéines restent liées à la matrice. Par ailleurs, certaines phosphoprotéines sont retrouvées dans les fractions non-liées à la matrice probablement dû à un manque d'affinité ou dû à une reconnaissance non-spécifiques du Pro-Q Diamond. Par contre, des phosphoprotéines sont retrouvées dans la fraction d'élution E1, ce qui démontre une affinité de certaines phosphoprotéines pour la matrice.

3.4 Le tampon d'élution contenant 1% de SDS est optimal pour éluer les phosphoprotéines.

L'effet de la concentration de SDS dans le tampon d'élution sur le détachement des phosphoprotéines de la matrice a été examiné. La figure 3.4 démontre que le tampon avec 1% de SDS est supérieur à celui avec 4% de SDS pour éluer les phosphoprotéines de la matrice de trioxyde d'aluminium. La quantification par densitométrie montre un rendement deux fois supérieur. D'autre part, la précipitation des protéines des autres fractions que celles de l'élution avec de l'acétone, permet un meilleur dosage des protéines qu'avec la méthode initiale de précipitation à l'acide acétique et au méthanol. En effet, l'acétone n'interfère pas avec la méthode de dosage, comparativement à l'acide acétique, qui lui crée des interférences puisqu'il n'est jamais totalement éliminé (résultats non montrés). Pour la suite de l'optimisation de la méthode, l'élution des protéines a été effectuée avec le tampon contenant 1% de SDS et les protéines des autres fractions ont été précipitées à l'acétone et solubilisées dans 60 mM de Tris/HCl pH 6,8 et 1% de SDS. Le dernier tampon est par ailleurs compatible avec un dosage des protéines par la méthode de BCA.

3.5 Fractionnement des phosphoprotéines par la chromatographie d'affinité.

La figure 3.5 représente le fractionnement des phosphoprotéines des surnageants post-nucléaires des cellules U-87 par la chromatographie d'affinité sur la matrice de trioxyde d'aluminium après les étapes d'optimisation. La figure 3.5A démontre qu'après un premier lavage, la plupart des protéines n'ayant aucune affinité pour la matrice sont éliminées. En comparant le profil phosphoprotéique de la fraction L1 (Figure 3.5A) avec le profil des protéines colorées au bleu de Coomassie (Figure 3.5B), il est évident que le contenu en phosphoprotéines de cette fraction est faible. À l'inverse, la comparaison des profils protéiques de la fraction E1 des gels colorés au Pro-Q Diamond et au Coomassie (Figure 3.5A et 3.5B) indique que le contenu en phosphoprotéines de cette fraction est important. Il est intéressant de remarquer que le profil phosphoprotéique de la fraction E1 est différent de celui trouvé pour la fraction NL (Figure 3.5A). Certaines protéines fortement présentes dans la fraction NL ne se retrouvent pas dans la fraction E1 probablement dû à un manque d'affinité de ces protéines pour la matrice. Par contre, à l'inverse certaines protéines présentes dans la fraction E1 et très faiblement présentes dans la fraction NL démontre une affinité de certaines protéines à la matrice. Ainsi, comme il s'agit d'une coloration spécifique aux phosphoprotéines avec le Pro-Q Diamond, ceci démontre donc un enrichissement des phosphoprotéines.

3.6 Enrichissement des phosphoprotéines par la chromatographie d'affinité.

La figure 3.6 représente l'enrichissement des phosphoprotéines des surnageants post-nucléaires des cellules U-87 lorsque des quantités égales de protéines sont appliquées sur gel pour les trois principales fractions chromatographiques soient PT, NL et E. La figure 3.6A montre la coloration des phosphoprotéines avec le Pro-Q Diamond pour chacune des fractions chromatographiques et la figure 3.6B est la coloration des protéines totales avec le bleu de Coomassie de ces fractions. L'analyse densitométrique montre un enrichissement de deux fois des phosphoprotéines dans l'éluat comparativement à celles dans les protéines totales. En effet, l'intensité de la coloration des phosphoprotéines pour la fraction E est nettement supérieure à la coloration des phosphoprotéines pour la fraction PT et surtout davantage par rapport à celles de la fraction NL qui présente un appauvrissement en protéines phosphorylées (Figure 3.6A). De plus, plusieurs phosphoprotéines colorées avec le Pro-Q Diamond dans la fraction E, le sont faiblement dans la fraction PT (Figure 3.6A). D'autre part, la fraction d'élution contient des protéines non-phosphorylées puisque les profils protéiques des gels colorés au Pro-Q Diamond et au bleu de Coomassie ne sont pas totalement superposables (Figure 3.6A et 3.6B). Ceci suggère que des protéines non-phosphorylées peuvent lier la matrice de trioxyde d'aluminium.

3.7 La chromatographie d'affinité fractionne les protéines selon le degré de phosphorylation.

La figure 3.7 démontre que la chromatographie d'affinité fractionne les protéines selon le degré de phosphorylation. La figure 3.7A démontre que la PIMT est enrichie dans la fraction des protéines non-liées et qu'elle est complètement absente de la fraction d'élution. Étant donné que la PIMT ne possède pas de sites de phosphorylation, son absence de la fraction d'élution est justifiée. Cependant, la figure 3.7B démontre que phospho-ERK1/2 ne se retrouve pas dans la fraction d'élution, bien qu'il s'agisse d'une phosphoprotéine. Par contre, la figure 3.7C indique que la protéine phospho-RSK1/2 se retrouve fortement enrichie dans la fraction d'élution soit de plus de 6 fois par rapport à la fraction des protéines totales. Étant donné que la PIMT ne possède pas de site de phosphorylation, que ERK1 possède deux sites de phosphorylation, que ERK2 en possède trois et que RSK1 et RSK2 en possèdent chacune huit, alors il semble très probable que la chromatographie fractionne les protéines selon le niveau de phosphorylation.

3.8 L'inhibition de la PIMT par le siRNA est élevée.

Les cellules U-87 ont été traitées avec un siRNA dirigé contre la PIMT pour inhiber l'expression de la PIMT. Cette condition d'inhibition de la PIMT par siRNA, comparativement à celle d'un niveau normal de la PIMT, peut nous renseigner sur le rôle de la PIMT dans la régulation de certaines voies de signalisation intracellulaires. La figure 3.8 représente l'efficacité d'inhibition de la PIMT par siRNA. Elle nous indique un niveau d'inhibition de la PIMT supérieur à 80%. Le siRNA contrôle, soit le siRNA TrxR a été choisit pour les raisons expliquer à la section 2.2.2 du matériel et méthodes.

3.9 ERK1, ERK2, RSK1, RSK2 et AKT1 sont des protéines ayant un niveau d'expression distinct lors de l'inhibition de la PIMT.

Plusieurs protéines ont été identifiées par la technique de micro-puces d'anticorps pour avoir un niveau d'expression différent à la suite de l'inhibition de la PIMT par siRNA. La figure 3.9A présente un tableau avec le nombre de phosphoprotéines (22) dont le niveau de phosphorylation est induit de plus de deux fois, le nombre de phosphoprotéines (22) dont le niveau de phosphorylation est inhibé de plus de deux fois, le nombre de protéines (25) dont le niveau d'expression est accru de plus de deux fois et le nombre de protéines (36) dont le niveau d'expression chute de plus de deux fois. En somme, 105 protéines sont considérablement modulées par l'inhibition de la PIMT. Ce tableau présente également des exemples de protéines fortement affectées par l'inhibition de la PIMT lors d'un traitement avec siRNA. En effet, la phosphorylation de la tyrosine hydroxylase sur la tyrosine 70 est induite de 10 fois, la phosphorylation de GSK3a/b sur la sérine 21 et sur la sérine 9 est inhibé de 4 fois, l'expression de la protéine p38a MAPK totale est induite de 5 fois et le niveau d'expression de la protéine 14-3-3 z est inhibé de 6 fois. La figure 3.9B présente les rapports du signal des cellules traitées avec le siRNA sur le signal des cellules contrôles pour les protéines étudiées dans le présent travail de recherche et ayant été identifiées par la technologie de micro-puces d'anticorps. Ainsi, les kinases ERK1, ERK2, RSK1, RSK2 et Akt1 sont ciblées. Par exemple, les rapports du signal des cellules traitées sur le signal des cellules contrôles sont pour les protéines ERK1/2 de 0.81, ERK1/2 phosphorylées de 0.82 et pour Akt1 phosphorylée de 0,49. De plus, ce rapport de signaux pour la protéine RSK1 et pour la protéine RSK1/2 phosphorylée est plutôt intéressant, car ils augmentent fortement. Effectivement, il est de 1,93 pour la protéine RSK1 et de 3,66 pour la protéine RSK1/2 phosphorylée. L'incohérence entre ces valeurs et le ratio des couleurs, est dû au fait que les valeurs représentent une moyenne de deux résultats et que les couleurs représentent un des deux résultats (les

couleurs). Pour la suite des expériences, ERK1, ERK2, RSK1, RSK2 et AKT1 ont été conservées comme sujets d'étude lors de l'inhibition de l'expression de la PIMT par siRNA.

3.10 L'inhibition de la PIMT réduit la phosphorylation de ERK1/2 mais stimule celle de Akt1 et de RSK1/2.

Les niveaux d'expression et de phosphorylation de ERK1/2, d'Akt1 et de RSK1 ont été investigués lorsque la PIMT est inhibée par siRNA. La figure 3.10 montre les niveaux d'expression et de phosphorylation de ces protéines dans les principales fractions chromatographiques soient, PT, NL et E. Les résultats concernant la PIMT confirment ceux obtenus à la figure 3.7 et 3.9. Effectivement, la PIMT est enrichie dans la fraction des protéines non-liées à la matrice de trioxyde d'aluminium. Par ailleurs, malgré une forte inhibition par le siRNA, la PIMT est encore enrichie dans la fraction des protéines non-liées.

Le résultat de l'expression de phospho-ERK1/2 confirme le résultat obtenu à la figure 3.9. En effet, phospho-ERK1/2, est légèrement enrichi dans la fraction des protéines non-liées à la matrice mais absente dans la fraction d'élution et ce, pour les cellules traitées avec le siRNA contre la PIMT et pour les cellules incubées avec la lipofectamine. Ce qui est particulier pour cette protéine est, qu'étant donné son absence dans la fraction d'élution, le niveau d'enrichissement dans la fraction des protéines non-liées devrait être beaucoup important, comme c'est le cas pour la PIMT. D'autre part, lorsque la PIMT est inhibée par siRNA, le niveau de phospho-ERK1/2 l'est aussi. En ce qui concerne le résultat pour les formes de ERK1/2, celles-ci se retrouvent fortement enrichies uniquement dans la fraction des protéines non-liées. D'autre part, l'inhibition de la PIMT par siRNA influence légèrement à la baisse l'expression de ERK1/2. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la PIMT par siRNA, montre une diminution de l'activation ERK1/2 comme reflété par la chute marquée de la phosphorylation de ERK1/2.

Les caractéristiques de phospho-Akt1 sont comparables à celles de phospho-ERK1/2 au sujet de leur affinité pour la matrice. Effectivement, phospho-Akt1 ne se retrouve pas dans la fraction d'élution malgré son état de phosphorylation, mais seulement dans la fraction des protéines non-liées. L'affinité de phospho-Akt1 pour la matrice de trioxyde d'aluminium est semblable pour les cellules contrôles et celles traitées avec le siRNA pour inhiber l'expression de la PIMT. D'autre part, l'inhibition de la PIMT stimule la phosphorylation de Akt1. En ce qui concerne Akt1 dans la condition contrôle, celle-ci semble légèrement enrichie dans la fraction d'élution. Pour la condition d'inhibition

de la PIMT par siRNA, Akt1 semble plutôt être enrichie dans la fraction des protéines non-liées. D'autre part, pour la fraction des protéines totales, l'inhibition de la PIMT semble inhiber l'expression d'Akt1. De plus, l'inhibition de l'expression d'Akt1 lors de l'inhibition de la PIMT est également visible dans la fraction d'élution. En comparant les résultats de phospho-Akt1 et de Akt1, à propos de leur affinité pour la matrice de trioxyde d'aluminium, seul Akt1 se retrouve dans la fraction d'élution. D'autre part, l'inhibition de la PIMT par siRNA augmente la phosphorylation de Akt1 tandis que son expression est réduite.

Les résultats pour la phosphorylation de RSK1/2 confirment ceux obtenus à la figure 3.9 au sujet de son affinité pour la matrice. En effet, phospho-RSK1/2 se retrouve enrichi dans la fraction d'élution et est absente de la fraction des protéines non-liées. Cette observation est valide autant pour la condition des cellules contrôles que pour la condition d'inhibition de la PIMT par siRNA. D'autre part, l'inhibition de l'expression de la PIMT stimule la phosphorylation de RSK1/2. Ce résultat est clairement observable dans la fraction d'élution. En ce qui concerne la protéine RSK1, celle-ci est exprimée similairement dans la fraction des protéines totales et dans la fraction d'élution et ce, pour les cellules contrôles et celles traitées avec le siRNA pour inhiber la PIMT. Pour ces deux conditions, RSK1 est absente de la fraction des protéines non-liées. En comparant les résultats de phospho-RSK1/2 et de RSK1, à propos de leur affinité pour la matrice de trioxyde d'aluminium, les deux se retrouvent dans la fraction d'élution uniquement. En comparant les résultats de phospho-RSK1/2 et de RSK1, lors de l'inhibition de la PIMT par siRNA, le niveau de phosphorylation de RSK1/2 augmente tandis que le niveau d'expression de RSK1 est constant. De ce fait, une chute d'expression de la PIMT produit une activation de RSK1.

Pour cette figure, un contrôle de la quantité de protéine comme β -actine ne pu être utilisé, étant donné une liaison possible de cette protéine pour la matrice ou vice-versa. Ainsi, seule la forme non-phosphorylée de chaque protéine analysée est considérée comme contrôle.

3.11 L'acide valproïque stimule l'expression de la PIMT et de RSK1 et active Akt1 et RSK1/2.

L'acide valproïque est un médicament utilisé pour traiter l'épilepsie et les désordres bipolaires. Celui-ci stimule la phosphorylation de ERK1/2 (Michaelis *et al.*, 2006), la phosphorylation de RSK1 (Einat *et al.*, 2003), la phosphorylation d'Akt1 et la phosphorylation de GSK3 β (De Sarno, Li et Jope, 2002). L'acide valproïque stimule également l'expression de RSK1 (Einat *et al.*, 2003). Puisque la PIMT est impliquée dans l'épilepsie, (Yamamoto *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Shimizu *et*

al., 2002) et que son expression est diminuée de 50% dans cette neuropathologie (Lanthier *et al.*, 2002), l'effet d'un traitement avec l'acide valproïque sur l'expression et la phosphorylation de Akt1 et RSK1 lors de l'inhibition de la PIMT par siRNA a été analysée.

La figure 3.11 montre le niveau d'expression de ces protéines lors de l'inhibition de la PIMT ainsi que lors de l'inhibition de la thiorédoxine réductase (TrxR) en présence et en absence de 5 mM d'acide valproïque. Les résultats concernant la PIMT confirment les résultats obtenus précédemment (Figure 3.7). Effectivement, la PIMT est inhibée de plus de 80% lors de l'utilisation du siRNA contre la PIMT alors que le siRNA contre la TrxR est sans effet sur son expression. Comme attendu, l'expression de la PIMT est stimulée par l'acide valproïque (Lamarre et Desrosiers, 2008). D'autre part, un siRNA contre la TrxR inhibe efficacement l'expression de sa protéine, mais celle-ci est insensible à l'action de l'acide valproïque.

De nouveau, la phosphorylation de Akt1 est stimulée lors de l'inhibition de la PIMT. Par contre, ce résultat est moins marqué qu'à la figure 3.10 probablement dû à une incubation de 24 h au lieu de 42 h avec le siRNA contre la PIMT. La même réponse est notée lors du traitement à l'acide valproïque. Lors du traitement à l'acide valproïque conjointement à l'inhibition de la TrxR, la phosphorylation de Akt1 est inhibée. D'autre part, l'inhibition de la thiorédoxine réductase conjointement au traitement de l'acide valproïque ne change pas l'expression d'Akt1. Ainsi, étant donné le niveau constant d'expression d'Akt1 dans toutes les conditions, l'augmentation de la phosphorylation d'Akt1 lors du traitement avec l'acide valproïque seul et conjointement avec l'inhibition de la PIMT ainsi que la diminution de la phosphorylation de Akt1 lors de l'inhibition de la TrxR conjointement à l'acide valproïque sont validés.

Comme précédemment (Figure 3.10), la phosphorylation de RSK1/2 semble légèrement augmenter lors de l'inhibition de la PIMT. Effectivement, ce résultat est moins marqué qu'à la figure 3.10, probablement dû à une incubation de 24 h au lieu de 42 h avec le siRNA contre la PIMT. Lors du traitement avec l'acide valproïque, sa phosphorylation ne varie pas. Pour ce qui est le RSK1, l'inhibition de la PIMT n'affecte pas son niveau d'expression. Par contre, lors du traitement avec l'acide valproïque son expression est fortement induite, et celle-ci diminue conjointement à l'inhibition de la PIMT.

L'effet de l'acide valproïque sur la phosphorylation de la protéine ERK1/2 dans les cellules traitées avec le siRNA contre la PIMT a été testé, mais les résultats montraient une grande variation

dans la réponse. Conséquemment, d'autres expériences devront être effectuées afin de clarifier le sens de ces résultats préliminaires

3.12 L'inhibition de la PIMT par le siRNA n'entraîne pas une accumulation de substrats.

La figure 3.12 démontre que l'inhibition de la PIMT par siRNA n'entraîne pas d'accumulation de protéines isomérisées. Effectivement, sur une période de 42 heures, le niveau de méthanol radioactif ne varie pas entre la condition contrôle et la condition d'inhibition de la PIMT. C'est également le cas pour la condition contrôle d'inhibition de la TrxR.

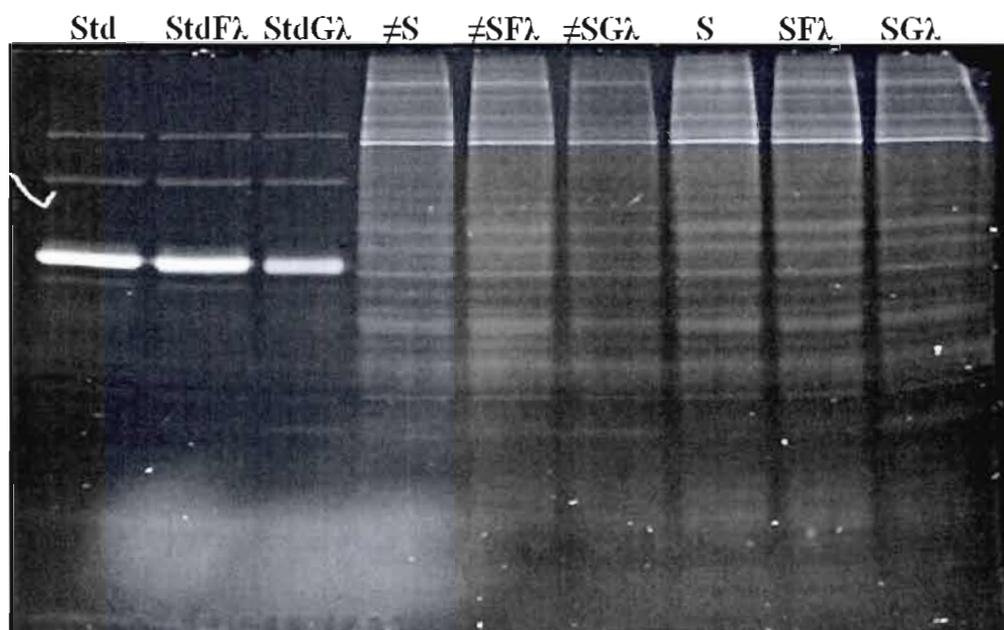


Figure 3.1 Coloration des protéines issues de surnageants post-nucléaires suite à l'incubation avec la lambda phosphatase. Les cellules U-87 ont été cultivées dans un milieu contenant du sérum (S) et sans sérum (\neq S) afin de stimuler les voies de signalisation intracellulaire et ainsi la phosphorylation des protéines. Les cellules ont ensuite été lysées lorsqu'elles ont atteint une confluence de 80%. Les protéines ont été incubées avec 100 U (F λ) et 2000 U (G λ) de Lambda phosphatase. Comme contrôle de la spécificité de la coloration du Pro-Q Diamond, les protéines du standard de poids moléculaire ont aussi été incubées avec 100 U (F λ) et 2000 U (G λ) de Lambda phosphatase, car l'ovalbumine est une protéine phosphorylée. Ensuite, 21,3 μ g de protéines ont été déposés par puits et analysés par SDS-PAGE. Le gel a été coloré au Pro-Q-Diamond.

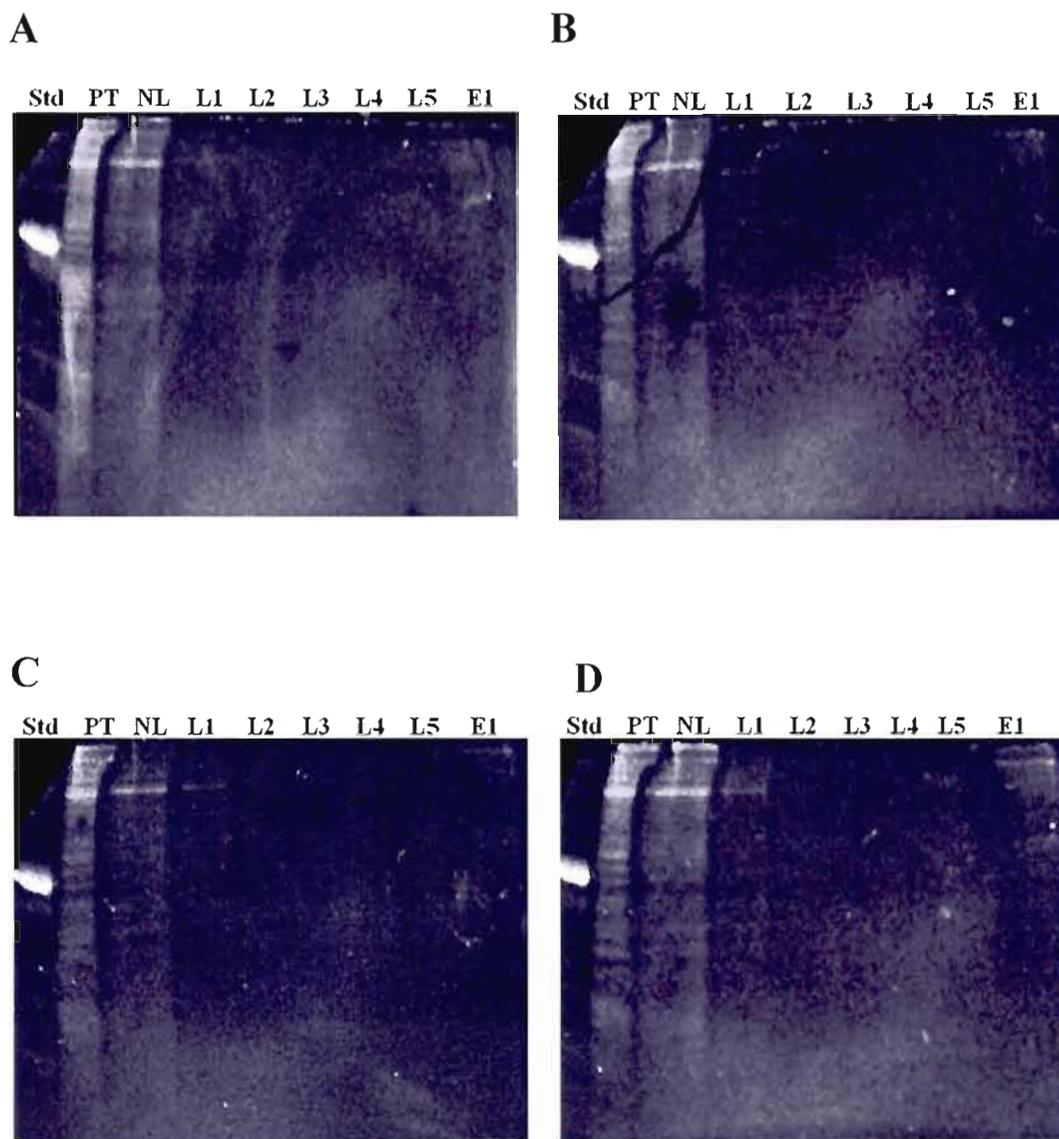


Figure 3.2 Efficacité d'éluion des phosphoprotéines en fonction de différentes quantités de matrice de trioxyde d'aluminium et de la présence de SDS. (A) Fractions chromatographiques d'une chromatographie effectuée avec 100 mg de trioxyde d'aluminium, 1 mg de protéines totales et un tampon d'éluion contenant 100 mM de pyrophosphate (B) Mêmes conditions que A, sauf avec 200 mg de trioxyde d'aluminium. (C) Mêmes conditions que A, sauf avec 400 mg de trioxyde d'aluminium. (D) Mêmes conditions que C sauf que le tampon d'éluion contient 4% de SDS, 10% β -mercaptoéthanol, 16% glycérol et 1.5 M Tris/HCl pH 8.8. Des volumes équivalents ont été déposés sur gel pour la fraction des protéines non-liées (NL) et les lavages (L) ainsi que pour la fraction d'éluion (E1). Pour le puits des protéines totales (PT), une quantité de protéines correspondant au volume équivalent a été déposée, soit 23 μ g. Tous les gels sont colorés au Pro-Q Diamond.

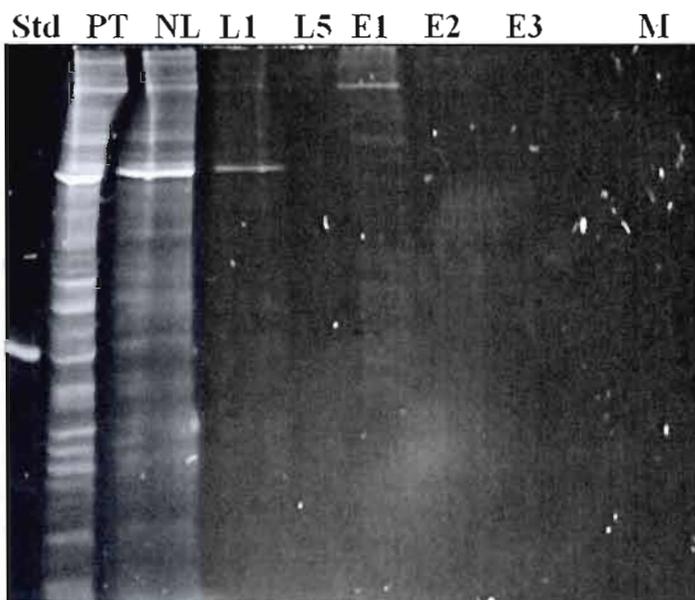


Figure 3.3. Évaluation de l'efficacité d'éluion des phosphoprotéines de la matrice de trioxyde d'aluminium. Fractions chromatographiques avec trois éluions successives de 30 minutes en présence de 4% de SDS, 10% β -mercaptoéthanol, 16% glycérol et 1.5 M Tris/HCl pH 6.8 suivi d'un chauffage de la matrice de trioxyde d'aluminium de 5 minutes à 95°C. Des volumes équivalents ont été déposés sur gel pour les fractions de protéines non-liées (NL) et les lavages (L). Afin de visualiser les protéines restant liées à la matrice avec l'éluion, un volume équivalent de la matrice (M) a été déposé sur gel. Pour le puits des protéines totales (PT), une quantité de protéines correspondant au volume équivalent a été déposé, soit 28,6 μ g. Le gel a été coloré au Pro-Q Diamond pour visualiser les phosphoprotéines.

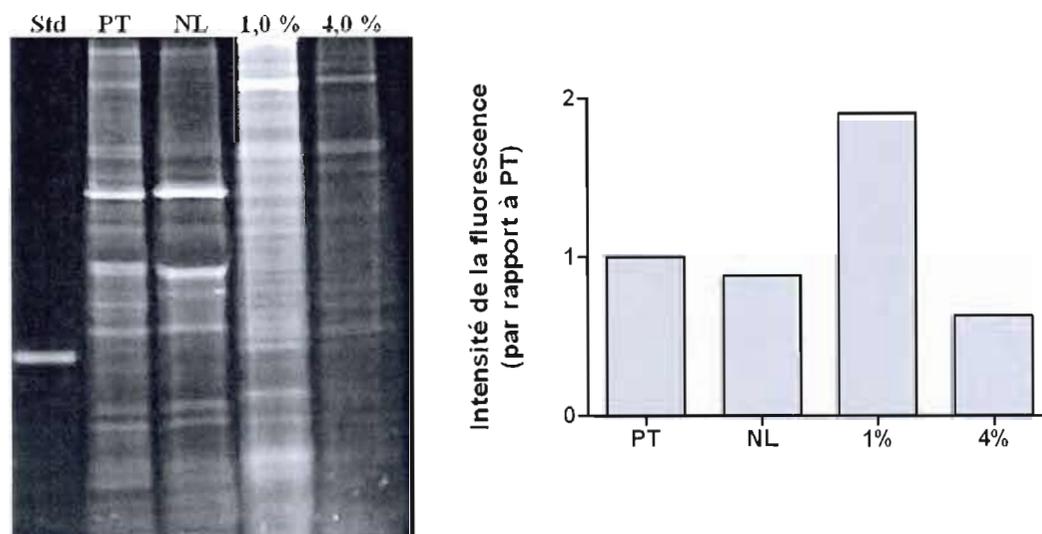


Figure 3.4 Efficacité relative d'éluion des phosphoprotéines avec un tampon contenant 1% et 4% SDS. Rendement en phosphoprotéines des fractions dont l'éluion est effectuée avec un tampon composé de 120 mM tris/HCl pH 6.8 contenant 1% et 4% SDS. Les protéines récoltées (10 μ g) ont été précipitées préalablement avec l'acétone pour toutes les fractions ; protéines totales avant fractionnement (PT), protéines non liées à la matrice (NL) et phosphoprotéines éluées avec 1% et 4% SDS avant leur dépôt sur gel. Le gel a été coloré au Pro-Q Diamond. L'intensité de la coloration de chaque puit a été analysée par densitométrie.

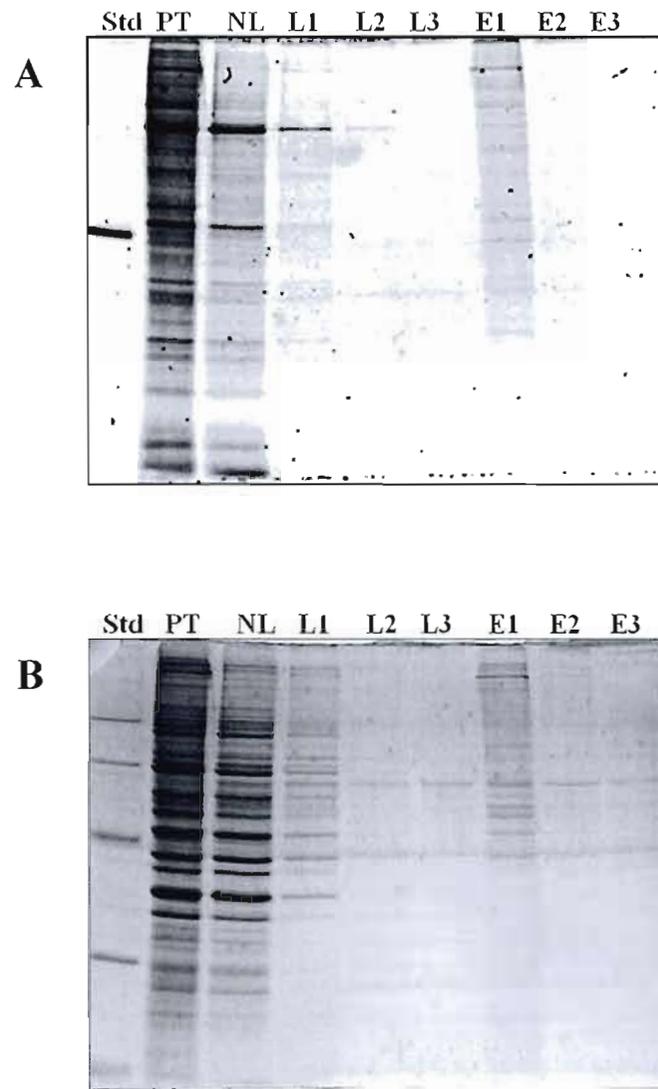


Figure 3.5 Fractionnement des phosphoprotéines provenant d'un surnageant post-nucléaire de cellules U-87. Les protéines ont été fractionnées selon le protocole décrit dans la section du matériel et méthodes. Des volumes équivalents ont été analysés par SDS-PAGE pour les protéines totales (PT), celles non-liées à la matrice (NL), les lavages (L) et les éluats (E). Le gel a été coloré au Pro-Q Diamond pour visualiser les protéines phosphorylées (**A**) puis avec le bleu de Coomassie colloïdal pour détecter les protéines (**B**).

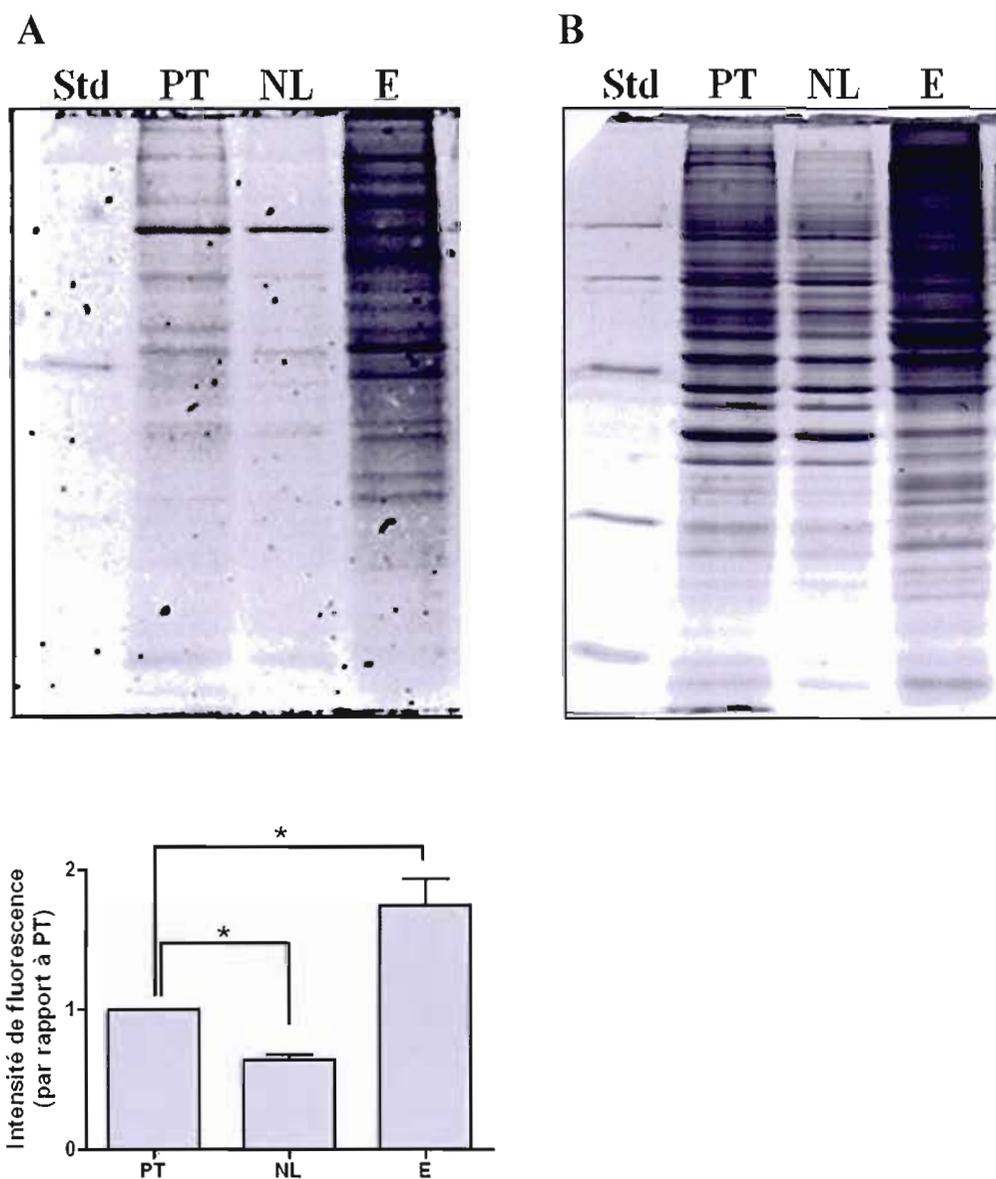


Figure 3.6 Enrichissement des phosphoprotéines provenant d'un surnageant post-nucléaire des cellules U-87. Des quantités égales de protéines (25 μ g) ont été analysées par SDS-PAGE pour les protéines totales (PT), celles non liées à la matrice (NL) et présentes dans l'éluat (E). Le gel a été coloré au Pro-Q Diamond pour visualiser les phosphoprotéines (A) puis avec le bleu de Coomassie colloïdal pour détecter toutes les protéines (B). L'histogramme est représentatif de l'analyse densitométrique de six expériences individuelles et l'astérisque (*) identifie les valeurs de $p < 0,05$, pour le « *Student Test* », qui sont des valeurs considérées significativement différentes par rapport à PT.

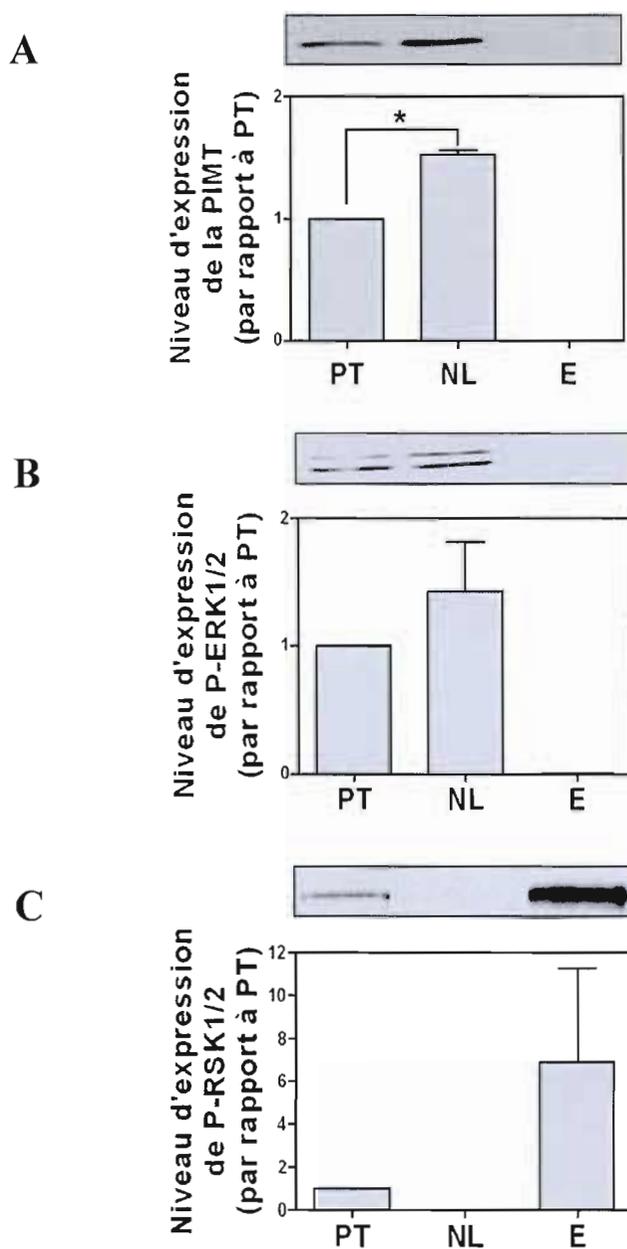


Figure 3.7 Affinité de certaines protéines pour la matrice de trioxyde d'aluminium, la PIMT, phospho-ERK1/2 et phospho-RSK1/2. Les cellules U-87 ont été cultivées jusqu'à une confluence de 80% et ont été lysées. Les lysats ont été enrichi en phosphoprotéines par la méthode de trioxyde d'aluminium puis celles-ci ont été déposées sur un gel SDS-PAGE (25 µg / puit). Elles ont ensuite été soumises à un immunobuvardage de type Western. La PIMT a été immunodétectée (A), ainsi que phospho-ERK1/2 (Thr202 et Tyr204) et ((Thr185 et tyr187) (B) et phospho-RSK1/2 (Ser221 et Ser227) (C). L'analyse densitométrique est représentative de trois expériences individuelles et l'astérisque (*) identifie les valeurs de $p < 0,05$, pour le « *Student Test* », qui sont des valeurs considérées significativement différentes par rapport au contrôle.

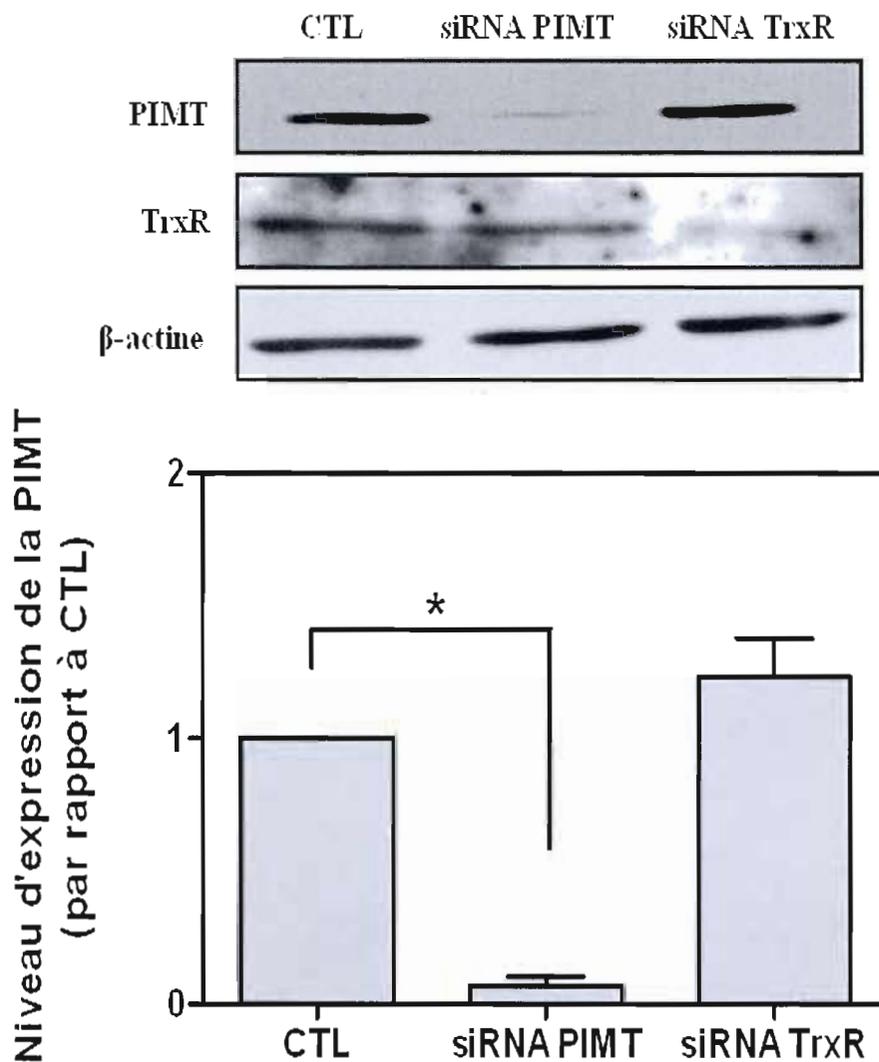


Figure 3.8 Inhibition de l'expression de la PIMT par siRNA. Les cellules U-87 ont été traitées en présence d'un siRNA contre la PIMT à 100 nM et d'un siRNA contre la thiorédoxine réductase (TrxR) à 100 nM durant 42 heures. Les cellules utilisées comme contrôle ont été mises en présence de lipofectamine durant 42 heures. Le siRNA contre la TrxR est utilisé comme siRNA non-spécifique. Suite aux traitements, les cellules ont été lysées. Les protéines ont été déposées sur un gel SDS-PAGE (25 μ g / puits) et ont été soumises à un immunobuvardage de type Western. La PIMT a été immunodétectée, ainsi que la thiorédoxine réductase et la β -actine. L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences individuelles et l'astérisque (*) identifie les valeurs de $p < 0,05$, pour le « *Student Test* », qui sont des valeurs considérées significativement différentes par rapport au contrôle.

A

Types de protéines	Nombres	Exemples de protéines	Rapports des signaux
Protéines phosphorylées induites	22	Tyrosine Hydroxylase	10
Protéines phosphorylées inhibées	22	GSK3a/b	4
Protéines totales induites	25	p38a MAPK	5
Protéines totales inhibées	36	14-3-3 z	6

B

Rapports des signaux des cellules traitées
sur ceux des cellules contrôles

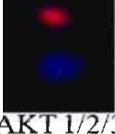
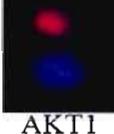
<u>Totales</u>	<u>Phosphorylées</u>	<u>Totales</u>	<u>Phosphorylées</u>
		0,81	0,82
ERK 1/2			
		1,93	3,66
RSK 1 RSK 1/2			
		0,96	0,49
AKT 1/2/3 AKT1			

Figure 3.9 Analyse protéomique par micro-puces d'anticorps des surnageants post-nucléaires de cellules U-87 traitées avec un siRNA contre la PIMT. Les cellules U-87 ont été traitées avec 100 nM d'un siRNA dirigé contre la PIMT ou maintenues en présence de lipofectamine durant 42 heures. Les cellules ont été récoltées puis expédiées à la compagnie Kinexus pour analyse par micro-puces d'anticorps. (A) Tableau présentant le nombre et quelques exemples de protéines phosphorylées ou non ayant un signal qui lors de l'analyse par micro-puces d'anticorps des cellules U-87 traitées avec le siRNA sur les cellules contrôles incubées avec la lipofectamine ont montré un signal supérieur ou inférieur à 2. (B) Exemples de protéines phosphorylées identifiées par Kinexus pour être modulées à la suite de l'inhibition de la PIMT par siRNA. Le rapport des signaux est l'intensité du signal dans les cellules traitées avec le siRNA (rouge) versus l'intensité de signal observé dans les cellules contrôles (bleu).

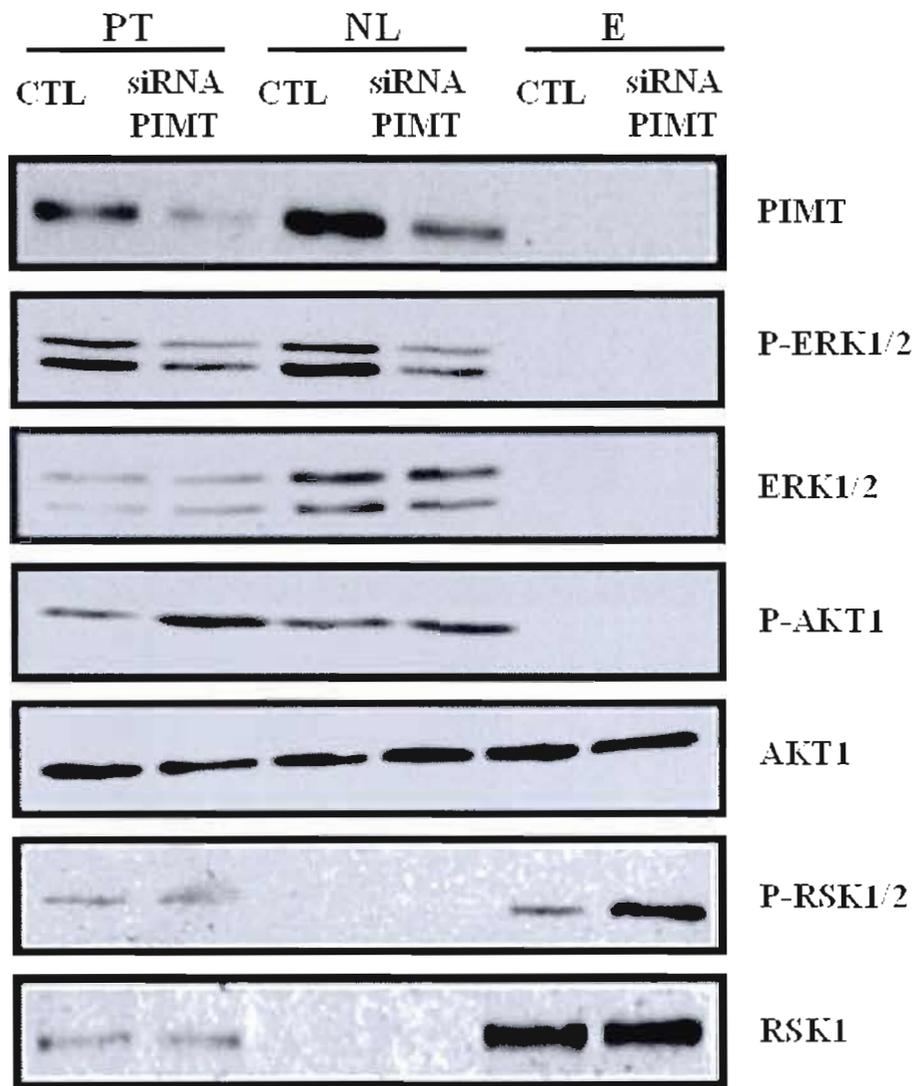


Figure 3.10 Effet de l'inhibition de la PIMT par siRNA sur l'expression et la phosphorylation de ERK1/2, Akt1 et RSK1 fractionnées par chromatographie d'affinité sur la matrice de trioxyde d'aluminium. Suite aux traitements des cellules U-87 contrôles avec la lipofectamine et des autres cellules avec le siRNA contre la PIMT durant 42 heures, les cellules ont été lysées. La chromatographie d'affinité a été ensuite effectuée sur les surnageants post-nucléaires. Par la suite, des protéines des principales fractions chromatographiques ont été déposées sur un gel SDS-PAGE et les protéines ont été soumises à un immunobuvardage de type Western. La PIMT, p-ERK1/2 (Thr202 et Tyr204) et (Thr185 et Tyr187), ERK1/2, P-Akt1 (Thr308), Akt1, P-RSK1/2 (Ser221 et Ser227), RSK1 ont été immunodétectées.

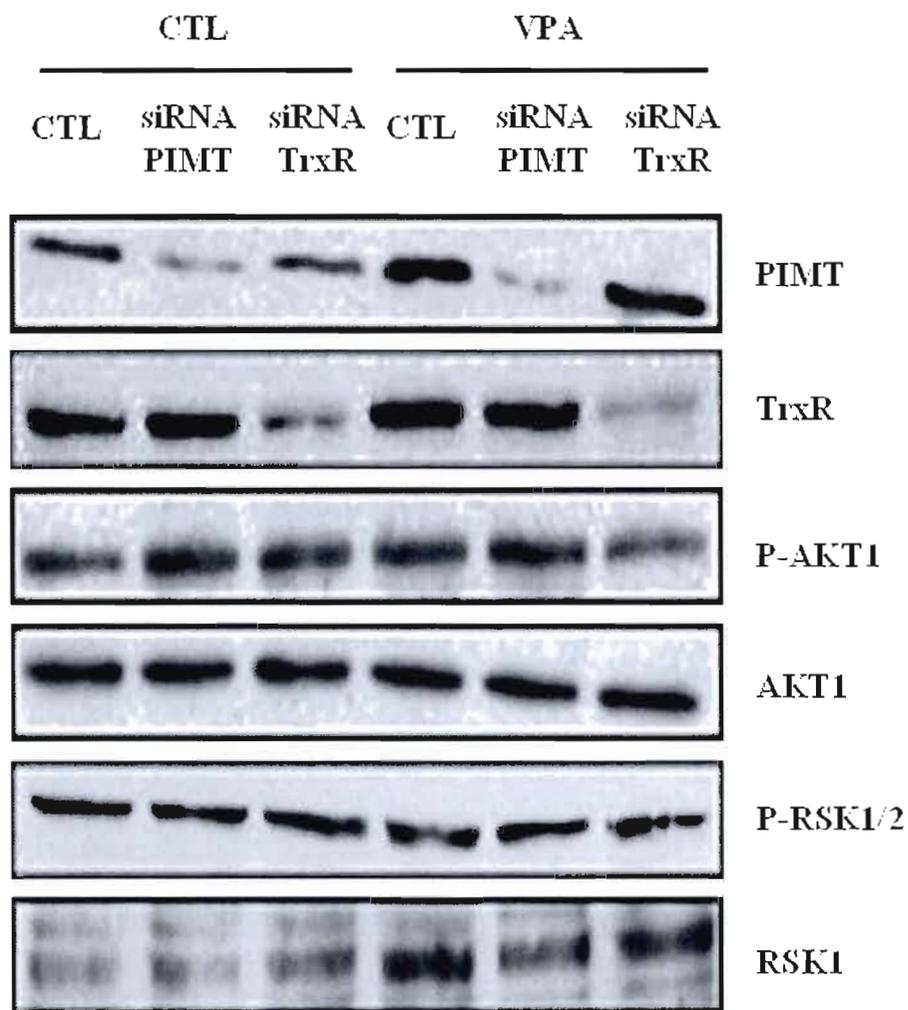


Figure 3.11 Effet de l'acide valproïque lors de l'inhibition de la PIMT par siRNA sur l'expression et la phosphorylation de RSK1 et Akt1. Suite au traitement des cellules U-87 contrôles avec la lipofectamine et des autres cellules avec les siRNA contre la PIMT et contre la TrxR pendant 42 heures, les cellules ont été incubées ou non avec 5 mM d'acide valproïque durant 24 h. Ensuite, les cellules ont été lysées puis les protéines ont été déposées sur un gel SDS-PAGE (25 µg / puit) et ont été soumises à un immunobuvardage de type Western. La PIMT, TrxR, P-Akt1 (Thr308), Akt1, P-RSK1/2 (Ser221 et Ser227), RSK1 ont été immunodétectées.

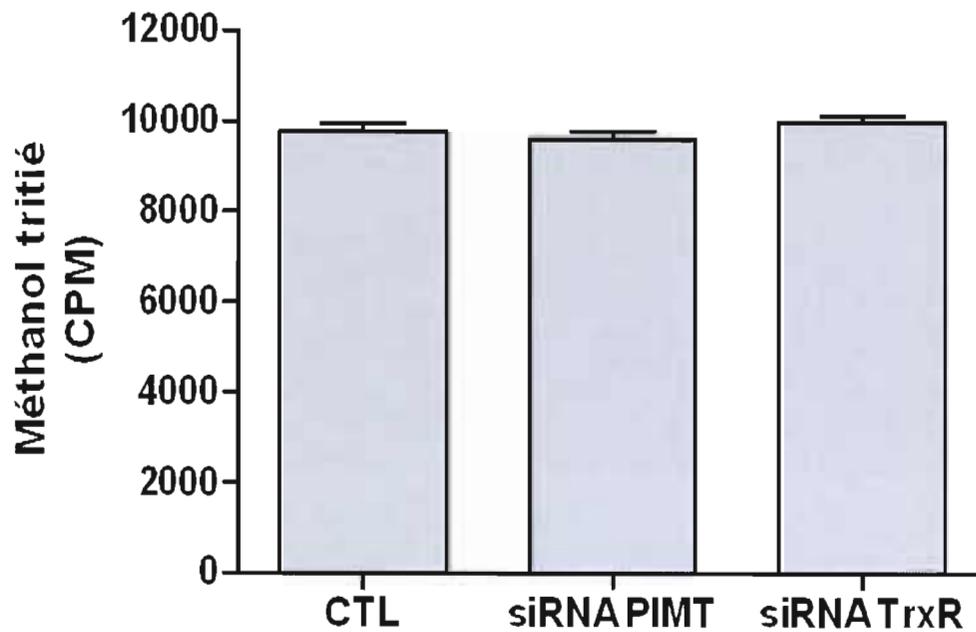


Figure 3.12 Quantification des substrats de la PIMT au sein des surnageants post-nucléaires issus des cellules U-87 traitées avec des siRNAs contre la PIMT et TrxR. Suite aux traitements avec le siRNA contre la PIMT et avec le siRNA contre la TrxR pendant 42 heures. Alors que les cellules contrôles étaient gardées en présence de lipofectamine, les cellules traitées ont été lysées et 35 μ g de protéines a servi aux essais de méthylation. Le traitement avec le siRNA contre TrxR sert à montrer la spécificité d'action du siRNA contre la PIMT. Les histogrammes sont représentatifs de trois expériences individuelles.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La PIMT est une enzyme qui répare les résidus aspartates anormaux. Plusieurs travaux de recherche ont permis d'élucider le mécanisme de réparation de cette enzyme importante pour tous les organismes vivants. Bien des études ont également été réalisées dans le but d'identifier le ou les rôle(s) physiologique(s) de la PIMT. Celles-ci ont permis de mettre en évidence que la PIMT se retrouve exprimée dans tous les organes, mais particulièrement au niveau du cerveau. Étant donné que son niveau d'expression varie dans l'épilepsie et dans les tumeurs astrocytaires et d'autres maladies neurologiques, l'examen de l'impact de son expression sur les voies de signalisation est incontournable. L'ensemble du présent travail de recherche a donc été consacré à l'analyse phosphoprotéomique sous le contrôle de la PIMT dans les glioblastomes humains de grade IV de la lignée U-87.

L'identification des protéines phosphorylées et la caractérisation de leurs sites de phosphorylation est cruciale pour comprendre divers événements de signalisation lié au phosphoprotéome. (Kalume, Molina et Pandey, 2003; Schmidt, Schweikart et Andersson, 2007). La première partie de ce travail de recherche a donc été de mettre au point une méthode d'enrichissement des phosphoprotéines à partir du surnageant post-nucléaire des cellules U-87. En se basant sur la méthode de Wolschin et ses collaborateurs (2005) ainsi que celle de Dubrovskaya et Souchelnytskyi (2005), une chromatographie d'affinité de type MOAC à partir d'une matrice composée de trioxyde d'aluminium ($Al(OH)_3$) a été mise au point. Bien des étapes d'optimisation ont dû être effectuées avant d'utiliser cette méthode afin d'enrichir le phosphoprotéome (Figures 3.1 à 3.4). Étant donné que le protocole décrit dans l'article traitant de la méthode de Wolschin n'est pas très détaillé, celui-ci a plutôt servi de base pour l'élaboration d'un nouveau protocole. Seule la composition du tampon d'incubation, ainsi que le volume du tampon d'élution ont été conservés du protocole de Wolschin. De plus, seule la composition en SDS du tampon d'élution et l'étape de chauffage de la fraction d'élution fût gardée du protocole Dubrovskaya et Souchelnytskyi. Ainsi, bien des paramètres ont dû être ajustés afin d'améliorer la migration des protéines sur gel SDS-PAGE et afin d'obtenir un rendement en phosphoprotéines acceptable. Les sels tels que l'aspartate de potassium et le glutamate de sodium nuisant à la migration sur gel SDS-PAGE, ont dû être éliminés du tampon de lyse afin d'améliorer la migration des protéines de la fraction des protéines totales. Afin d'améliorer la migration des protéines

de la fraction des protéines non-liées, l'aspartate de potassium et le glutamate de sodium ont été éliminés par un lavage avec de l'eau à l'aide de la colonne Centriprep. En ce qui concerne la présence de ces sels dans la fraction d'élution, ceux-ci ont été retirés en rajoutant deux étapes de lavage avec un tampon de 10 mM de Tris pH 6.8 avant d'effectuer l'élution. D'autre part, la quantité de matrice de trioxyde d'aluminium associée à la quantité de protéines du surnageant post-nucléaire ainsi que la composition du tampon d'élution ont été optimisés afin d'augmenter le rendement en phosphoprotéines.

Question de concentrer les protéines de la fraction d'élution tout en maintenant une bonne migration sur gel SDS-PAGE, et tout en rendant possible le dosage des protéines, plusieurs méthodes de précipitation des protéines ont été testées. La précipitation au chloroforme/méthanol a été tentée. Celle-ci était délicate dû au prélèvement des protéines entre la phase organique et la phase inorganique et dû au fait qu'avec la composition du tampon d'élution, cette partie était non visible. De plus, celle-ci entraînait la perte de protéines. Par la suite, l'essai de la précipitation à l'acétone a été effectué. Ce type de précipitation fût optimal. En raison de la présence de la forte concentration de SDS dans le culot formé par les protéines de la fraction d'élution, les interférences avec les agents de la méthode de BCA ne permirent pas le dosage des protéines. En conséquence, plusieurs méthodes permettant le dosage des protéines en présence de SDS ont donc été testées, telles que le « ReadyPrep 2-D Cleanup Kit » de la compagnie Bio Rad jumellé à la méthode du BCA, la solution « CB-XTM Protein Assay » de la compagnie Biolynx et le « RCDC » de la compagnie Bio-Rad. La méthode de RCDC s'est avérée être la meilleure, mais celle-ci entraînait des pertes de protéines en raison des étapes de précipitation qu'elle comportait. Vu la fiabilité de la méthode BCA, et vu que celle-ci donne la possibilité de doser les protéines dans une solution contenant moins de 2% de SDS, la composition du tampon d'élution a été changé pour une concentration de 1% de SDS (Figure 3.4).

Cette méthode améliorée d'enrichissement des phosphoprotéines permet un enrichissement de des phosphoprotéines dans la fraction d'élution de deux fois comparativement à la fraction des protéines totales. Pour plusieurs phosphoprotéines, l'enrichissement est plus important dans la fraction d'élution (Figure 3.6A). Effectivement, phospho-RSK1/2, qui possède huit sites de phosphorylation est enrichie de plus de six fois dans la fraction d'élution, comparativement à la fraction des protéines totales (Figure 3.7). Phospho-ERK1 avec deux sites de phosphorylation et phospho-ERK2 avec trois sites de phosphorylation ne sont pas enrichis dans la fraction d'élution (Figure 3.7 et 3.10). Ces résultats s'expliquent par le haut niveau de phosphorylation de RSK1 facilitant sa liaison avec la matrice de trioxyde d'aluminium. Cependant, Akt phosphorylée sur T308 ne se retrouve pas enrichie

dans la fraction d'élution. À l'opposée, la protéine Akt1 connue pour être potentiellement phosphorylée sur 11 sites est enrichie dans la fraction d'élution (figure 3.10). L'explication la plus simple de cette divergence dans le comportement de phospho-Akt1 (Thr308) et Akt1 est que cette kinase est composée d'une population mixte de formes plus ou moins phosphorylées étant donné ces onze sites de phosphorylation. De plus, lorsque Akt1 est phosphorylée sur Thr308, elle se retrouve exclusivement dans la fraction des protéines non-liées à la matrice dû à un changement de conformation et un état de phosphorylation moindre diminuant son affinité pour la matrice de trioxyde d'aluminium. Dans le même ordre d'idées, ceci expliquerait pourquoi ERK phosphorylée est légèrement enrichie dans la fraction des protéines non-liées à la matrice.

Wolschin et son équipe ont utilisé le trioxyde d'aluminium comme matrice pour la chromatographie d'affinité de type MOAC, puisque celle-ci offre une haute sélectivité à un coût très bas. Le choix de cette méthode pour le présent travail de recherche a également opté pour cette méthode dû à ces avantages. En comparant les rendements de la méthode de Wolschin avec la présente méthode, toutes les deux démontrent que le trioxyde d'aluminium a une forte affinité pour les phosphoprotéines et également une affinité pour certaines protéines non-phosphorylées. Effectivement, pour la méthode actuelle et la méthode de Wolschin, la coloration des protéines totales au bleu de Coomassie contenues dans la fraction d'élution démontre un profil protéique différent de celui correspondant aux phosphoprotéines (Figure 3.6A et 3.6B). Par contre, la méthode de Wolschin permet d'enrichir les protéines faiblement phosphorylées, mais ne permet pas d'éluer les protéines hyperphosphorylées. Effectivement, l'ovalbumine, dont le poids moléculaire est de 45 kDa et comportant deux sites de phosphorylation, est enrichie de plus de 80% dans la fraction d'élution et l'alpha-caséine, dont le poids moléculaire est de 25 kDa et comportant huit sites de phosphorylation, n'est pas enrichie dans la fraction d'élution. Cette différence réside probablement dans le fait que le pH du tampon d'élution n'est pas le même. En effet, le pH du tampon d'élution de la méthode de Wolschin est de 6.0 comparativement à la méthode actuelle qui utilise un pH de 6.8. Il serait donc intéressant de tenter d'éluer les phosphoprotéines avec un tampon d'élution d'un pH plus acide. D'autre part, l'avantage de la méthode mise au point dans le présent travail de recherche, comparativement à la méthode de Wolschin, permet de faire des gels d'électrophorèse en deux dimensions dû à la composition du tampon d'élution compatible avec le protocole.

L'analyse du phosphoprotéome sous le contrôle de la PIMT lors de son inhibition par siRNA, à tout d'abord permis de découvrir que ceci conduit à la phosphorylation d'ERK1/2 (Figure 3.10). De plus, l'analyse du phosphoprotéome sous le contrôle de la PIMT, a permis de démontrer que

l'inhibition de la PIMT stimule la phosphorylation d'Akt1 (Figure 3.10 et 3.11). Ce résultat confirme celui d'une étude réalisée par Farrar et ces collaborateurs (2003) dans le cerveau de souris déficientes en PIMT. En effet, ils ont démontré une activation de l'axe de signalisation PI3K, Akt et GSK-3 β passant par le récepteur IGF-I.

L'acide valproïque est un médicament utilisé pour traiter l'épilepsie et les troubles bipolaires. Celui-ci stimule la phosphorylation de ERK1/2 sur la tyrosine 204 et la thréonine 202 (Michaelis *et al.*, 2006), la phosphorylation de RSK1 via un site de phosphorylation inconnu (Einat *et al.*, 2003), la phosphorylation d'Akt1 sur la sérine 473 et la phosphorylation de GSK3 β sur la sérine 9 (De Sarno, Li et Jope, 2002). L'acide valproïque stimule également l'expression de RSK1 (Einat *et al.*, 2003). Puisque la PIMT est impliquée dans l'épilepsie, (Yamamoto *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2002) et que son expression est diminuée de 50% dans cette neuropathologie chez l'humain (Lanthier *et al.*, 2002), l'effet d'un traitement avec l'acide valproïque sur l'expression et la phosphorylation de Akt1 et RSK1 lors de l'inhibition de la PIMT par siRNA a été analysée. Tout d'abord, le traitement avec l'acide valproïque chez les cellules contrôles démontre une augmentation de l'expression de la PIMT et de RSK1 et une augmentation de la phosphorylation de RSK1/2 et d'Akt1 (Figure 3.11). L'augmentation de l'expression de RSK1 et de la PIMT confirme les résultats obtenus dans les études antérieures (Einat *et al.*, 2003; Lamarre et Desrosiers, 2008). L'activation de Akt1 via la thréonine 308 et de RSK1/2 via la sérine 221 et la sérine 227 est une découverte.

Chez les souris déficientes en PIMT, l'axe de signalisation PI3K/Akt est activé (Farrar, Houser et Clarke, 2003). Notre travail de recherche confirme que l'inhibition de la PIMT et l'acide valproïque active indépendamment Akt1 via la thréonine 308. L'axe PI3K/Akt est impliqué dans la survie cellulaire (Foster *et al.*, 2008) et l'expression de la protéine pro-apoptotique Bad est régulée par l'acide valproïque (Laeng *et al.*, 2004). De plus, Akt favorise la survie cellulaire par l'inactivation de Bad via sa phosphorylation sur la sérine 136 (Datta *et al.*, 1997). Compte rendu de ce qui précède, il est possible que la PIMT est un régulateur de la voie PI3K/Akt1/Bad et que l'acide valproïque stimule cette voie. Si la PIMT contrôle cette voie, sa déficience pourrait avoir un rôle positif sur la survie cellulaire.

Étant donné que l'axe de signalisation PI3K/Akt est activé lors de l'inhibition de la PIMT et que PDK1 est responsable de l'activation de Akt1 via la thréonine 308, il a donc de forte chance que l'inhibition de la PIMT active PDK1. Cette hypothèse devra être vérifiée expérimentalement. Si tel est le cas, il serait intéressant de vérifier l'effet de l'acide valproïque sur cette protéine kinase.

Un résultat intéressant a été observé au cours de ce travail de recherche; l'inhibition de la TrxR par siRNA chez les cellules U-87 conjointement au traitement avec l'acide valproïque inhibe l'activation d'Akt1 telle que mesuré sur la thréonine 308 après 24 heures de traitement. À l'inverse, le traitement des cellules avec l'acide valproïque seul augmente la phosphorylation d'Akt1. La TrxR est une flavoprotéine qui catalyse la réduction NADPH-dépendante de la thiorédoxine. Elle est impliquée dans le stress oxydatif (Mustachich et Powis, 2000). À ce point, le mécanisme moléculaire responsable de la chute d'activité d'Akt1 lors de par l'inhibition TrxR en présence d'acide valproïque reste à élucider.

Lors de ce travail de recherche, la technologie de micro-puces d'anticorps a été utilisé afin d'analyser le phosphoprotéome sous le contrôle de la PIMT. Plus de 105 protéines ont été identifiées pour être contrôlées par l'expression de la PIMT. Effectivement, 47 protéines ont été identifiées pour être exprimées ou phosphorylées plus de deux fois lors de l'inhibition de la PIMT et 58 protéines ont été identifiées pour être exprimées ou phosphorylées moins de deux fois dans cette même condition expérimentale (Figure 3.8A). Ces protéines sont impliquées dans différentes fonctions cellulaires. Par exemple, la tyrosine hydroxylase, une enzyme responsable de catalyser la conversion de l'acide aminé L-tyrosine en dihydroxyphenylalanine (DOPA), un précurseur de la dopamine a été identifié (Masserano et Weiner, 1983). GSK3, une protéine kinase ayant deux isoformes, α et β , et est impliquée dans la régulation de la voie de signalisation de β -caténine, dans l'initiation de la transcription, dans la synthèse du glycogène, dans la promotion de l'apoptose passant par Bax et dans le cycle cellulaire a également été identifié (Nabais *et al*, 2002). De plus, la protéine p38a, une isoforme de p38 impliquée dans la voie des MAPK et participant à la cascade de signalisation en réponse aux cytokines et au stress est aussi régulée par une diminution de la PIMT (Rouse *et al*, 1994) tout comme, la protéine 14-3-3 z, une isoforme de la protéine 14-3-3 jouant un rôle clé dans la régulation de la transduction des signaux intracellulaires, dans l'apoptose et dans le métabolisme (Muslin et Xing, 2000). Ces exemples témoignent que l'inhibition de la PIMT a un impact sur plusieurs aspects cellulaires importants.

Le niveau d'expression de certaines protéines identifiées par cette technologie des micro-puces d'anticorps (Figure 3.9B) lorsque vérifié par immunobuvardage, ne démontrent pas le même résultat. Effectivement, la technologie de micro-puces d'anticorps montre que l'expression de RSK1 est stimulée de presque deux fois, ce qui n'est pas le cas (Figure 3.10 et figure 3.11). De plus l'activation de ERK1/2 via la tyrosine 204 et la thréonine 202 est diminuée d'environ de 18%, ce qui est plutôt de 50% (Figure 3.10). En ce qui concerne l'expression de ERK1/2, elle est diminuée d'environ 19%, ce qui est plutôt imperceptible (Figure 3.10). Également, l'activation de phospho-Akt1

via la thréonine 308 est diminuée d'environ 50%, mais que le résultat obtenu en immunobuvardage démontre plutôt une activation de 2 fois. Ce qui explique ces résultats contradictoires, c'est que cette technologie de micro-puces d'anticorps présente des résultats faussement positifs et des résultats faussement négatifs. L'anticorps fixé sur un support reconnaît la protéine et celle-ci émet un signal fluorescent puisqu'elle est combinée avec une molécule fluorescente. La formation de complexes entre les protéines avant d'être reconnues par les anticorps et des liaisons non-spécifiques entre les anticorps et les protéines, augmente le signal fluorescent. Cela correspond à un faux positif. De plus, une complexation entre des protéines, avant la liaison avec l'anticorps, au niveau de l'épitope, empêche la liaison de la protéine avec son anticorps, et diminue ainsi la fluorescence donnant un faux négatif. Donc, les résultats obtenus par micro-puces d'anticorps doivent obligatoirement être validés par une autre approche expérimentale telle que le Western blot. Ainsi, un résultat issu de cette technique et vérifié par immunobuvardage s'est avéré véritable. En effet, cette technique démontre une activation de RSK1/2 via la sérine 221 et la sérine 227 de presque quatre fois et par immunobuvardage, ce résultat est sensiblement le même.

Étant donné que différentes protéines peuvent accumuler des résidus aspartates au cours du vieillissement et que cette accumulation peut nuire au fonctionnement des protéines et ainsi avoir un effet sur les voies de signalisation, une vérification de l'accumulation des substrats au sein des glioblastomes déficients en PIMT a été réalisée. Celle-ci fût possible par la mesure de méthanol radioactif produit suite à un essai de méthylation en présence de la PIMT recombinante dans les cellules U-87 dont la PIMT est inhibée par siRNA et dans les cellules U-87 normales. Cette expérience a permis de démontrer qu'il y a aucune accumulation significative de substrats (Figure 3.12). Il est possible que le temps de traitement du siRNA de la PIMT de 42 heures, ne soit pas assez long pour causer une accumulation de substrats. Il serait intéressant de vérifier l'effet d'un traitement plus long d'inhibition de la PIMT sur l'accumulation de substrats. Il serait également judicieux de mesurer l'inhibition de la PIMT par RT-PCR. Pour l'étude actuelle, les répercussions sur la phosphorylation de kinases connues ERK1/2, AktI et RSK1 lors de l'inhibition de la PIMT ne sont pas dues à une accumulation de substrats. Par ailleurs, les études sur l'accumulation des substrats de la PIMT au sein des neurones et du cerveau des souris déficientes de cette enzyme réalisées par l'équipe Zhu (2006a) et l'équipe Vignewara (2006), ont permis d'identifier les substrats majeurs de la PIMT. Ces substrats touchent à plusieurs types de fonctions cellulaires et ainsi porte à croire que la diminution de l'expression de la PIMT pourrait affecter ces fonctions cellulaires telles que la stabilisation et la constitution des microtubules, le processus d'endocytose et de sécrétion, la

croissance du corps axonal, l'entreposage du calcium intracellulaire, la transmission synaptique, le contrôle de l'activation de la voie des MAPK par Raf-1 et la dé-ubiquitination des protéines.

Les résultats obtenus au cours de ce travail de recherche démontrent donc que l'expression normale de la PIMT stimule la phosphorylation de ERK1/2, mais inhibe la phosphorylation de Akt1 et de RSK1/2 car l'inhibition de la PIMT par siRNA provoque les effets inverses. En lien avec les études antérieures (Farrar, Houser et Clarke, 2003; Kosugi *et al.*, 2008), il semble que la PIMT contrôle la voie des MAPK passant par Raf-1 / MEK / ERK et contrôle la voie de PI3K / PDK1/2 / Akt1 / GSK3. De plus, nos résultats démontrent que l'inhibition de la PIMT conjointement à un traitement avec l'acide valproïque peut affecter aussi ces voies de signalisation. Plusieurs hypothèses émises dans ce travail de recherche restent à être vérifiées. Comme par exemple, vérifier s'il y a phosphorylation de Bad sur les sérines 75 et 136 (Tan *et al.*, 1999) lors de l'inhibition de la PIMT, afin de vérifier si l'expression de la PIMT contrôle la survie cellulaire par la voie PI3K/Akt/Bad. Si tel est le cas, il serait intéressant de vérifier l'effet de l'acide valproïque sur cette voie. De plus, il serait intéressant de vérifier si la protéine PDK1 est activée lors de l'inhibition de la PIMT. En perspectives, il serait intéressant de surexprimer la PIMT afin de confirmer si ces cascades de signalisation intracellulaires sont contrôlées par la PIMT. Ainsi, il resterait à élucider le mécanisme d'action de la PIMT sur ces voies de signalisation. Notamment si cela est dû à une diminution de l'activité de la PIMT et non dû à l'accumulation de substrats. De plus, il serait intéressant de vérifier l'effet de l'acide valproïque sur l'activation de ces voies de signalisation intracellulaires, si celles-ci s'avèrent être contrôlées par l'expression de la PIMT. Cela pourrait servir de pistes pour des cibles pharmacologiques dans le traitement de l'épilepsie et des tumeurs astrocytaires. Cependant, comme la PIMT est une protéine importante pour les cellules, que celle-ci par son mécanisme de réparation touche à diverses fonctions cellulaires, et que la variation de son niveau d'expression est associée à certaines neuropathologies, il serait intéressant de poursuivre l'élucidation des voies de signalisation sous le contrôle de la PIMT. Ainsi, en utilisant la méthode de chromatographie d'affinité pour l'enrichissement des phosphoprotéines mise au point au cours de ce travail de recherche, l'analyse du phosphoprotéome sous le contrôle de l'inhibition de la PIMT et sous le contrôle de la surexpression de la PIMT pourrait être effectuée par l'électrophorèse en deux dimensions conjointement à une analyse utilisant la technologie de la spectrométrie de masse. Cela permettrait d'identifier d'autres voies de signalisation gouvernées par l'expression de la PIMT et qui sait peut-être de faire des nouveaux liens entre la PIMT et l'épilepsie ainsi que la PIMT et les tumeurs astrocytaires,

CONCLUSION

La protéine L-isoaspartyl méthyltransférase ou PIMT est une enzyme qui répare les protéines endommagées ayant accumulées des résidus aspartates anormaux en catalysant le transfert d'un groupement méthyle de la molécule S-adénosylméthionine au groupement α -carboxyle du résidu isoaspartate anormal. Au cours du vieillissement ces dommages protéiques surviennent progressivement et ainsi la PIMT est fortement exprimée. Cette enzyme méthyltransférase réparatrice est importante pour toutes les cellules, particulièrement pour celles du cerveau. Plusieurs études ont démontrée son implication dans des neuropathologies telles que les tumeurs astrocytaires et l'épilepsie. Comme l'expression de la PIMT semble avoir des répercussions sur les fonctions des cellules, il devient crucial de connaître les voies de signalisation sous le contrôle de son expression. Notre travail de recherche a donc permis d'analyser des aspects du phosphoprotéome associé à l'expression de la PIMT en employant une méthode d'enrichissement des phosphoprotéines telle qu'une chromatographie d'affinité dont la matrice est composée de trioxyde d'aluminium. Dans un premier temps, cette méthode a été mise au point et validée. Par la suite, il a été démontré que cette méthode enrichie les protéines hyperphosphorylées. L'emploi de cette méthode a ensuite servi à comparer des phosphoprotéines sous le contrôle de la PIMT. L'inhibition de la PIMT a été réalisée par l'utilisation de la technologie du siRNA. Nos travaux ont permis de démontrer par une analyse phosphoprotéomique que l'inhibition de la PIMT inhibe la phosphorylation de ERK1/2, stimule la phosphorylation de Akt1 et de RSK1/2. Ainsi la PIMT semble avoir un contrôle sur la voie de signalisation des MAPK-ERK et les voies de signalisation sous le contrôle d'Akt1 et que ce contrôle n'est pas dû à une accumulation de protéines endommagées. Il reste encore beaucoup de travail afin de caractériser ce contrôle de la PIMT sur la voie de MAPK-ERK et sur les voies impliquant Akt1. L'analyse phosphoprotéomique sous le contrôle de l'expression de la PIMT en est à ses débuts, mais ce travail de recherche aura permis de démontrer que l'expression de la PIMT a une influence sur certaines voies de signalisation. Finalement, ce travail de recherche ouvre la porte à l'exploration du lien entre la thirédoxine réductase, l'acide valproïque et Akt1.

BIBLIOGRAPHIE

- Agrawal, G.K. et J.J. Thelen. 2005. « Development of a simplified, economical polyacrylamide gel staining protocol for phosphoproteins » *Proteomics*, vol. 5(18), p.4684-4688.
- Agrimi, G., M.A. Di Noia, C.M. Marobbio, G. Fiermonte, F.M. Lasorsa et F. Palmieri. 2004. « Identification of the human mitochondrial S-adenosylmethionine transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization and tissue distribution » *Biochem. J.*, vol. 379(Pt 1), p. 183-190.
- Ahn, S., S. Maudsley, L.M. Luttrell, R.J. Lefkowitz et Y. Daaka. 1999. « Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signalling » *J. Biol. Chem.*, vol. 274(3), p. 1185-1188.
- Alessi, D.R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, B.A. Hemmings. 1996. « Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1 » *EMBO J.*, vol. 15(23), p.6541-6551.
- Aswad, D.W. 1984. « Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by protein carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine25. Evidence for methylation at the α -carboxyl group of atypical L-isoaspartyl residues » *J. Biol. Chem.*, vol.259, p.10714-10721.
- Aswad, D.W. et B.A. Johnson. 1984. « The unusual substrate specificity of eukaryotic protein carboxyl methyltransferases » *Trends Biochem. Sci.*, vol.12, p.155-158.
- Aswad, D.W. (éd) 1995. « Deamination and isoaspartate formation in peptides and proteins » Chap. In *Purification and properties of protein L-isoaspartyl methyltransferase*, p.31-46. Boca raton (FL): CRC Press.
- Axelrod, J. Et J. Daly. 1965. « Pituitary gland enzymic formation of methanol from S-adenosylmethionine » *Science*, vol. 150, p.892-893.
- Barber, J.R. et S. Clarke. 1984. « Inhibition of protein carboxyl methylation by S-adenosyl-L-homocysteine in intact erythrocytes. Physiological consequences. » *J. Biol. Chem.*, vol. 259(11), p. 7115-7122.
- Berling, B., H. Wille, B. Röhl, EM Mandelkow, C. Garner et E. Mandelkow. 1994. « Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2a,b and MAP2c at Ser136 by proline-directed kinases in vivo and in vitro » *Eur. J. Cell. Biol.*, vol. 64(1), p. 120-130.
- Boivin, D., D. Gingras et R. Béliveau. 1993. « Purification and characterization of a membrane-bound protein carboxyl methyltransferase from rat kidney cortex » *J. Biol. Chem.*, vol. 268(4), p.2610-2615.

- Boivin, D., D. Bilodeau et R. Beliveau. 1995. « Immunochemical characterization of L- isoaspartyl-protein carboxyl methyltransferase from mammalian tissues » *Biochem. J.*, vol. 309, p. 993-998.
- Bouchard, P., C. Gagnon, D.M. Phillips et C.W. Bardin. 1980. « The localization of protein carboxyl-methylase in sperm tails » *J. Cell. Biol.*, vol. 86(2), p.417-423.
- Clarke, S. 1985. « Protein carboxyl methyltransferases : two distinct classes of enzymes » *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 54, p.479-506.
- 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., D. Ingross, B. Perfetto, A. Baroni, M. Zappia, L.L. Lobianco, M.A. Tufano, P. Galletti. 2001. « UVA irradiation induces L-isoaspartyl formation in melanoma cell proteins » *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 31(1), p. 1-9.
- Datta, S.R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh et M.E. Greenberg. 1997. « Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery » *Cell.*, vol. 91(2), p. 231-241.
- Daub, H., K. Gevaert, J. Vandekerckhove, A. Sobel et A. Hall. 2001. « Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16 » *J. Biol. Chem.*, vol. 276(3), p. 1677-1680.
- De Sarno, P., X. Li et R.S. 2002. « Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium » *Neuropharmacology*, vol. 43(7), p. 1158-1164.
- Desrosiers, R.R., E.A. Romanik et C.M. O'Connor. 1990. « Selective carboxyl methylation of structurally altered calmodulins in *Xenopus* oocytes » *J. Biol. Chem.*, vol. 265(34), p. 21368-21374.
- DeVry, C.G., W. Tsai et S. Clarke. 1996. « Structure of the human gene encoding the protein repair L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase » *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 335(2), 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(5), p. 275-288.
- Diliberto, E.J.Jr. 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.Jr. et J. Axelrod. 1976. « Regional and subcellular distribution of protein carboxymethylase in brain and other tissues » *J. Neurochem.*, vol. 26(6), p. 1159-1165.

- Doyle, H.A., R.J. Gee et M.J. Mamula. 2003. « A failure to repair self-proteins leads to T cell hyperproliferation and autoantibody production » *J. Immunol.*, vol. 171(6), p. 2840-2847.
- Dubrovskaya, A. et S. Souchelnytskyi. 2005. « Efficient enrichment of intact phosphorylated proteins by modified immobilized metal-affinity chromatography » *Proteomics*, vol. 5(18), p. 4678-4683.
- Einat, H., P. Yuan, T.D. Gould, J. Li, J. Du, L. Zhang, H.K. Manji et G. Chen. 2003. « The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation » *J. Neurosci.*, vol. 23(19), p.7311-7316.
- 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. 371(2), 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(31), p. 27856-27863.
- Farrar, C., C.R. Houser et S. Clarke. 2005. « Activation of the PI3K/Akt signal transduction pathway and increased levels of insulin receptor in protein repair-deficient mice » *Aging Cell.*, vol. 4(1), p.1-12.
- Farrar, C.E., C.S. Huang, S.G. Clarke et C.R. Houser. 2005. « Increased cell proliferation and granule cell number in the dentate gyrus of protein repair-deficient mice » *J. Comp. Neurol.* 2005, 493(4), p. 524-537.
- Foster, K., Y. Wang, D. Zhou et C. Wright. 2008. « Dependence on PI3K/Akt signaling for malignant rhabdoid tumor cell survival » *Cancer Chemother Pharmacol.*
- Franke, T.F., S.I. Yang, T.O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D.K. Morrison, D.R. Kaplan et P.N. Tsichlis. 1995. « The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase » *Cell.*, vol. 81(5), p.727-736.
- Franke, T.F., D.R. Kaplan et L.C. Cantley. 1997. « PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis » *Cell*, vol. 88(4), p. 435-437.
- Furuchi, T. et H. Homma. 2007. « Role of isomerized protein repair enzyme, PIMT, in cellular functions » *Yakugaku Zasshi.*, vol. 127(12), p.1927-1936.
- Galletti, P., M.L. De Bonis, A. Sorrentino, M. Raimo, S. D'Angelo, I. Scala, G. Andria, A. D'Aniello, D. Ingrosso et V. Zappia. 2007. « Accumulation of altered aspartyl residues in erythrocyte proteins from patients with Down's syndrome » *FEBS J.*, vol. 274(20), p. 5263-5277.
- Geiger, T. et S. Clarke S. 1987. « Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. ». *J. Biol. Chem.*, vol. 262, p 785-794.

- Ghandour, H., B.F. Lin, S.W. Choi, J.B. Mason et J. Selhub. 2002. « Folate status and age affect the accumulation of L-isoaspartyl residues in rat liver proteins » *J. Nutr.*, vol. 132(6), p.1357-1360.
- Gilbert, J.M., A. Fowler, J. Ablebaum et S. Clarke. 1988. « Purification of homologous protein carboxyl methyltransferase isozymes from human and bovine erythrocytes » *Biochemistry*, vol. 27(14), p.5227-5233.
- Gomez, T.A., K.L. Banfield, D.M. Trogler et S.G. Clarke. 2007. « The L-isoaspartyl-O-methyltransferase in *Caenorhabditis elegans* larval longevity and autophagy » *Dev. Biol.*, vol. 303(2), p. 493-500.
- Gong, B et E. Leznik. 2007. « The role of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in neurodegenerative disorders » *Drug News Perspect.*, vol. 20(6), p. 365-370.
- Griffiths, A.J.F., W.M. Gelbart, C. Sanlaville et J.H. Miller. 2001. « Analyse génétique moderne » Chapitre 3, p. 78. De Boeck Université.
- Griffith, S.C., M.R. Sawaya, D.R. Boutz, N. Thapar, J.E. Katz, S. Clarke et T.O. Yeates. 2001. « Crystal structure of a protein repair methyltransferase from *Pyrococcus furiosus* with its L-isoaspartyl peptide substrate » *J. Mol. Biol.*, vol. 313(5), p.1103-1116.
- Groenendyk, J., J. Lynch et M. Michalak. 2004. « Calreticulin, Ca²⁺, and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum » *Mol. Cells.*, vol. 17(3), p. 383-389.
- Henzel, W.J., J.T. Stults, C.A. Hsu et D.W. Aswad. 1989. « The primary structure of a protein carboxyl methyltransferase from bovine brain that selectively methylates L-isoaspartyl sites » *J. Biol. Chem.*, vol.264(27), p.15905-15911.
- Hanauer, A. Et ID Young. « Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features » *J. Med. Genet.*, vol. 39(10), p.705-713.
- Hao, Y., T. Creson, L. Zhang, P. Li, F. Du, P. Yuan, T.D. Gould, H.K. Manji et G. Cheng. 2004. « Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis » *J. Neurosci.*, vol. 24(29), p. 6590-6599.
- Horn, S., E. Endl, B. Fehse, M.M. Weck, G.W. Mayr et M. Jücker. 2004. « Restoration of SHIP activity in a human leukemia cell line downregulates constitutively activated phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 β signaling and leads to an increased transit time through the G1 phase of the cell cycle » *Leukemia*, vol. 18(11), p. 1839-1849.
- Hosaka, M., R.E. Hammer et T.C. Südhof. 1999. « A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles » *Neuron.*, vol. 24(2), p. 377-387.

- Huebscher, K.J., J. Lee, G. Rovelli, B. Ludin, A. Matus, D. Stauffer et P. Fürst. 1999. « Protein isoaspartyl methyltransferase protects from Bax-induced apoptosis » *Gene*, vol. 240(2), p. 333-341.
- Humbert, S. et F. Saudou. 2005. « Huntington's disease: intracellular signaling pathways and neuronal death » *J. Soc. Biol.*, vol.199(3), p.247-251.
- Ingrosso, D., A.V. Fowler, J. Bleibaum 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(33), p. 20131-20139.
- Ingrosso, D., R.M. Kagan et S Clarke. 1991 « Distinct C-terminal sequences of isozymes I and II of the human erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase » *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 175(1), p. 351-358.
- Ingrosso, D., S. D'Angelo, A.F. Perna, A. Iolascon, E. Miraglia del Giudice, S. Perrotta, V. Zappia et P. Galletti. 1995. « Increased membrane-protein methylation in hereditary spherocytosis. A marker of cytoskeletal disarray » *Eur. J. Biochem.*, vol. 228(3), p. 894-898.
- Ingrosso, D., S. D'angelo, E. di Carlo, A.F. Perna, V. Zappia 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(14), p. 4397-4405.
- Jensen, C.J., M.B. Buch, T.O. Krag, B.A. Hemmings, S. Gammeltoft et M. Frödin. 1999. « 90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 » *J. Biol. Chem.*, vol. 274(38), p. 27168-27176.
- Johnson, B.A., E.D. Murray, S. Clarke, D.B.Jr. Glass et D.W. Aswad, D.W. 1987a. «Protein carboxyl methyltransferase facilitates conversion of atypical L-isoaspartyl peptides to normal L-aspartyl peptides ». *J. Biol. Chem.*, vol.262, p. 5622-5629
- Johnson, B.A., E.L. LangmacK et D.W. Aswad, D.W., 1987b. « Partial repair of deamidation-damaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferase ». *J. Biol. Chem.*, vol.262, p. 12283-12287
- Johnson, B.A., S.Q. Ngo et D.W. Aswad. 1991a. « Widespread phylogenetic distribution of a protein methyltransferase that modifies L-isoaspartyl residues » *Biochem. Int.*, vol. 24(5), p. 841-847.
- Johnson, B.A., J.M. Shirohawa, J.W. Geddes, B.H. Choi, R.C. Kim et D.W. Aswad Kim R.C., 1991b. « Protein L-isoaspartyl methyltransferase in postmortem brains of aged humans » *Neurobiol. Aging.*, vol.12(1), p.19-24.
- Johnson, B.A., J. Najbauer et D.W. Aswad. 1993. « Accumulation of substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase in adenosine dialdehyde-treated PC12 cells » *J. Biol. Chem.*, vol. 268(9), p.6174-6181.

- Kagan, R.M., H.J. McFadden, P.N. McFadden, C. O'Connor et S. Clarke. 1997. « Molecular phylogenetics of a protein repair methyltransferase » *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 117(3), p. 379-385.
- Kalume, D.E. et H. Molina et A. Pandey. 2003. « Tackling the phosphoproteome: tools and strategies » *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 7(1), p.64-69.
- Kato, A, M. Yamamoto, T. Ohno , H. Kodaira, Y. Nishiyama et Y. Kawaguchi. 2005.« Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1 » *J. Virol.*, vol. 79(14), p.9325-9331.
- Kharbanda, K.K., M.E. Mailliard, C.R. Baldwin, M.F. Sorrell et D.J. Tuma. 2007. « Accumulation of proteins bearing atypical isoaspartyl residues in livers of alcohol-fed rats is prevented by betaine administration: effects on protein-L-isoaspartyl methyltransferase activity » *J. Hepatol.*, vol. 46(6), p. 1119-1125.
- Kim, E., J.D. Lowenson, D.C. MacLaren, S. Clarke 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(12), p. 6132-6137.
- Kim, E., J.D. Lowenson, S. Clarke et S.G. Young. 1999. « Phenotypic analysis of seizure-prone mice lacking L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase » *J. Biol. Chem.*, vol. 274(29), p.20671-20678.
- Kim, S. et M.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.
- Kodama, T., M. Mizobuchi, R. Takeda, H. Torikai, H. Shinomiya et Y. Ohashi Y. 1995. « Hampered expression of isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase gene in the human cataractous lens » *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1245(2), p.269-272.
- Kosugi, S., T. Furuchi, M. Katane, M. Sekine, T. Shirasawa et H. Homma. 2008. « Suppression of protein l-isoaspartyl (d-aspartyl) methyltransferase results in hyperactivation of EGF-stimulated MEK-ERK signaling in cultured mammalian cells » *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 371(1), p. 22-27.
- Kostrouchová, M., Z. Kostrouch et M. Kostrouchová. 2007. « Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways » *Folia Biol. (Praha)*, vol. 53(2), p.37-49.
- Ladino, C.A. et C.M. O'Connor. 1991. « Identification of a site for carboxyl methylation in human alpha-globin » *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 180(2), p.742-747.
- 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(2), p. 297-304.

- Laeng, P., R.L. Pitts, A.L. Lemire, C.E. Drabik, A. Weiner, H. Tang, R. Thyagarajan, B.S. Mallon et C.A. Altar. 2004. « The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells » *J. Neurochem.*, vol. 91(1), p. 238-251.
- Lamarre M. Et R.R. Desrosiers. 2008. « Up-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase expression by lithium is mediated by glycogen synthase kinase-3 inactivation and beta-catenin stabilization » *Neuropharmacology*.
- Lanthier, J., A. Bouthillier, M. Lapointe, M. Demeule, R. Béliveau 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(3), 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(1), p. 96-105.
- Lanthier, J. et R.R. Desrosiers. 2006. « Regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase by cell-matrix interactions: involvement of integrin α v β 3, PI 3-kinase, and the proteasome » *Biochem. Cell. Biol.*, vol. 84(5), p.684-694.
- Lapointe, M., J. Lanthier, R. Moundjian, A. Régina 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(1-2), p. 93-103.
- Li, C. et S. Clarke. 1992. « A protein methyltransferase specific for altered aspartyl residues is important in *Escherichia coli* stationary-phase survival and heat-shock resistance » *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89(20), p. 9885-9889.
- Lindquist, J.A. et P.N. McFadden. 1994. « Automethylation of protein (D-aspartyl/L-isoaspartyl) carboxyl methyltransferase, a response to enzyme aging. » *J. Protein Chem.*, vol. 13(1), p.23-30.
- Lindquist, J.A., E. Barofsky et P.N. McFadden. 1996. « Determination of two sites of automethylation in bovine erythrocyte protein (D-aspartyl/L-isoaspartyl) carboxyl methyltransferase » *J. Protein Chem.*, vol. 15, p.115-122.
- 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., A.M. Maxam 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.
- Lowenson, J.D. et S. Clarke. 1991. « Structural elements affecting the recognition of L-isoaspartyl residues by the L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis » *J. Biol. Chem.*, vol.266, p.19396-19406.

- Lowenson, J.D. et S. Clarke. 1992. « Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte by L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis » *J. Biol. Chem.*, vol.267, p.5985-5995.
- MacLaren, D.C., R.M. Kagan 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(1), p. 277-283.
- MacLaren, D.C., C.M. O'Connor, Y.R. Xia, M. Mehrabian, I. Klisak, R.S. Sparkes, S. Clarke et A.J. Lusis. 1992. « The L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase gene (PCMT1) maps to human chromosome 6q22.3-6q24 and the syntenic region of mouse chromosome 10 » *Genomics*, vol. 14(4), p. 852-856.
- Margolis, B. Et E.Y. Skolnik. 1994. « Activation of Ras by receptor tyrosine kinases » *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 5(6), p. 1288-1299.
- Masserano, J.M. et N. Weiner. 1983. «Tyrosine hydroxylase regulation in the central nervous system » *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 53-54(1-2):129-152
- McFadden, P.N. et S. Clarke. 1982. «Methylation at D-aspartyl residues in erythrocytes: possible step in the repair of aged membrane proteins ». *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol.79, p.2460-2464.
- McFadden, P.N. et S. Clarke. 1987. « Conversion of isoaspartyl peptides: implications for the cellular repair of damaged proteins » *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol.84, p.2595-2599.
- McNiven, M.A., H. Cao, K.R. Pitts et Y. Yoon. 2000. «The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places » *Trends Biochem. Sci.*, vol. 25(3), p.115-120.
- Michaelis, M., T. Suhan, U.R. Michaelis, K. Beek, F. Rothweiler, L. Tausch, O. Werz, D. Eikel, M. Zörnig, H. Nau, I. Fleming, H.W. Doerr et J.Jr. Cinatl. 2006. « Valproic acid induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and inhibits apoptosis in endothelial cells » *Cell Death Differ.*, vol. 13(3), p.446-453.
- Mizobuchi M., K. Murao, R. Takeda et Y. Kakimoto. 1994. « Tissue-specific expression of isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase gene in rat brain and testis » *J. Neurochem.*, vol. 62(1), p. 322-328.
- 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.
- Mudgett M.B. et S. Clarke. 1993. « Characterization of plant L-isoaspartyl methyltransferases that may be involved in seed survival: purification, cloning, and sequence analysis of the wheat germ enzyme » *Biochemistry*, Vol. 32(41), p.11100-11111.
- Mudgett, M.B. et Clarke S. 1994. « Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat » *J. Biol. Chem.*, vol. 269(41), p.25605-25612.

- Mudgett M.B., J.D. Lowenson et S. Clarke. 1997. « Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in plants. Phylogenetic distribution and the accumulation of substrate proteins in aged barley seeds » *Plant Physiol.*, vol. 115(4), p.1481-1489.
- Murray Jr., E.D. et S. Clarke. 1984. « Synthetic peptide substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. Detection of new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues ». *J.Biol.Chem.*, vol.259, p.10722-10732.
- Muslin, A.J. et H. Xing. 2000. « 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference » *Cell. Signal.*, vol. 12(11-12), p. 703-709.
- Mustacich, D. et G. Powis. 2000. « Thioredoxin reductase » *Biochem. J.*, vol. 346, p1-8.
- Nabais, S., J.C. Machado, C. Lopes, R. Seruca, F. Carneiro et M. Sobrinho-Simões. 2002. « Different patterns of beta-catenin expression in gastric carcinomas: relationship with clinicopathological parameters and prognostic outcome » *Histopathology*, vol. 41(4), p. 368-369.
- Najbauer, J., J. Orpiszewski et D.W. Aswad. 1996. « Molecular aging of tubulin: accumulation of isoaspartyl sites in vitro and in vivo » *Biochemistry*, vol. 35(16), p. 5183-5190.
- Nguyen, TL. 2008. « Targeting RSK: an overview of small molecule inhibitors » *Anticancer Agents Med. Chem.*, vol. 8(7), p.710-716.
- O'Connor, C.M. et S. Clarke S. 1985. « Specific recognition of altered polypeptides by widely distributed methyltransferases » *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 132(3), p.1144-1150.
- O'Connor, C.M. et K.E. Yutzey. 1988. « Enhanced carboxyl methylation of membrane-associated hemoglobin in human erythrocytes » *J. Biol. Chem.* 1988, vol. 263(3), p. 1386-1390.
- Ota, I.M., J.M. Gilbert et S. Clarke. 1988. «Two major isozymes of the protein D-aspartyl/L-isoaspartyl methyltransferase from human erythrocytes ». *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 151(3), p.1136-1143.
- Ota, I.M. et S. Clarke. 1990. «Multiple sites of methyl esterification of calmodulin in intact human erythrocytes » *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 279(2), p. 320-327.
- Paranandi, M.V. et D.W. Aswad. 1995. « Spontaneous alterations in the covalent structure of synapsin I during in vitro aging » *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 212(2), p. 442-448.
- Partovian, C. et M. Simons M. 2004. « Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells » *Cell. Signal.*, vol. 16(8), p. 951-957.
- Payan, I.L., S.J. Chou, G.H. Fisher, E.H. Man, C. Emory et W.H. Frey. 1992. « Altered aspartate in Alzheimer neurofibrillary tangles » *Neurochem. Res.*, vol. 17(2), p. 187-191.

- Perna, A.F., D. Ingrosso, E. Satta, M. Romano, A. Cimmino, P. Galletti, V. Zappia, N.G. De Santo. 2001. « Metabolic consequences of hyperhomocysteinemia in uremia » *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 38(4 Suppl. 1), p. S85-S90.
- Perna, A.F., P. Castaldo P., N.G. De Santo, E. di Carlo, A. Cimmino, P. Galletti. V. Zappia et D. Ingrosso. 2001. « Plasma proteins containing damaged L-isoaspartyl residues are increased in uremia: implications for mechanism » *Kidney Int.*, vol. 59(6), p. 2299-2308.
- Pollak, M.N., E.S. Schernhammer et S.E. Hankinson. 2004. « Insulin-like growth factors and neoplasia » *Nat. Rev. Cancer.*, vol. 4(7), p. 505-518.
- Potter, S.M., B.A. Johnson, A. Henschen, D.W. Aswad 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(27), p. 6339-6347.
- 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.
- Roberts, P.J. et C.J. Der. 2007. « Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer » *Oncogene*, vol. 26(22), p. 3291-3310.
- Rodriguez-Boulan, E., G. Kreitzer et A. Müsch. 2005. « Organization of vesicular trafficking in epithelia » *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, vol. 6(3), p. 233-247.
- Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt et A.R. Nebreda. 1994. « A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins » *Cell*, vol. 78(6), p. 1027-1037.
- Roux, P.P. et J. Blenis. 2004. « ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions » *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 68(2), p. 320-344.
- Ryttersgaard, C., S.C. Griffith, M.R. Sawaya, D.C. MacLaren, S. Clarke et T.O. Yeates. 2001. « Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase ». *J. Biol. Chem.*, vol. 277(12), p.10642-10646.
- Sánchez, C., M. Pérez et J. Avila. 2000. « GSK3beta-mediated phosphorylation of the microtubule-associated protein 2C (MAP2C) prevents microtubule bundling » *Eur. J. Cell. Biol.*, vol. 79(4), p. 252-260.
- Sandmeier, E., P. Hunziker, B. Kunz, R. Sack et P. Christen. 1999. « Spontaneous deamidation and isomerization of Asn108 in prion peptide 106-126 and in full-length prion protein » *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 261(3), p. 578-583.

- Schmidt, S.R., F. Schweikart et ME. Andersson. 2007. « Current methods for phosphoprotein isolation and enrichment » *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 849(1-2), p. 154-162.
- Shahbazian, D., P.P. Roux, V. Mieulet, M.S. Cohen, B. Raught, J. Taunton, J.W. Hershey, J. Blenis, M. Pende et N. Sonenberg. 2006. « The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity » *EMBO J.*, vol. 25(12), p. 2781-2791.
- Shimizu, T., A. Watanabe, M. Ogawara, H. Mori et T. Shirasawa. 2000. « Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease » *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 381(2), p. 225-234.
- Shimizu, T., T. Ikegami, M. Ogawara, Y. Suzuki, M. Takahashi, H. Morio et T. Shirasawa. 2002. « Transgenic expression of the protein-L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) gene in the brain rescues mice from the fatal epilepsy of PIMT deficiency » *J. Neurosci. Res.* 2002, vol. 69(3), p. 341-352.
- Shimizu, T., Y. Matsuoka et T. Shirasawa. 2005. « Biological significance of isoaspartate and its repair system » *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28(9), p.1590-1596.
- Shirasawa, T., R. Endoh, Y.X. Zeng, K. Sakamoto et H. Morio. 1995. « Protein L-isoaspartyl methyltransferase: developmentally regulated gene expression and protein localization in the central nervous system of aged rat » *Neurosci. Lett.*, vol. 188(1), p.37-40.
- Skinner, M.M., J.M. Puvathingal, R.L. Walter, et A.M. Friedman. 2000. « Crystal structure of protein isoaspartyl methyltransferase: a catalyst for protein repair » *Structure*, vol. 8(11), p.1189-1201.
- Sundaram, MV. 2006. « RTK/Ras/MAPK signalling » *WormBook*, p.1-19.
- Takeda, R., M. Mizobuchi, K. Murao, M. Sato et J. Takahar. 1995. « Characterization of three cDNAs encoding two isozymes of an isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase from human erythroid leukemia cells » *J. Biochem.*, vol. 117(4), p.683-685.
- Tan, Y., H. Ruan, M.R. Demeter et M.J. Comb. 1999. « p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway » *J. Biol. Chem.*, vol. 4(49), p. 34859-34867.
- Tanaka, Y., K. Tsumoto, Y. Yasutake, M. Umetsu, M. Yao, H. Fukada, I Tanaka et I Kumagai. 2004. « How oligomerization contributes to the thermostability of an archaeon protein. Protein L-isoaspartyl-O-methyltransferase from *Sulfolobus tokodaii* » *J. Biol. Chem.*, vol. 279(31), p.32957-32967.
- Toney, K., A. Bateman, C. Gagnon et H.P. Bennett. 1984. « Aspartimide formation in the joining peptide sequence of porcine and mouse pro-opiomelanocortin » *J. Biol. Chem.*, vol. 268(2), p.1024-1031.

- 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(1), p. 491-497.
- Vigneswara, V., J.D. Lowenson, C.D. Powell, M. Thakur, K. Bailey, S. Clarke, D.E. Ray, W.G. Carter. 2006. « Proteomic identification of novel substrates of a protein isoaspartyl methyltransferase repair enzyme » *J. Biol. Chem.*, vol. 281(43), p.32619-32629.
- Visick, J.E., H Cai et S. Clarke. 1998. « The L-isoaspartyl protein repair methyltransferase enhances survival of aging *Escherichia coli* subjected to secondary environmental stresses » *J. Bacteriol.*, vol. 180(10), p. 2623-2629.
- Voet, D. et J. Voet. (2 ième édition). 1998. « Biochimie » Chapitre sur le métabolisme des acides aminés, p. 727 à 784. De Boeck Université.
- Weber, D.J., P.N. McFadden et B. Caughey. 1998 « Measurement of altered aspartyl residues in the scrapie associated form of prion protein » *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 246(3), p. 606-608.
- Wells, A.1999. « EGF receptor » *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, vol. 31(6), p. 637-643.
- Williams, M.R., J.S. Arthur, A. Balendran, J. van der Kaay, V. Poli et P. Cohen et D.R. Alessi. 2000. « The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells » *Curr. Biol.* 2000, vol. 10(8), p. 439-448.
- Wolschin,, F., S. Wienkoop et W. Weckwerth. 2005. « Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using oxide/hydroxideaffinitychromatography (MOAC) » *Proteomics*, 5: 4389-4397.
- Yamamoto, A., H. Takagi, D. Kitamura, H. Tatsuoka, H. Nakano, H. Kawano, H. Kuroyanagi, Y. Yahagi, S. Kobayashi, K. Koizumi, T. Sakai, K. Saito, T. Chiba, K. Kawamura, K. Suzuki, T. Watanabe, H. Mori et T. Shirasawa. 1998. « Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy » *J. Neurosci.*, vol. 18(6), p. 2063-2074.
- Yang, M.L., H.A. Doyle, R.J. Gee, J.D. Lowenson, S. Clarke, B.R. Lawson, D.W. Aswad et M.J. Mamula. 2006. « Intracellular protein modification associated with altered T cell functions in autoimmunity » *J. Immunol.*, vol. 177(7), p. 4541-4549.
- Yeung, K., P. Janosch, B. McFerran, D.W. Rose, H. Mischak, J.M. Sedivy et W. Kolch. 2000. « Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein » *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20(9), p. 3079-3085.
- Yoshimura, T., Y. Kawano, N. Arimura, S. Kawabata, A. Kikuchi et K. Kaibuchi. 2005. « GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity » *Cell.*, vol. 1, p. 137-149.

- Young, G.W., S.A. Hoofring, M.J. Mamula, H.A. Doyle, G.J. Bunick, Y. Hu, D.W. Aswad. 2005. « Protein L-isoaspartyl methyltransferase catalyzes in vivo racemization of Aspartate-25 in mammalian histone H2B » *J. Biol. Chem.*, vol. 280(28), p. 26094-26098.
- Zebisch, A., P.B. Staber, A. Delavar, C. Bodner, K. Hiden, K. Fischereder, M. Janakiraman, W. Linkesch, H.W. Auner, W. Emberger, C. Windpassinger, M.G. Schimek M.G, G. Hoefler, J. Troppmair et H. Sill. 2006. « Two transforming C-RAF germ-line mutations identified in patients with therapy-related acute myeloid leukemia » *Cancer Res.*, vol. 66(7), p. 3401-3408.
- Zhu, H., W. Yang, W. Lu, J. Zhang, G.M. Shaw, E.J. Lammer et R.H. Finnell. 2006a. « A known functional polymorphism (Ile120Val) of the human PCMT1 gene and risk of spina bifida » *Mol. Gen.et Metab.*, vol. 87(1), p.66-70.
- Zhu, J.X., H.A. Doyle, M.J. Mamula et D.W. Aswad. 2006b. « Protein repair in the brain, proteomic analysis of endogenous substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase in mouse brain » *J. Biol. Chem.*, vol. 281(44), p. 33802-33813.