

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX PARTENAIRES D'INTERACTION

DE LA CYCLINE D2 TRONQUÉE DE SOURIS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

SÉBASTIEN PETIBOIS-PAILLÉ

JUILLET 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement mon directeur de recherche, Dr Éric Rassart, qui a dirigé l'ensemble de ce projet. Je le remercie de m'avoir permis de faire ma maîtrise au sein de son équipe, de me faire confiance, partager son savoir et de sa grande patience. Je remercie également le Dr Elsy Édouard, associée de recherche du laboratoire pour son aide, ses précieux conseils et son soutien tout au long de ce projet.

Un très grand merci à Fée-Ann McNabb et à Philippe Legault, qui m'ont fourni l'aide et le matériel nécessaire pour démarrer ce projet de recherche. Merci aux autres étudiants gradués du laboratoire Rassart pour leurs précieux conseils; Cyndia Charfi, Faldila Larguet, Louis-Charles Levros, Ouafa Najib, Oulianna Souchkova et Sonia Do Carmo.

Je remercie ma famille et mes amis(es) pour votre support et vos encouragements sans lesquels je n'aurais pu finaliser ce mémoire. Pour terminer, merci à toi ma tendre moitié, ta vitalité et ta joie de vivre m'ont métamorphosé. Sans ton support je n'aurais écrit ce mémoire.

MERCI !

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
LISTE DES SYMBOLES	xii
RÉSUMÉ :	xiii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Contrôle de la division cellulaire	3
1.2 Le cycle cellulaire eucaryote	4
1.3 Les protéines kinases hétérodimériques	5
1.3.1 Les cyclines	5
1.3.2 Les cyclines D	6
1.3.3 Expression oncogénique des cyclines D	7
1.3.4 La cycline D2 tronquée	10
1.3.5 Les CDK	11
1.4 Progression du cycle cellulaire	12
1.5 La régulation de l'expression des cyclines D	14
1.6 La régulation des complexes cycline-CDK	15
1.6.1 Les cyclin-dependent activating-kinase kinase (CAK)	15
1.6.2 Les CKI	16
1.6.2.1 Les Cip/Kip	17
1.6.2.2 Les INK4	18
1.6.3 Inactivation des CDK par phosphorylation	18
1.7 Protéines du rétinoblastome	19
1.8 Facteurs de transcription de la famille E2F	20

1.9 Hypothèse de travail	25
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
2.1 Création de clones pour la cycline D2 et la cycline D2 tronquée.....	26
2.2 Lignées cellulaires, conditions de culture et transfections	26
2.3 Protocole de co-immunoprécipitation.....	26
2.4 Immunobuvardage (Western Blot)	27
2.5 Coloration au nitrate d'argent.....	28
2.6 Chromatographie d'affinité	28
2.7 Protocole de colocalisation	29
2.7.1 Fixation des cellules	29
2.7.2 Marquage à l'anticorps	29
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	30
3.1 Expression des protéines.....	30
3.1.1 Expression des protéines dans des cellules NIH/3T3	30
3.1.2 Expression des protéines dans le temps.....	32
3.2 Purification de la protéine.....	33
3.2.1 Dosage de l'anticorps	34
3.2.2 Test d'éluion par compétition avec le peptide Myc.....	34
3.3 Séparation des protéines par électrophorèse et coloration au nitrate d'argent.....	36
3.4 Purification de la cycline D2 par chromatographie d'affinité	37
3.5 Confirmation des interactions entre l'anticorps anti-myc et la forme native de la D2 et la D2Trc in situ	39
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	41
4.1 Expression de la protéine.....	41
4.2 Purification des protéines	41

4.2.1 Dosage de l'anticorps	42
4.2.2 Éluion au peptide Myc.....	42
4.2.3 Visualisation des protéines sur gel coloré au nitrate d'argent	43
4.3 Purification de la cycline D2 par chromatographie d'affinité	44
4.4 Test de liaison entre l'anticorps et les protéines sous leur forme native	45
CHAPITRE V	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES.....	46
ANNEXE A	
REPRÉSENTATION PHYSIQUE DU SITE D'INSERTION GRIS DU RÉTROVIRUS MURIN GRAFFI.....	50
RÉFÉRENCES	51

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Représentation schématique de l'ADNc de la cycline D2 normale et de la cycline D2 tronquée obtenu après épissage alternatif du gène CCND2.....	23
1.2 Comparaison de la séquence en acides aminés de l'isoforme tronqué (D2Trc) et de l'isoforme long (D2).....	24
3.1 Contrôle de l'expression des cyclines D2 et D2Trc marquées avec l'épitope Myc dans des cellules NIH/3T3	31
3.2 Contrôle de l'expression des cyclines D2 et D2Trc dans des cellules NIH/3T3 24, 36 et 48 heures après la transfection.....	32
3.3 Dosage de la quantité d'anticorps anti-Myc requis et test d'éluion des protéines à l'aide du peptide Myc.....	35
3.4 Séparation des protéines par électrophorèse en présence de SDS et coloration du gel au nitrate d'argent.....	36
3.5 Purification de la cycline D2 par chromatographie d'affinité.....	38
3.6 Test de liaison <i>in situ</i> de l'anticorps avec la forme native de la D2 et la D2 Trc.....	40
5.1 Schéma représentatif de la purification à l'aide de la protéine de fusion TAP.....	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléotidique
ADNc	Acide désoxyribonucléotidique complémentaire
Aib-1/ NcoA 3	Récepteur nucléaire coactivateur 3
ATP	Adénosine triphosphate
α	Alpha
Å	Angström
APC	Anaphase Promoting Complex
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asp	Asparagine
ATM :	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
β	Beta
CAK	CDK activating kinase
CDH1	Cadherin-1
CCND	Gène des cyclines D
CCND1	Gène de la cycline D1
CCND2	Gène de la cycline D2
CCND3	Gène de la cycline D3

CDK	Kinase cycline dépendante
Cip/Kip	Inhibiteur des CDKS
CKI	CDK Kinase Inhibitor
CREB	CRE-binding protein
CRM-1	Chromosome Region Maintenance 1
δ	Delta
D1	Cycline D1
D1b	Cycline D1b
D2	Cycline D2
D2Trc	Cycline D2 Tronquée
D3	Cycline D3
E2F	Facteur de liaison au promoteur E2
<i>E2f3</i>	Locus du gène E2F-3
ECL	Réactif enzymatique chimiluminescent
EGFP	Protéine fluorescente verte améliorée
g:	Gramme(s)
G0	Quiescence
G1	Gap 1
G2	Gap 2
GFP	Protéine fluorescente verte
Grip-1	Glutamate receptor-interacting protein 1

GST	Glutathion S-transférase
GSK3 β	Glycogène Synthase Kinase 3 β
HCl	Acide chlorydrique
INK4	Inhibiteur de CDK4
Kb	Kilopaire(s) de base
kDa	Kilodalton
L	Litre(s)
M	Molaire
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MAT1	Ménage à trois
mg	Milligramme(s)
mL	Millilitre(s)
μ g	Microgramme(s)
μ L	Microlitre(s)
mM	Millimolaire
MPF	M-phase Promoting Factor
MuLV	Virus de la leucémie murine
NaCl	Chlorure de sodium
NcoA/Src-1	Récepteur nucléaire coactivateur 1
NFKB	Facteur nucléaire kappa B
ng	Nanogramme

NLS	Signal de localisation nucléaire
PBS	Tampon phosphate salin
PCNA	Proliferation cell nuclear antigen
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
Phase M	Mitose
Phase S	Synthèse
pRB	Protéine du rétinoblastome
pTEN	Phosphatase and TENsin homolog
R	Point de restriction
SCF	Skp1-Cullin1-F-box protein
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
Ser	Sérine
Séquence PEST	Proline, Acide glutamique, serine, thréonine
STAT	Signal Transducer and activator of transcription
TAF _{II} 250	Sous-unité 1 du facteur d'initiation de la transcription TFIID (Transcription initiation factor TFIID subunit 1)
TAP	Tandem Affinity Purification
TCR	Récepteur de cellule T (T-cell receptor)
TGF- β	Transforming Growth factor β
Thr	Thréonine

Tyr1	Tyrosine
Tris	1,3-Propanediol, 2-amino-2-(hydroxymethyl)
VPH	Virus du papillome humain

LISTE DES SYMBOLES

Å	10^{-10} mètres
°	Degrés
°C	Température en degrés Celsius
G	Force centrifuge
m	Milli, 10^{-3}
%	Pourcentage
n	Nano, 10^{-12}
μ	Micro, 10^{-6}

RÉSUMÉ

Annuellement, la vie de millions de personnes est bouleversée suite à un diagnostic de cancer. Cette maladie est caractérisée par une prolifération cellulaire anormale au sein d'un tissu ou d'un organe au point de menacer la vie du patient. Une multitude de gènes sont connus pour leur implication dans le cancer. Toutefois les protéines régulatrices du cycle cellulaire, les cyclines, sont les principaux responsables du dérèglement cellulaire. Les cyclines D contrôlent l'entrée et la progression de la cellule en phase G1. La découverte d'un site commun d'intégration du rétrovirus murin Graffi en amont du gène de la cycline D2 (D2) a révélé l'existence d'un nouvel isoforme, la cycline D2 tronquée (D2Trc). La D2Trc se distingue par l'utilisation d'un site donneur d'épissage alternatif localisé dans le second intron. Il en résulte un exon 2 allongé et l'apparition d'un codon stop après le 156^e acide aminé. Par rapport à la D2, 133 acides aminés sont manquants dont les 21 derniers de la boîte cycline. Les 20 acides aminés terminaux diffèrent de la D2. L'altération de la séquence génère une protéine cytosolique contrairement à la D2 qui est nucléaire. Il a été démontré que la D2Trc détient un pouvoir immortalisant supérieur à la D2. Cette étude vise à identifier les principaux partenaires d'interaction de la D2Trc chez la souris par co-immunoprécipitation. Des fibroblastes de souris (NIH/3T3) ont été transfectés par le vecteur pCMV contenant l'ADNc murin de la D2 ou la D2Trc en phase avec l'épitope Myc à l'extrémité N-terminale. La D2 et la D2Trc ont été co-immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope Myc associé à de billes de protéine G sépharose. Les complexes protéiques ont été dissociés de l'anticorps par compétition avec le peptide Myc. Les extraits ont été séparés sur un gel de polyacrylamide puis colorés au nitrate d'argent. Les interactions entre l'anticorps et la forme native de la D2 et la D2Trc ont été observées *in situ* par colocalisation. Les résultats indiquent que l'anticorps peut se lier à l'étiquette Myc des protéines tant dans la forme native que linéaire, toutefois cette liaison serait faible. Les lavages s'avèrent suffisants pour briser le lien entre la protéine et l'anticorps. L'étiquette serait difficilement accessible dû à une congestion engendrée par les partenaires d'interaction et/ou une nouvelle conformation causée par des interactions entre l'étiquette et la protéine. L'utilisation d'une méthode alternative telle que le double hybride chez la levure ou l'utilisation du vecteur TAP serait à envisager.

MOTS CLÉS

Colocalisation, Co-immunoprécipitation, Cycle cellulaire, Cycline D2, Cycline D2 tronquée, Interactions protéine-protéine.

INTRODUCTION

Le cancer est un véritable fléau qui ronge lentement notre société. Près de 40% des Canadiennes et 45% des Canadiens développeront un cancer au cours de leur vie. Selon les taux de mortalité actuels, 24% des femmes et 29% des hommes succomberont à la maladie. Selon les estimés, en 2011 près de 177 800 nouveaux cas de cancer seront répertoriés et 75 000 décès seront causés par cette maladie. Le taux de survie 5 années après les traitements est d'environ 62% pour l'ensemble des cancers (Comité directeur de la Société canadienne du cancer, 2011). Il y existe une multitude de facteurs de risque pouvant entraîner l'apparition de la maladie : le mode de vie (forme physique, alimentation, stress), l'exposition à des agents chimiques (tabac, mercure), des infections chroniques (*Helicobacter pylori*, VPH, les hépatites), des agents physiques (ultraviolets, radioactivité) ainsi que des composantes héréditaires. Chacun de ces facteurs est susceptible d'altérer le matériel génétique de l'individu. Au fil des années et des mutations, une cellule parvient à échapper au contrôle cellulaire et à se multiplier indépendamment des signaux extracellulaires envahissant ainsi l'hôte, provoquant l'apparition de la maladie.

Une multitude de gènes sont connus pour leur implication dans le cancer. Toutefois les principaux responsables du dérèglement cellulaire sont les protéines régulatrices du cycle cellulaire. L'altération de leur expression engendre des cellules immortelles qui ne dépendent plus des signaux extracellulaires. La surexpression des protéines régulant la progression du cycle cellulaire, les cyclines, a été détectée dans une multitude de cancers : adénome parathyroïdien, carcinomes de cellules squameuses de la tête et du cou, cancer de la vessie, cancer du sein, tumeurs gastriques, des lymphomes malins, etc.

L'étude de la transformation cellulaire par le rétrovirus murin Graffi, a permis de découvrir un nouvel isoforme de la cycline D2, la cycline D2 tronquée (D2Trc). Cet isoforme est activé dans 13% des leucémies induites par le MuLV Graffi (4/30 tumeurs indépendantes

étudiées), ce qui montre que la dérégulation du gène *CCND2* est un événement important dans l'induction de la tumorigenèse (Denicourt *et al.*, 2003). La D2Trc est trouvée dans certaines tumeurs murines induites par les rétrovirus murin Graffi (Denicourt *et al.*, 2003) et RadLV/VL3 (Tremblay *et al.*, 1992) mais aussi dans différents cancers de cerveau humain. De plus, elle semblerait jouer un rôle cellulaire, puisqu'on la retrouve dans certains tissus normaux chez l'humain, la souris et la grenouille (Denicourt, 2002; Taïeb et Jessus, 1996).

Il a été démontré que l'expression ectopique de la D2Trc avec un Ha-Ras activé induit un phénotype transformé chez les fibroblastes primaires d'embryons de souris (MEF) et que cette capacité oncogénique est nettement supérieure à la D2 (Denicourt, 2002; Denicourt *et al.*, 2008). Malgré le fait que la boîte cycline soit incomplète, la D2Trc conserve sa capacité à interagir avec les CDK4/6 mais ne parvient pas à phosphoryler pRb dans des cellules NIH/3T3, possiblement parce que la D2Trc ne migre pas au noyau. Sa localisation uniquement cytoplasmique laisse présager de nouveaux partenaires d'interactions qui seraient responsables de son pouvoir immortalisant supérieur à la D2

La D2Trc semble jouer un rôle important dans la progression du cycle cellulaire et dans le processus de tumorigenèse. L'identification des protéines interagissant avec la D2Trc permettrait de cibler les voies de signalisation dans lesquelles elle est impliquée, de mieux comprendre son rôle physiologique ainsi que son implication dans le processus de tumorigenèse. Pour ce faire des cellules NIH/3T3 ont été transfectées avec le vecteur pCMV-Myc en phase avec l'ADNc de la D2 ou de la D2Trc. Les protéines ont été extraites et purifiées par co-immunoprécipitation à l'aide de billes protéine G sépharose et d'anticorps dirigés contre l'épitope Myc. Les protéines ont été séparées de l'anticorps par compétition avec un peptide Myc. Les protéines ont été séparées par électrophorèse en présence de SDS et les bandes ont été révélées par coloration au nitrate d'argent.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Contrôle de la division cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus complexe impliqué dans la croissance et la prolifération de toutes les cellules et organismes vivants. La transition entre les diverses phases est régulée afin d'obtenir une bonne coordination entre la prolifération cellulaire, la réplication de l'ADN et la division normale de la cellule. Les facteurs de croissance, les récepteurs, les transducteurs intracellulaires, les facteurs de transcription et les protéines gouvernant le cycle cellulaire jouent un rôle de premier plan dans le contrôle et la régulation de la prolifération. La mutation ou la surexpression d'un de ces gènes est susceptible d'entraîner le développement du cancer chez un individu faisant d'eux des oncogènes.

Toutes les cellules cancéreuses ou tumorales ont comme point en commun, un dérèglement des mécanismes cellulaires fondamentaux. Avec le temps, elles deviennent insensibles aux signaux antiprolifératifs et acquièrent un caractère immortel. La transition G1/S est une étape clé du cycle cellulaire. L'altération des gènes régulant cette phase permet à la cellule d'échapper à l'état de quiescence et d'initier un nouveau cycle cellulaire malgré la présence de signaux antiprolifératifs. De ce fait, les gènes régulant la transition G1/S sont fréquemment responsables du développement du cancer chez l'humain. L'implication de ces gènes reflète l'importance de leur découverte et leur caractérisation afin d'élaborer des stratégies et développer des remèdes pour combattre la maladie.

Les mécanismes de la régulation du cycle cellulaire reposent essentiellement sur un complexe protéique constitué d'une cycline et d'une kinase cycline-dépendante (CDK). Ces complexes hétérodimériques contrôlent l'activité et l'expression d'une multitude de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN et la mitose. Chaque combinaison cyclines-CDK

détermine les protéines qui seront activées ou inactivées en fonction de la progression du cycle cellulaire (Johnson et Walker, 1999; Sherr, 1993; Vermeulen *et al.*, 2003).

1.2 Le cycle cellulaire eucaryote

Le cycle cellulaire eucaryote est divisé en quatre phases : G1, S, G2 et M. Lors de la phase S, la cellule réplique le matériel génétique alors qu'en phase M a lieu la ségrégation des chromosomes suivi de la cytokinèse (Vermeulen *et al.*, 2003). Le résultat final est la production de deux cellules filles identiques. Les phases G1 et G2 constituent les intervalles de croissance entre les phases S et M. Durant ces intervalles, la cellule synthétise tous les ARN et les protéines dont elle a besoin. Lors de la phase G1, la cellule assimile les signaux mitogènes et inhibiteurs de croissance et décide si elle doit quitter son état de quiescence pour s'engager dans le processus de réplication d'ADN (Johnson et Walker, 1999; Lukas *et al.*, 2004; Schafer, 1998; Vermeulen *et al.*, 2003).

Pour assurer l'ordre et la succession des quatre phases du cycle, la cellule dispose de mécanismes de contrôle (points de contrôle). À chaque étape du cycle cellulaire, le déroulement du cycle s'arrête lorsqu'une anomalie est décelée : lésion sur l'ADN, ADN non répliqué, chromosomes non attachés au fuseau mitotique ou ségrégation chromosomique inadéquate (Lukas *et al.*, 2004). Une multitude de protéines régulatrices sont impliquées dans la progression du cycle. La régulation du cycle est associée à un complexe constitué d'une cycline et d'une CDK. Ces complexes effectuent la transition d'une phase à l'autre du cycle via des points de contrôle (Schafer, 1998; Vermeulen *et al.*, 2003). Les points de contrôles agissent directement sur les complexes cycline-CDK lorsqu'une anomalie est détectée. À titre d'exemple, lorsqu'une lésion survient sur l'ADN, la protéine kinase ATM est activée. La kinase ATM phosphoryle et active les sérine/thréonine kinases CHK1 et 2. Ceci déclenche deux voies : a) CHK2 et ATM phosphorylent p53, induisant la production de molécules inhibitrices telles que p21, inactivant les cyclines et b) CHK1 phosphoryle et induit la dégradation de Cdc25 par des protéasomes bloquant la progression du cycle en empêchant ainsi l'activation de CDK2 par Cdc25 (Kastan et Bartek, 2004).

1.3 Les protéines kinases hétérodimériques

Les protéines kinases hétérodimériques contrôlent l'activité et l'expression d'une multitude de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN et la mitose. Ces kinases sont constituées d'une sous-unité régulatrice, une cycline, et d'une sous-unité catalytique, une CDK. Chaque CDK peut s'associer à différentes cyclines, et cela définit les protéines qui seront phosphorylées par le complexe (Morgan, 1997; Vermeulen *et al.*, 2003). Le cycle cellulaire ne peut se dérouler normalement que si les cyclines et les CDK sont présentes au bon moment. Les niveaux de CDK restent constants à travers le cycle cellulaire tandis que l'expression des cyclines varie périodiquement selon la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle de sorte que chaque cycline dispose d'un modèle d'expression unique lors du cycle cellulaire (Coqueret, 2002). L'activité du complexe cycline-CDK est régulée par différents événements tels que la formation du complexe, des modifications post-traductionnelles et l'association du complexe aux protéines inhibitrices (Morgan, 1997; Schafer, 1998; Vermeulen *et al.*, 2003).

1.3.1 Les cyclines

Les cyclines sont une famille de protéines diverses dont la taille varie entre 35 et 90 kDa. La principale homologie de séquence tend vers une région d'une centaine de résidus formant le site nécessaire pour la liaison et l'activation des CDK, la boîte cycline (*cyclin box*). Leur niveau d'expression varie selon la phase du cycle tandis que leur localisation dépend des propriétés intrinsèques de chaque cycline (Morgan, 1997). Les cyclines sont constituées deux domaines α , chacun contenant cinq hélices, elles-mêmes formées d'une séquence répétée de 90 acides aminés. Le premier domaine correspond à la boîte cycline et le deuxième ne semble pas contribuer aux interactions entre la cycline et la CDK (Pines, 1997; Kim *et al.*, 1996).

Jusqu'à présent dix cyclines ont été caractérisées, six sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (A, B, D, E, F et J) et quatre dans la régulation de la

transcription (C, H, K et T) (Johnson et Walker, 1999; Vermeulen *et al.*, 2003). L'expression des cyclines D dépend de la présence de signaux extracellulaires et des voies de signalisation internes faisant d'eux le lien fondamental entre les signaux mitogènes et la machinerie cellulaire. L'expression des cyclines E, A et B est indépendante des facteurs extracellulaire, elle est plutôt régulée à un niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel (Coqueret, 2002). Les principales cyclines impliquées dans le cycle cellulaire peuvent être subdivisées en deux sous-groupes, les cyclines dites G1 (D et E) et mitotiques (A et B) (Morgan, 1997). La structure varie entre chacun de ces deux sous-groupes, plus spécifiquement au niveau de la boîte cycline et de la neutralisation de la forme active. La boîte cycline est retrouvée à l'extrémité N-terminale pour les cyclines G1, alors qu'elle se retrouve à l'extrémité C-terminale pour les cyclines mitotiques. Les cyclines G1 sont éliminées rapidement via une séquence PEST (proline, acide glutamique, sérine et thréonine) localisée en aval de la boîte cycline (Koff *et al.*, 1991). Les cyclines mitotiques sont plutôt éliminées par dégradation ubiquitine-dépendante par une boîte de destruction en N-terminal (Arellano et Moreno, 1997; Glotzer *et al.*, 1991; Morgan, 1997).

1.3.2 Les cyclines D

Il existe trois cyclines de types D (D1, D2 et D3) qui sont codées par les gènes CCND1 (chromosome 7), CCND2 (chromosome 6) et CCND3 (chromosome 17) chez la souris. La transcription de ces gènes est liée à la présence de facteurs mitogènes. Les cyclines D contrôlent l'entrée et la progression de la cellule en phase G1. La cycline D1 est exprimée dans la majorité des tissus humains à l'exception des lignées lymphoïdes (Ajchenbaum *et al.*, 1993). Les cyclines D2 et D3 sont plutôt exprimées dans les cellules hématopoïétiques (Ajchenbaum *et al.*, 1993).

Le taux d'expression des cyclines varie selon la phase du cycle cellulaire, indiquant des rôles différents. Chaque cycline de type D dispose d'un profil d'expression unique ainsi que des fonctions distinctes. La cycline D1 est exprimée au début de la phase G1, la cycline

D2 y est exprimée plus tardivement, et la cycline D3 est exprimée en phase S (Lukas *et al.*, 1995). Les fonctions de ces cyclines ont été déterminées par l'étude de souris *knock out*. Les souris déficientes en cycline D1 souffrent d'un développement neurologique anormal et d'une hypoplasie de la rétine et des glandes mammaires (Sherr et Roberts, 2004). Les souris déficientes en cycline D2 présentent un développement cérébral postnatal anormal, une détérioration de la prolifération des lymphocytes B périphériques, des troubles de développement des cellules de granulome ovarien ou une hypoplasie des testicules (Sherr et Roberts, 2004). Les souris déficientes en cycline D3 présentent une hypoplasie du thymus associée à une perte de la maturation des cellules T des doubles négatifs (CD4⁻, CD8⁻) jusqu'aux doubles positifs (CD4⁺, CD8⁺). Cette anomalie serait due à un défaut indépendant des cytokines dans le signalment pré-TCR (Sherr et Roberts, 2004). L'étude de souris où les trois gènes de cycline D ont été inactivés indique qu'elles sont nécessaires pour le bon développement de l'individu. Les sujets souffrent d'une sévère déficience hématopoïétique affectant les cellules souches et multinuclées tant dans leurs fonctions prolifératrices que dans leur nombre. Les sujets meurent après 16.5 jours d'une sévère anémie et de troubles dans le développement cardiaque (Sherr et Roberts, 2004).

Des études ont montré que les cyclines D pourraient agir comme régulateur transcriptionnel. Cette fonction a déjà été confirmée pour la cycline D1 et laisse présager des fonctions secondaires pour les cyclines D2 et D3 (Coqueret, 2002). La cycline D1 a la capacité d'interagir avec des histones acétylases (P/CAF), des coactivateurs de la famille p160 (GRIP-1, AIB-1/NcoA3 et NcoA1/SRC1) et des composantes de la machinerie transcriptionnelle tel que TAF_{II}250 (Coqueret, 2002).

1.3.3 Expression oncogénique des cyclines D

Les protéines régulatrices du cycle cellulaire, dont les cyclines, sont fréquemment surexprimées dans les cellules cancéreuses. Parmi toutes les cyclines, les cyclines D sont

celles qui se retrouvent le plus souvent surexprimées. Il en résulte un raccourcissement de la phase G1, et une diminution de la taille des cellules et de la dépendance aux facteurs mitogènes (Sherr, 1995).

La cycline D1 est surexprimée dans plusieurs tumeurs suite à une amplification ou une translocation affectant le locus du gène humain (CCND2, 11q13). La cycline D1 a été détectée dans plusieurs tumeurs : adénome parathyroïdien, lymphomes du manteau des cellules B, carcinomes des cellules squameuses de la tête et du cou, carcinome œsophagien, cancer de la vessie, cancer du sein, cancer des petites cellules pulmonaires, adénocarcinome du colon et carcinomes hépatocellulaires (Coqueret, 2002; Sherr, 1996).

Une forme tronquée de la cycline D1, cycline D1b, a été détectée dans des lignées cellulaires dérivées du cancer du sein, des cellules de carcinome œsophagien, de lignées cellulaires dérivées de cancers œsophagiens et des cellules de cancer de la prostate (Lebwohl *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 2003; Patronetto *et al.*, 2009). Le transcrite de D1b varie entre 1,1 et 1,3 kb contrairement au transcrite normal de 4,2 kb. (Lebwohl *et al.*, 1994). La cycline D1 normale est constituée de 5 exons alors que la cycline D1b est caractérisée par la rétention du quatrième intron et l'apparition d'un codon stop prématuré (Patronetto *et al.*, 2009). La cycline D1b conserve sa capacité à migrer au noyau, de se lier et activer le CDK4. Toutefois la boîte PEST et le résidu Thr286 est manquant, empêchant sa phosphorylation par la kinase GSK3 β . Cette phosphorylation est nécessaire au ciblage de la protéine pour l'export nucléaire par l'exportine CRM-1 (Lu *et al.*, 2003). Dans le noyau de cellules vivantes deux groupes distincts de cycline D1b ont été observés. Le premier groupe, 2/3 des cyclines, se comporte comme la protéine normale, c'est-à-dire immobile dans le noyau jusqu'à son export nucléaire. Le second groupe, l'autre 1/3 des cyclines, dispose d'une forte mobilité nucléaire, principalement durant la phase S, suggérant une implication dans la régulation cellulaire différent de la D1 normale (Knudsen, 2006). Des études plus poussées dans des cellules de cancer de la prostate ont démontré une corrélation positive entre une protéine liant l'ARN, Sam68, fréquemment surexprimée dans les cellules du cancer de la prostate et la cycline D1b.

La protéine Sam68 est recrutée sur le gène CCND1 et se lie à l'ARNm de la cycline D1. Sam68 affecte directement l'épissage alternatif de l'ARNm avec une préférence pour l'allèle A870 connu pour favoriser l'apparition de la cycline D1b (Patronetto *et al.*, 2009).

La cycline D2 serait impliquée dans le cancer gastrique (Takano *et al.*, 1999). La progression du cancer serait liée à une surexpression de la cycline D2 et de CDK4 (Takano *et al.*, 2000). La cycline D2 est localisée dans le noyau en phase G1 et elle se retrouve à la fois dans le noyau et le cytoplasme lors de la transition G1/S. Il a été suggéré que cette double localisation jouerait un rôle dans le processus d'immortalisation (Takano *et al.*, 2000). Chez le rat, le gène de la cycline D2 est la cible du rétrovirus RadLV/VL3 qui s'intègre au locus *Vin-1*. (Tremblay *et al.* 1992, Hanna *et al.* 1993). Le locus *Vin-1* contient un site commun d'intégration proviral à l'extrémité 5' dans une orientation transcriptionnelle inversée. L'insertion de RadLV/VL3 dans le locus *Vin-1* a été répertoriée dans des leucémies de type T (Hanna *et al.*, 1993).

La cycline D3 est retrouvée dans pratiquement toutes les cellules en prolifération et comme les cyclines D1 et D2, elle a été détectée dans plusieurs tumeurs. La cycline D3 jouerait un rôle important dans les lymphomes malins où le gène est généralement réarrangé. L'absence de cycline D3 bloquerait le caractère malin de certaines tumeurs, faisant de ce gène une cible thérapeutique contre certains cancers (Sicinska *et al.*, 2003). Il a été démontré dans des cellules tumorales thyroïdiennes que la surexpression de la cycline D3 contribuerait à la rétention dans le cytoplasme de l'inhibiteur de croissance p27 empêchant son action sur les complexes actifs au noyau (Baldassarre *et al.*, 1999).

1.3.4 La cycline D2 tronquée

La recherche de nouveaux sites communs d'intégration du rétrovirus murin Graffi a permis la découverte de la cycline D2 tronquée. Le site d'intégration nommé Gris 1 a été localisé sur le chromosome 6, entre 75 et 85 kpb en amont du gène de la cycline D2. L'intégration en Gris 1 a été répertoriée dans 13% des leucémies induites par le rétrovirus murin Graffi (4/30 des tumeurs étudiées). L'insertion rétrovirale au site Gris1 engendre la surexpression du gène de la cycline D2 en un ARN messenger de 6,5 kb et l'apparition d'un nouvel ARN messenger de 1,1 kb qui est le résultat d'un épissage alternatif du messenger de 6,5 kb. Cet isoforme a été répertorié dans le cerveau, les ovaires ainsi que dans des leucémies (Denicourt *et al.*, 2003).

La cycline D2 tronquée est une protéine de 156 acides aminés. Elle diffère de la forme normale à cause de l'utilisation d'un site donneur d'épissage alternatif localisé dans le second intron. Il en résulte un exon 2 allongé ainsi que l'apparition d'un codon d'arrêt prématuré au 157^e acide aminé (figure 1.1A). Par rapport à la cycline D2 normale, 133 acides aminés sont manquants dont les 21 derniers de la boîte cycline (Denicourt *et al.*, 2003). Les 20 acides aminés terminaux de la D2 Trc diffèrent de la D2 à l'exception des résidus L143, L146, P155 et H156 (figure 1.1B). Malgré que la boîte cycline soit incomplète, des interactions avec les CDK4/6 sont toujours possibles mais le taux de phosphorylation de pRb est très faible. Un test de localisation cellulaire dans des fibroblastes embryonnaires de souris avec la D2 Trc marquée à l'EGFP a démontré que cet isoforme est cytosolique contrairement à la D2 qui est nucléaire. Cette différence serait possiblement due à l'altération du résidu thréonine en position 154 de la cycline D2 (Denicourt *et al.*, 2008; McNabb, 2008). Un test de localisation réalisé dans des cellules de myocarde ventriculaire embryonnaire de souris E14.5 a démontré que la D2 Trc était localisée dans le réticulum endoplasmique, le Golgi ainsi que des compartiments lysosomaux sujets à l'agrégation par des protéines du réticulum endoplasmique associées au stress (Sun *et al.*, 2009).

Des tests de transformation dans des fibroblastes embryonnaires de souris ont démontré que la D2Trc détient un pouvoir oncogène supérieur à la D2. Tout comme pour la D2, la D2Trc est un proto-oncogène immortalisant. Les cellules surexprimant la forme tronquée sont caractérisées par un nombre élevé de noyaux et une perte de l'inhibition de contact (Denicourt *et al.*, 2008. et McNabb, 2008). Dans des cardiomyocytes en développement, l'expression de la D2Trc serait liée à une forte baisse de l'activité du cycle cellulaire. La D2Trc séquestrerait des protéines du cycle cellulaire et entraînerait leur destruction, diminuant fortement l'activité du cycle cellulaire. Une surexpression des cyclines de type B et D permet le retour à une activité normale du cycle cellulaire des cardiomyocytes (Sun *et al.*, 2009).

1.3.5 Les CDK

Les CDK sont des protéines à activité sérine-thréonine kinase synthétisées sous une forme monomérique inactive. Elles s'associent aux cyclines afin d'initier et contrôler la progression du cycle cellulaire. Jusqu'à présent, une dizaine de CDK ont été répertoriées chez l'humain. De ce nombre, 5 sont actives pendant le cycle cellulaire : en phase G1 les CDK4, CDK6 et CDK2, en phase S la CDK2, lors des phases G2 et M la CDK1 (Vermeulen *et al.*, 2003). La CDK5 s'associe avec p35 dans la différenciation neuronale et le complexe CDK7-cycline H-MAT1 forme la *cyclin-dependent activating-kinase kinase* (CAK), impliqué dans l'activation des complexes cycline-CDK (Morgan, 1997; Lolli et Johnson, 2005). Les CDK 4/6 sont associées aux cyclines D pour la progression de la phase G1 (Sherr, 1993). La CDK2 peut s'associer soit à la cycline E pour la transition G1/S ou à la cycline A lors des phases S et G2 (Ohtsubo *et al.*, 1995; Girard *et al.*, 1991). Finalement la CDK1 s'associe avec la cycline B pour la phase M (Arellano et Moreno 1997; Vermeulen *et al.*, 2003).

Au niveau structural, les CDK sont constituées de deux lobes, N et C. Le lobe N est composé de feuilletés beta et contient une hélice PSTAIRE. Le lobe C est composé d'hélices alpha et contient la boucle T (*T-loop*) sur l'hélice L12. À l'intersection de ces lobes se trouve

le site catalytique où se produit l'activation des protéines impliquées dans le cycle cellulaire. À l'état inactif, l'entrée du site catalytique est bloquée par les deux boucles de la protéine : l'hélice PSTAIRE et la boucle T. Lors de l'association avec la cycline, l'hélice PSTAIRE subit une rotation permettant l'accès de l'ATP à la boucle catalytique et la boucle T est déplacée exposant les résidus Thr-161, Thr-14 et Tyr-15 pour une activation par la CAK (Morgan, 1997; Pavletich, 1999).

L'activité des CDK est régulée par 4 mécanismes majeurs; la liaison à la cycline, la phosphorylation d'un résidu thréonine spécifique par la CAK, l'inactivation par les inhibiteurs de CDK (CKI) et la phosphorylation inhibitrice sur des sites à proximité de l'extrémité N-terminale de la sous-unité du CDK (Morgan, 1995; Morgan, 1997 ; Vermeulen *et al.*, 2003).

1.4 Progression du cycle cellulaire

La phase G1 est particulièrement régulée afin d'obtenir une bonne coordination entre la division normale de la cellule et la croissance cellulaire. La présence de facteurs mitogènes induit la production des cyclines de type D dans des cellules. Les cyclines de type D s'associent avec les CDK4/6 pour phosphoryler leur substrat primaire, la protéine du rétinoblastome (pRb), une protéine qui agit comme suppresseur de tumeur. La phosphorylation de pRb libère le facteur de transcription de la famille E2F. Le facteur E2F migre au noyau et induit la transcription de plusieurs gènes accessoires pour la réplication dont les cyclines E et A ainsi que E2F lui-même. La cycline E s'associe avec la CDK2 pour effectuer la transition G1/S. Le complexe cycline E-CDK2 maintient pRb dans un état hyperphosphorylé, permettant une accumulation du facteur E2F. Le complexe cycline E - CDK2 phosphoryle également les histones H1, ce qui semble jouer un rôle dans le réarrangement de la chromatine lors de la réplication du génome (Obaya et Sedivy, 2002; Sherr et Roberts, 2004).

Durant la phase G1/S, plusieurs molécules inhibitrices de CDK, les CKI, du groupe Kip (p27^{KIP1}, p57^{KIP2} et p21^{CIP1}) empêchent la progression du cycle. Les inhibiteurs p27^{KIP1} et p57^{KIP2} sont phosphorylés dans leur domaine QT et p21^{CIP1} est phosphorylé sur la sérine 130 par le complexe CDK2-cycline E. Cette phosphorylation les cible pour la polyubiquitination par le complexe SCF. Une fois l'inhibition levée, la phosphatase Cdc25A se fixe au complexe cycline A-CDK2 et permet l'activation du complexe en déphosphorylant le résidu Tyr-15 de CDK2 (Goldstone *et al.*, 2001). Une fois le complexe cycline A-CDK2 activé, il se lie au facteur de transcription PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) qui est requis pour l'activité de la ADN polymérase δ (Johnson et Walker, 1999). Les complexes cycline A-CDK2 induisent également la phosphorylation de certains facteurs d'initiation, empêchant la formation de nouveaux complexes de pré-réplication tant que le cycle n'a pas été complété. Cette phosphorylation assure que l'ADN ne sera répliqué qu'une fois par cycle (Erlandsson *et al.*, 2000). Les facteurs de transcription E2F-1, E2F-2 et E2F-3 contiennent un domaine de liaison directe avec la cycline A. Ceci permet au complexe cycline A-CDK2 de phosphoryler le partenaire d'hétérodimérisation d'E2F, DP1, entraînant l'inactivation d'E2F et la sortie de la phase S (Johnson et Walker, 1999; Morgan, 1997).

Les niveaux d'expression des cyclines A et B augmentent lors des phases S/G2 pour atteindre un pic en mitose. L'entrée en mitose (phase M) est régulée par les complexes cycline B-CDK1. Lorsque la phosphatase Cdc25c est stimulée, elle déphosphoryle les résidus Tyr-14 et Tyr-15 de CDK1 permettant l'activation du complexe (Wells *et al.*, 1999). Ce complexe forme le *M-phase promoting factor* (MPF) responsable de l'entrée en phase M en phosphorylant plusieurs protéines clés dans les étapes de cette phase : en prophase dans la condensation des chromosomes elle cible le noyau des condensines et les histones (H1 et H3) (Hirano *et al.*, 1997), et induit la dépolarisation et la rupture de l'enveloppe nucléaire en prométaphase en agissant au niveau des lamines nucléaires (Peter *et al.*, 1990). Le MPF est également impliqué dans l'assemblage du fuseau mitotique et la séparation des centrosomes en agissant sur des protéines associées aux microtubules (Nigg, 2001).

La dégradation de la cycline A débute lors de la prométaphase et se termine en métaphase. La protéine CDH1 n'est plus phosphorylée par le complexe cycline A-CDK1 et

peut se lier à l'*anaphase promoting complex* (APC) et le rendre actif (Lukas *et al.*, 1999). Durant l'anaphase, la dégradation de la cycline B s'effectue par protéolyse ubiquitine dépendante par l'APC qui reconnaît la boîte de destruction en N-terminal. La polyubiquitinylation est nécessaire pour l'inactivation du complexe cycline B-CDK1 ainsi qu'à son élimination. Ceci induit la sortie de la mitose (Glotzer *et al.*, 1991).

1.5 La régulation de l'expression des cyclines D

L'abondance des cyclines D est largement contrôlée par le taux de transcription du gène. Cette transcription est régulée par plusieurs facteurs de transcription qui sont induits en réponse aux signaux extra-cellulaires, aux voies de signalisation oncogéniques ou aux variations physiologiques d'autres protéines cellulaires. Contrairement aux autres cyclines dont l'expression fluctue tout au long du cycle cellulaire, le niveau des cyclines D est régulé par l'environnement extracellulaire (Sherr et Roberts, 1999).

Les cyclines D sont les facteurs limitants qui contrôlent la progression du cycle cellulaire. En phase G1, l'expression des cyclines D est régulée par la voie de signalisation RAS/RAF/MAPK en présence de signaux provenant des facteurs de croissance (Matsushime *et al.*, 1991), par l'adhésion cellulaire à la matrice extra-cellulaire (Aktas *et al.*, 1997; Assoian, 1997; Schwarts et Assoian, 2001) et par l'intégrité du cytosquelette (Huang *et al.*, 1998).

La liaison des facteurs de croissance aux récepteurs à activité tyrosine kinase initie la voie de signalisation et, de concert avec les signaux transmis grâce à l'adhésion cellulaire, vont induire la synthèse des cyclines D. Durant la phase G1, la présence de facteurs de croissance est essentielle afin qu'il y ait accumulation des cyclines D. L'accumulation des cyclines D nécessite l'inhibition de la GSK3 β (Glycogène Synthase Kinase 3 β) par la PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) dont l'activité dépend des signaux mitogènes (Alt *et al.*,

2002; Diehl *et al.*, 1998). La GSK3 β est responsable de l'activation de la protéine de suppression de tumeur PTEN, une phosphatase lipidique, impliquée dans la régulation de la transition de la phase G1 à la phase S en influençant l'expression, la stabilité et la localisation subcellulaire des cyclines D (Radu *et al.*, 2003; Diao et Chen, 2007; Huang *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2001). De plus, la formation du complexe cycline D-CDK4/6 est mitogène-dépendante, l'absence de ces signaux empêche les cyclines D de s'assembler efficacement aux CDKs lorsqu'elles sont exprimées de façon ectopique (Cheng *et al.*, 1998; Matsushime *et al.*, 1994). Le mécanisme d'induction des cyclines D force la cellule à rencontrer toutes les conditions requises pour s'engager dans un nouveau cycle cellulaire. Ceci permet aux cellules une bonne transition de la phase mitogène dépendante à la phase mitogène indépendante en phase G1 une fois le point de restriction (point R) dépassé.

La régulation transcriptionnelle des gènes de la cycline de type D est un processus complexe qui implique un grand nombre de protéines. La région promotrice du gène *CCND* contient plusieurs éléments *cis* régulateurs. On y retrouve les sites de liaison pour un ensemble de facteurs de transcription dont Ap1, STAT, Sp1, NF κ B et ATF/CREB (Bromberg *et al.*, 1999; Guttridge *et al.*, 1999; Hinz *et al.*, 1999; Joyce *et al.*, 1997; Leslie *et al.*, 2006; McNabb, 2008; Martino *et al.*, 2001; Matsumura *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1996).

1.6 La régulation des complexes cycline-CDK

1.6.1 Les cyclin-dependent activating-kinase kinase (CAK)

L'association entre la cycline et sa CDK n'engendre pas automatiquement la forme active du complexe. Le complexe doit être phosphorylé par une *cyclin-dependent activating-kinase kinase* (CAK). La CAK est un complexe enzymatique formé de la cycline H, la CDK7 et la protéine MAT1 (Morgan, 1997; Lolli et Johnson, 2005). Suite à la liaison, l'hélice PSTAIRE entre dans la boucle catalytique et effectue une rotation de 90°, le résidu Glu-51 de l'hélice PSTAIRE s'associe aux résidus Lys-33 et Asp-145 ainsi qu'à un ion magnésium. La

nouvelle conformation de l'hélice PSTAIRE altère la structure et la position de la boucle T de 20Å libérant l'entrée de la boucle catalytique, permettant ainsi l'entrée d'ATP dans la boucle (Morgan, 1997; Pavletich, 1999).

Deux sites de phosphorylation particulièrement importants sont connus pour la CAK, la Ser-164 et la Thr-170. La CDK7 s'active elle-même en autophosphorylant le résidu Thr-170 dans le segment d'activation. En absence de cette phosphorylation, la protéine MAT1 peut venir la substituer pour activer la CAK. La seconde phosphorylation, sur la Ser-164, permet la liaison à la cycline H. La CAK active respectivement les CDK1, CDK2 et CDK4/6 en phosphorylant les résidus Thr-160, Thr-161 et Thr-172. La phosphorylation par les CAK est stimulée par l'association entre les diverses cyclines et leur CDK. La CAK ne phosphoryle que faiblement ou pas du tout les CDK monomériques (Lolli et Johnson, 2005).

La CAK fait également partie du facteur de transcription TFIIH avec 6 autres petites sous-unités. Dans ce complexe, la CAK phosphoryle la grande sous-unité du domaine C-terminal de la ARN polymérase II. Cette phosphorylation est nécessaire pour libérer le complexe de la boîte TATA et favoriser la progression de la transcription du stade de pré-initiation jusqu'à l'initiation (Lolli et Johnson, 2005; Morgan, 1997).

1.6.2 Les CKI

Les complexes cycline-CDK ne sont pas toujours actifs, leur activité peut être réduite ou inhibée par des inhibiteurs (CKI). Les CKI sont divisés en deux grandes classes : les Cip/Kip qui peuvent lier une multitude de complexes cycline/CDK dont les CDK4/6 et la classe des INK4 qui inhibent spécifiquement les complexes des CDK4/6 (Morgan, 1997).

1.6.2.1 Les Cip/Kip

La famille des Cip/Kip est constituée de 3 membres : p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}. Les Cip/Kip sont dotés d'un domaine de liaison aux CDK en N-terminal, un signal de localisation nucléaire (NLS) et un domaine de liaison à PCNA en C-terminal. Les Cip/Kip peuvent s'associer avec les cyclines D, E et A ainsi qu'aux complexes déjà formés sans qu'il y ait dissociation du complexe. Ils ont initialement été caractérisés comme inhibiteurs du cycle cellulaire mais avec le temps une variété d'autres fonctions cellulaires leur ont été attribuées.

Les Cip/Kip contiennent deux hélices. La première interagit avec la cycline et la seconde avec la boucle catalytique du CDK bloquant l'entrée de l'ATP. Cette liaison des Cip/Kip inactive les complexes cycline A et E-CDK2 (Lee, 2009). Le retrait des facteurs mitogènes induit une baisse des cyclines de type D, donc une augmentation des Cip/Kip en circulation. Ces Cip/Kip iront se fixer aux complexes cycline E/A-CDK2, arrêtant la progression du cycle cellulaire (Lee, 2009). Dans le cas des complexes cycline D-CDK4/6, p21^{Cip1} et p27^{Kip1} facilitent l'assemblage des deux sous-unités. Le NLS de p21^{Cip1}/p27^{Kip1} serait responsable de l'accumulation des cyclines D dans le noyau via la protéine associée aux pores nucléaires mNPAP60 étant donné que les cyclines D ne contiennent pas de séquence consensus de localisation nucléaire (LaBaer *et al.*, 1997; Lee, 2009). Il a également été démontré que p21^{Cip1}/p27^{Kip1} bloquent l'export nucléaire des complexes cycline D-CDK. Ils empêchent les interactions entre l'exportine CRM-1 et la cycline D. Ceci entraîne une accumulation de cycline D au noyau favorisant la progression du cycle (Alt *et al.*, 2002; Lee, 2009). En résumé, ils stimulent l'activation des complexes cycline D-CDK4/6 de deux façons, en dirigeant le complexe hétérodimérique au noyau et en augmentant la stabilité des cyclines D (Sherr et Roberts, 1999 ; Johnson et Walker, 1999).

Le membre des Cip/Kip le plus connu est p21^{Cip1}, principalement pour ses interactions avec CDK2 et PCNA. La protéine PCNA est un facteur d'élongation de la polymérase δ ainsi qu'un composant de la machinerie de réparation de l'ADN. Le promoteur du gène p21^{Cip1} contient un site de liaison à p53. En réponse à des dommages à l'ADN, p53 induit la production de p21^{Cip1} qui se lie à PCNA et bloque ses fonctions réplcatives mais

n'affecte pas le rôle dans la réparation de l'ADN (Johnson et Walker, 1999). La protéine p27^{kip1} est impliquée dans la médiation de plusieurs signaux inhibiteurs de croissance dont le TGF- β et de l'inhibition de contact (Johnson et Walker, 1999).

1.6.2.2 Les INK4

La classe des INK4 est composée des protéines p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d}. Cette famille de protéines est connue pour inhiber la formation des complexes cycline D-CDK4/6 mais peuvent également inactiver les complexes déjà assemblés (Johnson et Walker, 1999). Les protéines de la famille INK4 contiennent 4 répétitions ankyrine nécessaires à l'activité des protéines. Ce motif consiste en des paires d'hélices α antiparallèles superposées reliées par un motif en épingle à cheveux (*hairpin*). Ces domaines structuraux se lient à la région non-catalytique des CDK4/6, soit la région opposée au site de liaison des cyclines D, ce qui induit un changement de conformation des CDK4/6 avec un pivot de 15° des deux lobes structuraux de la kinase. Ceci altère le site de liaison aux cyclines D et réduit son affinité pour l'ATP (Pavletich, 1999).

1.6.3 Inactivation des CDK par phosphorylation

La majorité des CDK impliquées dans le cycle cellulaire peut être inhibée par des phosphorylations, entre autres, sur les résidus Thr-14 et Tyr-15 (Beijersbergen et Bernards, 1996; Morgan, 1995). Les protéines kinase Wee1, Mik1 et Myt1 sont responsables de la phosphorylation sur ces deux résidus dès l'entrée du complexe cycline-CDK dans le noyau. Cette phosphorylation protège le noyau face à une exposition prématurée à des kinases mitotiques actives (Morgan, 1995; Schafer, 1998). Dans la CDK1, ces résidus sont situés dans la boucle riche en glycine qui forme la partie supérieure du site de liaison à ATP. La phosphorylation induirait une modification de l'orientation des résidus dans le site catalytique entraînant l'inactivation du complexe. Le complexe cycline B-CDK1 est phosphorylé sur ces

deux acides aminés lors des phases G1, S et G2. Lorsque la cellule débute la transition en phase M (G2/M), ces résidus sont déphosphorylés par des phosphatases de la famille Cdc25 et le complexe peut par la suite être activé (Morgan, 1997). Chez la CDK4, la phosphorylation a été très peu étudiée. Il est toutefois connu que la phosphorylation du résidu Tyr-17 entraîne l'inactivation du complexe suite à l'exposition aux rayons ultraviolet, un arrêt de croissance ou en réponse au TGF- β (Bockstaele *et al.*, 2006).

1.7 Protéines du rétinoblastome

La famille de protéines du rétinoblastome sont des protéines de poche (*pocket protein*). Les principaux membres sont pRb (p105RB), p107 et p130. Ces protéines contrôlent le processus de croissance cellulaire dans une multitude de types cellulaires via des interactions avec des protéines qui régulent l'expression des gènes à plusieurs niveaux. Elles ont pour fonction commune de séquestrer les facteurs de transcription de la famille E2F qui sont nécessaires pour la transition G1/S. Les complexes de cycline D ciblent pRb alors que les complexes cycline A et E ciblent plutôt p107 et p130 (Beijersbergen et Bernards, 1996). La liaison entre les complexes cycline D et pRb est médiée via un motif LXCXE situé à l'extrémité N-terminale de la cycline. Ce motif est nécessaire pour la phosphorylation de pRb par le complexe cycline D2-CDK4/6 (Grana *et al.*, 1998).

La protéine pRb agit sur le cycle cellulaire à deux niveaux. Tout d'abord en séquestrant E2F, pRb empêche la formation du complexe de pré-initialisation constitué de E2F, TFIID et TFIIA. Deuxièmement, elle réprime la transcription des promoteurs sensibles au facteur de transcription E2F via le recrutement d'histones déacétylases (HDAC), du complexe de remodelage Swi/Snf et d'histone méthylases. Ceci entraîne une altération de la structure de la chromatine qui maintient la répression des gènes de la phase S au début de la phase G1 jusqu'à la transition G1/S lorsque pRb est phosphorylé par les complexes CDK4/6-cycline D (Coqueret, 2002).

Lors de la phase G1, pRb est présent dans un état hypophosphorylé, il forme alors un complexe avec le facteur E2F empêchant ainsi sa migration au noyau. Une fois la cellule stimulée par des facteurs mitogènes, il y a formation de complexes cycline D-CDK4/6 qui phosphorylent pRb permettant la libération du facteur de transcription E2F et un changement de structure de la chromatine permettant la transcription des gènes. En migrant au noyau, E2F s'associe avec deux composants essentiels de la machinerie transcriptionnelle, TFIIID et TFIIA, pour former un complexe de pré-initialisation dont le résultat sera la transcription d'une multitude de gènes dont la cycline E qui forment des complexes avec CDK2. Ces nouveaux complexes phosphorylent p107 et p130 ce qui permet une plus grande libération de E2F (Coqueret, 2002). Ce mécanisme permet à la cellule de passer le point de restriction pour se diriger vers la réplication de son ADN (Grana *et al.*, 1998; Beijersbergen et Bernards, 1996).

1.8 Facteurs de transcription de la famille E2F

Les facteurs de transcription de la famille E2F jouent un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire chez les mammifères et les plantes. Ces protéines contrôlent et coordonnent la transcription d'une multitude de cibles dont des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et de la progression du cycle cellulaire (Bernards, 1997 ; Cobrinik, 2005 ; Trimarchi et Lees, 2002). Une analyse cristallographique aux rayons X a montré que les membres de la famille E2F disposent d'une structure ressemblant à un motif de liaison à l'ADN de type aile-hélice (*winged-helix*) (Zheng *et al.*, 1999). Il existe 8 gènes E2F différents codant pour 9 protéines (Cobrinik, 2005; Iaquina et Lees, 2007). Ces protéines ont été divisées en 2 classes, activateurs et répresseurs, selon leurs fonctions et leur structure. L'expression des activateurs est cyclique avec un pic d'expression durant la phase G1/S tandis que le niveau d'expression des répresseurs est constant tout au long du cycle. La progression du cycle cellulaire est déterminée par la balance entre les activateurs et les répresseurs, lorsque les activateurs sont en déclin les répresseurs deviennent actifs et inhibent l'activité des gènes cibles (Iaquina et Lees, 2007).

Les activateurs sont constitués des protéines E2F-1, E2F-2 et E2F-3a. Elles ont la capacité de fortement activer la transcription lorsque surexprimées et la localisation de E2F au promoteur des gènes cibles coïncide avec leur activation transcriptionnelle dans la phase G1/S (Cobrinik, 2005; Iaquina et Lees, 2007 ; Trimarchi *et al.*, 2002). Tous les E2F activateurs disposent d'un domaine d'hétérodimérisation DP1,2 permettant la liaison avec les protéines DP1 et DP2. Cette association fournit un autre site de liaison à l'ADN, augmentant la stabilité de liaison d'E2F sur l'ADN. Leur activité transcriptionnelle est régulée via des interactions avec la protéine de poche pRb (Trimarchi *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 1999). Ces complexes pRb-E2F inhibent l'activité transcriptionnelle en masquant les résidus clé dans le domaine d'activation transcriptionnel et en recrutant des complexes corépresseurs aux promoteurs E2F-réactifs. Lors de la transition G1/S, les complexes cycline D-CDK4/6 et cycline E-CDK2 phosphorylent pRb et induit sa dissociation du facteur E2F. Ce facteur E2F peut alors migrer au noyau grâce à son NLS et induire l'expression d'une multitude de gènes.

Les répresseurs sont constitués des protéines E2F-3b, E2F-4, E2F-5, E2F-6, E2F-7 et E2F8. La liaison à leur protéine cible coïncide avec leur répression en phase G0/G1 et leur surexpression entraîne une faible activation de la transcription malgré le fait que les répresseurs disposent d'un domaine d'activation transcriptionnel homologue aux E2F activateurs (Cobrinik, 2005; Iaquina et Lees, 2007). La protéine E2F-3b est un second produit du locus *E2f3* dont la séquence est identique à la protéine E2F-3a à l'exception de l'absence du domaine N-terminal caractéristique des activateurs (Iaquina et Lees, 2007). Les membres E2F-3b, E2F-4, E2-5 et E2F-6 disposent d'un domaine d'hétérodimérisation DP 1,2 au même titre que les activateurs. L'activité transcriptionnelle des protéines E2F-3b, E2F-4, E2F-5 et E2F-6 est également régulée via des interactions avec des protéines de poche (pRb, p107 et p130). Les protéines E2F-6, E2F-7 et E2F-8 ne disposent pas de séquences permettant la liaison aux protéines de poche, elles réussissent toutefois à réprimer la transcription via d'autres mécanismes (Iaquina et Lees, 2007). Les protéines E2F-3b, E2F-4 et E2F-5 sont exprimées dans les cellules en quiescence et elles s'associent avec des éléments de liaison à E2F sur les promoteurs des gènes E2F-réactifs durant la phase G0 pour réprimer leur expression (Iaquina et Lees, 2007; Trimarchi *et al.*, 2002). La protéine E2F-6 est

impliquée dans la répression des gènes E2F-réactifs dont l'expression diminue à la fin de la phase S. Cette fonction de silencieux d'E2F-6 serait due à la capacité de s'associer avec des répresseurs transcriptionnels, des protéines du groupe Polycomb (Trimarchi *et al.*, 2002). Les protéines E2F-7 et E2F-8 ne possèdent pas de site de liaison DP 1,2 mais interagissent avec l'ADN via une duplication du site de domaine de liaison à l'ADN. Les mécanismes exacts de répression d'E2F-7 et E2F-8 restent à ce jour incompris (Iaquinta et Lees, 2007).

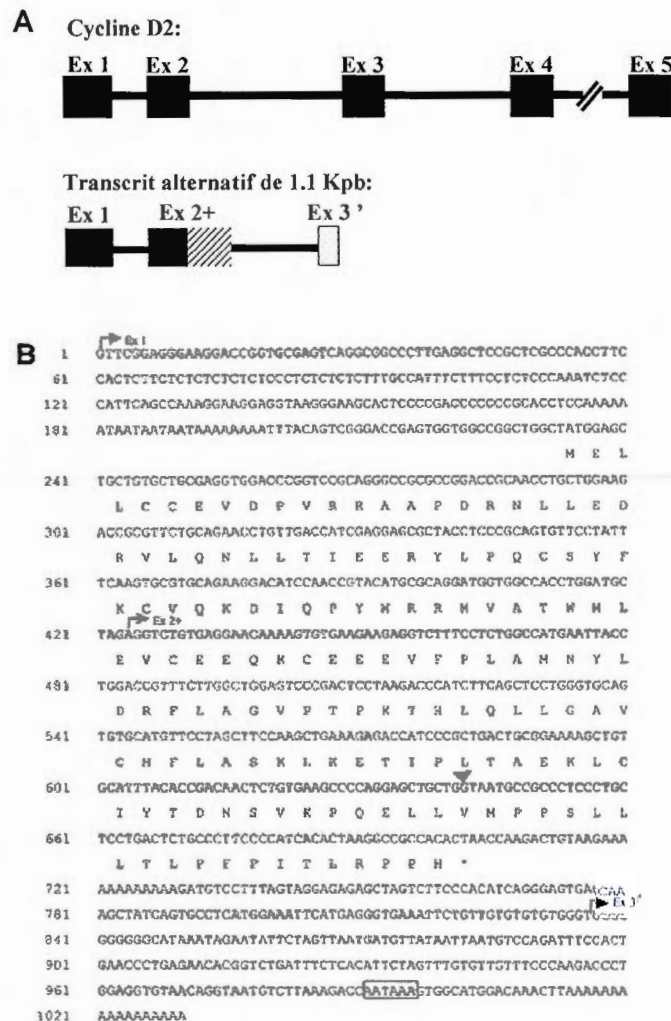


Figure 1.1 : Représentation schématique de l'ADNc de la cycline D2 normale et de la cycline D2 tronquée obtenu après épissage alternatif du gène *CCND2*. (A) Les boîtes foncées représentent les cinq exons (EX 1-5) de la cycline D2 normale. Le transcrit de la cycline D2Trc fait 1.1 Kb et contient les exons 1 et 2 de la D2. Les boîtes rayées et pointillées correspondent aux nouvelles régions engendrées par épissage alternatif. Les nouvelles sections sont constituées d'éléments provenant du 2^{ème} intron du gène. (B) Séquence nucléotidique de l'ADNc de 1.1 Kb, et la séquence en acides aminés déduite. Le point de départ des trois exons est indiqué par une flèche. La tête de flèche indique la fin de l'exon 2 du transcript de 6.5 Kpb. Le signal consensus de polyadénylation est encadré. Figure tirée de l'article de Denicourt *et al.*, 2003.

```

Trc  MELLCCEVDPVRRRAVPDRNLLLEDRLVQLNLLTIEERYLPQCSYFKCVQKDIQPYMRRMVAT 60
D2   MELLCCEVDPVRRRAVPDRNLLLEDRLVQLNLLTIEERYLPQCSYFKCVQKDIQPYMRRMVAT 60

trc  WMLEVCEEQKCEEEVFPLAMNYLDRFLAGVPTPKTHLQLLGAVCMFLASKLKETIPLTAE 120
D2   WMLEVCEEQKCEEEVFPLAMNYLDRFLAGVPTPKTHLQLLGAVCMFLASKLKETIPLTAE 120

Trc  KLCIYTDNSVKPQELLVMPPSILLTLPFPITLRPPH----- 156
D2   KLCIYTDNSVKPQELLEWELVVLGKIKWNLAAVTPHDFIEHILRKLPQQKEKLSLIRKHA 180
                                     ↑

Trc  -----
D2   QTFIALCATDFKFKFAMYPPSMIATGSGVAAICGLQDDEVNLTCDALTELLAKITHTDVD 240

Trc  -----
D2   CLKACQEQIEALLNSLQQFRQEQHNAGSKSVEDPDQATTPTDVRDVDL 289

```

Figure 1.2 : Comparaison de la séquence en acides aminés de l'isoforme tronqué (D2Trc) et de l'isoforme long (D2). Les premiers 136 résidus sont codés par la même séquence et donc communs aux deux formes de la cycline D2 (boîtes foncées). Une flèche indique la fin de la boîte cycline. Les traits représentent les acides aminés manquants. Figure tirée de l'article de Denicourt *et al.*, 2003.

1.9 Hypothèse de travail

Dans le passé, plusieurs études ont montré que l'amplification ou la surexpression des cyclines G1/S (cyclines D1, D2, D3 et E) a joué un rôle important dans le développement de tumeurs telles que des carcinomes des cellules squameuses de la tête et du cou. Les cyclines D sont le lien fondamental entre l'environnement extracellulaire et la machinerie cellulaire. Elles exercent un rôle clé dans la régulation et la transition de la phase G1/S. Leur surexpression est connue pour induire un raccourcissement de la phase G1 et l'apparition d'un phénotype immortel. La cycline D2 tronquée diffère de la cycline D2 normale par sa séquence, sa localisation cellulaire et son caractère immortalisant supérieur. De ce fait, la cycline D2 tronquée s'associe fort probablement avec des protéines différentes de la cycline D2 normale pour engendrer d'autres cascades réactionnelles. Il devient essentiel de répertorier ces nouveaux partenaires d'interaction afin de comprendre les fonctions biologiques de cette protéine, si elle en possède, ainsi que ses effets sur la machinerie cellulaire via ses partenaires d'interaction.

L'objectif principal de cette étude était de déterminer les partenaires d'interaction de la cycline D2 tronquée qui diffèrent de ceux de la cycline D2 normale et d'identifier les voies de signalisation intracellulaires qui se voient ainsi altérées.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Création de clones pour la cycline D2 et la cycline D2 tronquée

Des clones bactériens avec le vecteur pCMV-Myc (Clontech) contenant soit la cycline D2 ou la cycline D2 tronquée en phase avec étiquette Myc en N-terminal avaient déjà été construits par Mme Catherine Denicourt dans le laboratoire du Dr Éric Rassart (Denicourt *et al.*, 2003).

2.2 Lignées cellulaires, conditions de culture et transfections

Les cellules utilisées lors des transfections étaient des fibroblastes de souris NIH/3T3 (ATCC), cultivés dans un milieu Eagle modifié (GIBCO) enrichi de 10% de sérum de veau (GIBCO). L'incubation des cellules a été faite à une température de 37°C avec 5% de CO₂. L'ADN a été transfecté en milieu stérile sous une hotte à flux laminaire en utilisant la trousse Polyfect (QIAGEN) et en suivant le protocole recommandé.

2.3 Protocole de co-immunoprécipitation

Les fibroblastes NIH/3T3 ($1,6 \times 10^6$ cellules/pétri de 100 mm) ont été transfectés par les différentes constructions Myc avec Polyfect (QIAGEN). Après une incubation de 36 heures, les cellules ont été lysées sur glace dans un tampon 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0,5% NP-40, et un cocktail d'inhibiteurs de protéases complet (Roche). Les protéines extraites ont été dosées selon la méthode de Bradford à l'aide de la trousse bio-Rad et suivant le protocole. Environ 800 µg d'extraits protéiques ont été incubés avec la quantité désirée d'un anticorps dirigé contre l'épitope Myc (Invitrogen) pendant 4 heures à 4°C avec agitation. Une fois l'incubation terminée, 100 µl d'une suspension de microbilles de protéine G-sepharose 10% (Sigma-Aldrich) dilués dans du tampon de lyse. L'incubation a été faite

durant toute la nuit à 4°C avec agitation pour s'assurer que les complexes protéiques soient bien liés aux billes. Les billes ont été précipitées par une centrifugation de 5 minutes à 10 000g. Le culot a été lavé à quatre reprises avec un tampon 25 mM Tris-HCl pH 7,4 100 mM NaCl. Initialement, les protéines ont été décrochées dans 30 µl de tampon de chargement 2X (120 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glycérol, 4% SDS, 10% β-mercaptoéthanol et 0,02% de bleu de bromophenol) par élution thermique à 100°C pendant 5 minutes. Suite à la présence de fortes bandes d'anticorps sur les gels, les complexes protéiques ont été décrochés par compétition à l'aide du peptide Myc afin d'éviter la dissociation de l'anticorps des billes. Les billes ont été incubées dans 30 µl de tampon 25 mM Tris-HCl pH 7,4 100 mM NaCl contenant 5 µg de peptide Myc (Progene) pendant 30 minutes avec agitation à température ambiante. Dans les deux cas, le surnageant récupéré a été utilisé immédiatement ou congelé à -80°C pour les analyses subséquentes.

2.4 Immunobuvardage (Western Blot)

Le tampon de chargement 2X (120 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glycérol, 4% SDS, 10% β-mercaptoéthanol et 0,02% de bleu de bromophenol) a été ajouté aux extraits protéiques puis chauffé 5 minutes à 100°C. Par la suite, les protéines ont été séparées sur gel 12% de polyacrylamide-SDS et transférées sur membrane Immobilon-P PVDF (Millipore) par transfert semi-dry (Bio-Rad). Les membranes ont été bloquées à l'aide d'une solution de PBS contenant 0,2% Tween-20 (PBS-Tween) et 5% de lait écrémé en poudre pendant 1 h à température ambiante avec agitation. La membrane a été rincée avec du PBS-Tween. Elle a été incubée toute la nuit avec un anticorps dirigé contre l'épitope Myc de souris à une dilution de 1:5000 (Invitrogen). Après l'incubation avec l'anticorps, les membranes ont été lavées dans du PBS-Tween et incubées une heure avec l'IgG anti-souris couplée à la peroxydase (dilution 1:100 000) (Sigma-Aldrich). La présence des protéines a été révélée en utilisant l'ECL comme substrat chromogène par chimioluminescence (Amersham Biosciences).

2.5 Coloration au nitrate d'argent

Le gel a été fixé dans une solution 50% méthanol, 10% acide acétique pendant 20 minutes. Le gel a été rincé 10 minutes dans de l'éthanol 20% et ensuite dans l'eau pendant 10 minutes. Le gel a été réduit dans une solution de sodium thiosulfate (0,2 mg/L) pendant 2 minutes et rincé à deux reprises avec de l'eau pendant 10 minutes. Le gel a été incubé pendant 30 minutes dans une solution de nitrate d'argent (0,2g/L) et légèrement rincé dans l'eau. Les bandes ont été révélées dans une solution de développement (3% carbonate de sodium, 0,05% formaldéhyde et 10mg/L de sodium thiosulfate). La réaction a été arrêtée avec l'ajout d'acide acétique 1%. Le gel est lavé avec de l'eau.

2.6 Chromatographie d'affinité

L'ensemble des manipulations relatives à la chromatographie d'affinité ont été effectuées dans un environnement réfrigéré (4°C). Une solution 50% de billes protéines G-Sepharose diluée dans du tampon de lyse sans NP-40 a été incubée avec 75 µg anticorps anti-Myc pendant 1 heure avec agitation. Une fois l'incubation terminée, les billes ont été transférées dans la colonne. Les billes ont été lavées à plusieurs reprises avec du tampon de lyse sans NP-40. Les lysats cellulaires ont été passés en boucle dans la colonne pendant 3 heures. À partir de ce point, les échantillons ont été recueillis par aliquots de 500 µl dans des tubes collecteurs disposés sur un plateau collecteur de fractions. La colonne a été lavée avec 5 mL de tampon de lyse sans NP-40. Une première élution a été effectuée avec 2,5 ml de tampon de lyse sans NP-40 contenant 115 µg de peptide Myc. Une seconde élution a été effectuée avec 2,5 mL de tampon de lyse sans NP-40 contenant 300 µg de peptide Myc. La colonne a été lavée avec 5 mL de tampon de lyse sans NP-40. Afin de décrocher toutes les protéines liées aux billes, une élution finale avec 5 mL de glycine 0,1 M pH 2,7 a été effectuée. Une fraction de chaque échantillon recueilli a été déposée sur gel afin de détecter la présence des protéines d'intérêt.

2.7 Protocole de colocalisation

2.7.1 Fixation des cellules

Sous une hotte à flux laminaire, une lamelle de microscope a été stérilisée dans une solution d'éthanol 70% pendant 30 minutes. Elle a été séchée à l'air puis déposée dans le fond d'un pétri. Le milieu de culture et les cellules NIH/3T3 y ont été déposés comme à l'habitude. Lorsque la confluence se situait entre 40 et 60%, les cellules ont été transfectées avec les constructions D2Trc-Myc ou D2-Myc. Après 36 heures d'incubation, les cellules ont été lavées avec du PBS. Les cellules ont été fixées sur la lamelle par une solution 4% paraformaldéhyde dans du PBS pendant 15 minutes. Par la suite les cellules ont été rincées à 3 reprises pendant 5 minutes avec une solution de PBS-glycine (100 mM). Les cellules ont été perméabilisées par une solution 0,1% Triton X-100 dilué dans de la glycine pendant 2 minutes. Finalement les cellules ont été rincées avec du PBS.

2.7.2 Marquage à l'anticorps

Une fois les cellules fixées et perméabilisées, elles ont été incubées pendant 30 minutes dans une solution de PBS contenant 1% BSA pH 7,5 pour bloquer les liaisons non-spécifiques des anticorps. Les cellules ont été incubées pendant 2 heures à température pièce avec 1 µg d'anticorps primaire anti-Myc de souris (Invitrogen) dilué dans une solution de PBS contenant 1% BSA pH 7,5. Les cellules ont été rincées pendant 10 minutes à 3 reprises par une solution PBS pH 7,5. Les cellules ont été incubées pendant 60 minutes à température pièce et dans l'obscurité avec l'anticorps secondaire, anti-souris de chèvre couplé à l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen), dilué 1 :1000 dans une solution de PBS contenant 1% BSA pH 7,5. Les cellules ont été rincées pendant 10 minutes à 3 reprises par une solution PBS pH 7,5. Pour une meilleure lecture de l'image et conservation du signal, le réactif ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen) été ajouté sur la lamelle. La localisation des protéines a été observée à l'aide d'un microscope à fluorescence à une longueur d'onde de 505 nm.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Expression des protéines

La D2Trc est le résultat de l'utilisation d'un site donneur d'épissage alternatif localisé dans le second intron du gène CCND2 (figure 1.1). Il en résulte un exon 2 allongé ainsi que l'apparition d'un codon d'arrêt prématuré au 157^e acide aminé. Le nouveau transcrit d'une taille de 1,1 kb génère une protéine de 17 kDa comparativement à un transcrit de 6,5 kb et une protéine de 34 kDa pour la D2 normale. Les 20 derniers acides aminés de la D2Trc diffèrent du transcrit normal à l'exception des résidus L143, L146, P155, H156. L'ADNc des deux protéines a été cloné dans un vecteur pCMV en phase avec une étiquette Myc en N-terminal.

3.1.1 Expression des protéines dans des cellules NIH/3T3

Premièrement, nous avons vérifié que les protéines étaient bien exprimées dans les cellules. Les vecteurs ont été transfectés dans des cellules NIH/3T3 et les protéines ont été extraites après 36 heures d'incubation. L'expression des protéines a pu être visualisée par immunobuvardage (figure 3.1). Pour la D2 (puits2) on retrouve une bande à 34 kDa soit le poids moléculaire attendu, idem pour la D2Trc (puits4) avec une bande autour de 17 kDa tel que prévu. L'absence de bandes dans les deux contrôles soit des cellules non transfectées (puits 1) ou encore transfectées avec le vecteur pCMV-Myc vide (puits 5), indique que les bandes de la D2 et la D2Trc correspondent bien aux bonnes protéines. Le puits 3 ne contenait aucun échantillon protéique.

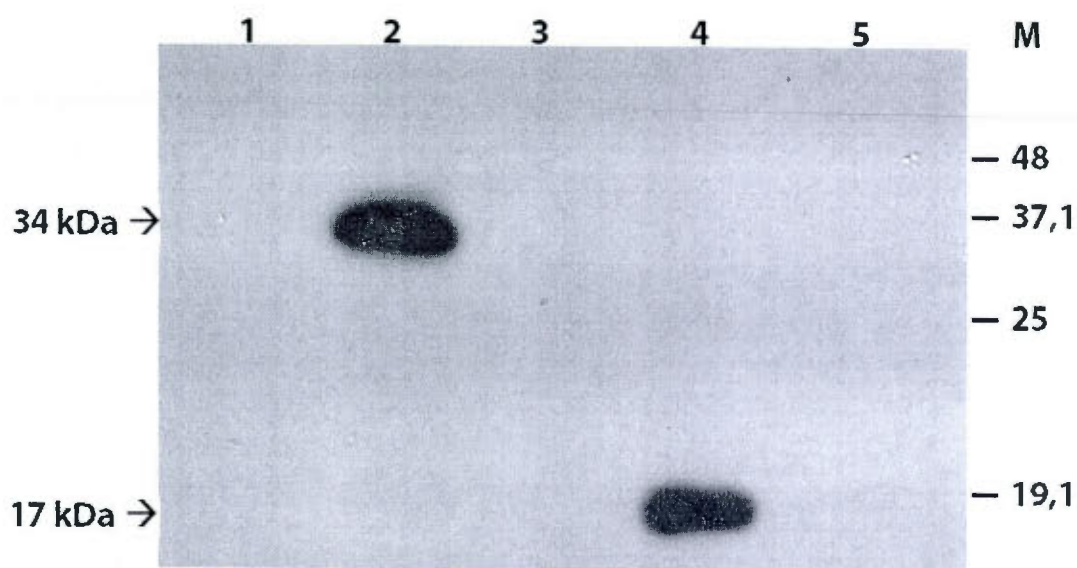


Figure 3.1 : Expression des cyclines D2 et D2Trc marquées avec l'épitope Myc dans des cellules NIH/3T3. Un échantillon pour la D2-Myc (puits 2) et un pour la D2Trc-Myc (puits 4) ont été utilisés. Des cellules non transfectées (puits 1) ou transfectées par le vecteur pCMV-Myc vide (puits 5) ont été utilisées comme contrôles négatifs. Le puits 3 ne contenait aucun échantillon protéique. L'immunobuvardage a été effectué avec 30 μ g de protéines provenant de lysat cellulaire et un anticorps anti-Myc. M : Prestained protein marker de New England Biolabs.

3.1.2 Expression des protéines dans le temps

La seconde étape a consisté à visualiser l'expression des protéines dans le temps afin de déterminer un intervalle d'expression raisonnable avant l'extraction des protéines. Les protéines ont été extraites après 24, 36 et 48 heures d'incubation. La figure 3.2 montre l'expression de la D2 et la D2Trc dans cet intervalle de temps. L'expression après 24 heures d'incubation est relativement faible pour la D2 (puits 2) et la D2Trc (puits 1). L'expression était nettement plus élevée après 36 heures d'incubation. Aucune différence notable n'a pu être détectée entre 36 et 48 heures d'incubation tant pour la D2 (puits 4 et 6) que la D2Trc (puits 3 et 5).

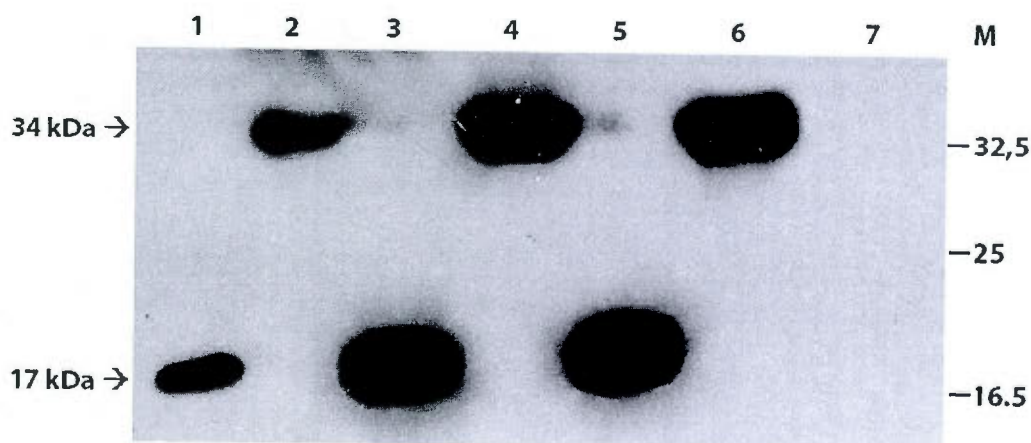


Figure 3.2 : Expression des cyclines D2 et D2Trc dans des cellules NIH/3T3 24, 36 et 48 heures après la transfection. Les échantillons correspondant à la D2Trc-Myc après 24 h (puits 1), après 36 h (puits 3), après 48 h (puits 5) et à la D2-Myc après 24 h (puits 2), après 36 h (puits 4), après 48 h (puits 6) ont été utilisés. Des cellules transfectées avec le vecteur pCMV-Myc vide (puits 7) ont été utilisées comme contrôle négatif. L'immunobuvardage a été effectué avec 30 μ g de protéines provenant de lysat cellulaire et un anticorps anti-Myc. M : Prestained protein marker de New England Biolabs.

3.2 Purification de la protéine

La purification des protéines est un processus visant à séparer une ou plusieurs protéines d'intérêt des autres constituants cellulaires. La purification des protéines est un outil précieux en recherche fondamentale. Elle est essentielle pour la caractérisation de la fonction, la structure et les interactions de la protéine d'intérêt. Les différentes étapes de la purification consistent en des processus successifs de simplification du matériel de départ (tissu biologique, culture cellulaire ou microbienne). Les différentes étapes du procédé de purification permettent la libération de la protéine de la matrice qui l'enferme, séparer les composantes protéiques et non protéiques du mélange, et enfin séparer la protéine souhaitée de toutes les autres protéines. La séparation d'une protéine des autres constitue l'aspect le plus laborieux du processus de purification dû aux nombreux ajustements nécessaires. Les protéines peuvent être séparées en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, la taille de la protéine, l'activité biologique et l'affinité de liaison (Gräslund *et al.*, 2008).

Dans le cas présent, les protéines ont été isolées par co-immunoprécipitation. L'épitope contre lequel est dirigé l'anticorps doit être assez spécifique afin d'éviter les interactions avec des protéines non désirées. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la cycline D2 aurait entraîné des complications pour l'isolement de la D2Trc car nous aurions également purifié la cycline D2 endogène. Pour contourner un obstacle de ce genre, des équipes de recherches ont développé plusieurs étiquettes (*tag*) pouvant être fusionnés à l'extrémité N ou C terminale d'une protéine. Parmi les étiquettes les plus fréquemment utilisés, on retrouve la GST, la GFP et les épitopes His, Ha, Myc et Flag (Arnau *et al.*, 2006). Pour cette raison, la D2 et la D2Trc ont été exprimées à partir du vecteur d'expression pCMV-Myc contenant l'ADNc des protéines en phase avec l'épitope Myc en position N-terminale. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'épitope Myc permet d'isoler uniquement les protéines ciblées.

3.2.1 Dosage de l'anticorps

En biologie moléculaire, le dosage d'un anticorps dans le but de réaliser une co-immunoprécipitation consiste à déterminer la quantité d'anticorps nécessaire pour récolter un maximum de la protéine d'intérêt dans un extrait protéique à une concentration donnée. Cette étape vise à réduire la quantité d'anticorps utilisée.

Pour une quantité de protéines constante (800 μg), les anticorps ont été ajoutés aux protéines selon un ratio anticorps/protéines de 1/200, 1/500 et 1/1000 (figure 3.3). Pour la D2, nous avons récolté autant de protéines avec les fractions 1/200 (puits 1) et 1/500 (puits 2). Toutefois, pour la D2Trc, la fraction 1/200 (puits 4) a recueilli nettement plus de protéines que la fraction 1/500 (puits 5). La fraction 1/1000 n'a récolté que très peu de protéines tant pour la D2 (puits 3) que pour la D2Trc (puits 6).

3.2.2 Test d'éluion par compétition avec le peptide Myc

Parmi toutes les techniques permettant de dissocier les protéines des billes, l'éluion thermique est la plus simple. Elle permet de récolter l'ensemble des protéines contenues dans l'échantillon y compris les anticorps. Dans les immunoprécipitations et co-immunoprécipitations, l'éluion d'une grande quantité d'anticorps est bien connue pour interférer avec l'analyse des bandes sur gel. La forte bande d'anticorps risque de masquer des bandes correspondant à des partenaires potentiels. Pour contrer ce problème, nous avons utilisé une technique d'éluion plus sélective, l'éluion par compétition à l'aide du peptide Myc. Le peptide Myc est couramment utilisé pour l'inhibition des interactions entre un épitope Myc et un anticorps. Ce petit peptide de 1,2 kDa permet de dissocier les protéines de l'anticorps sans détacher l'anticorps des billes.

Le peptide a été mis en excès malgré sa petite taille, 5 μg de peptide Myc pour 4 μg d'anticorps. La figure 3.3 montre que l'éluion avec le peptide Myc s'avère efficace tant pour

la D2 (puits 4) que la D2Trc (puits 8). Grâce à cette technique, la D2 et la D2Trc ont été séparées de l'extrait cellulaire et l'anticorps n'a pas été recueilli. Toutefois cette méthode ne semble pas recueillir autant de protéines que par élution thermique tant pour la D2 (puits 1) que la D2Trc (puits 5). Cette élution à l'aide du peptide Myc récolte une quantité de protéines équivalente à la dilution 1/1000 de l'anticorps tant pour la D2 (puits 3) que pour la D2Trc (puits 7) par élution thermique.

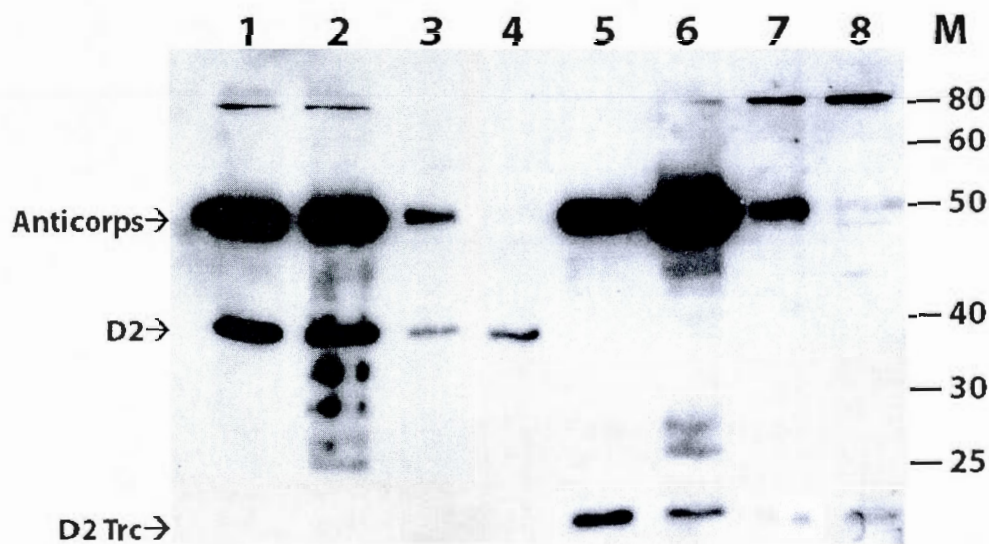


Figure 3.3 : Dosage de la quantité d'anticorps anti-Myc requis et test d'élution des protéines à l'aide du peptide Myc. Immunobuvardage des co-immunoprécipitation effectuées avec la D2 (puits 1, 2 et 3) et la D2Trc (puits 5, 6 et 7) avec respectivement des ratios anticorps/protéines de 1/200, 1/500 et 1/1000 à partir de 800 µg d'extrait cellulaire. L'élution à l'aide du peptide Myc a été testée avec 800 µg d'extrait cellulaire et de l'anticorps anti-Myc selon un ratio 1/200 pour la D2 (puits 4) et la D2Trc (puits 8). M : Prestained protein marker de New England Biolabs.

3.3 Séparation des protéines par électrophorèse et coloration au nitrate d'argent

Une électrophorèse en présence de SDS permet de dénaturer les protéines en leurs différentes sous-unités et de les séparer selon leur poids moléculaire. Les bandes du gel ont été révélées par une coloration au nitrate d'argent à l'aide d'un protocole compatible avec la spectrométrie de masse. La coloration au nitrate d'argent est de 10 à 100 fois plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie.

Les résultats tirés de la figure 3.4 révèlent en premier lieu l'absence d'une bande correspondant à la D2 (puits 1) ou à la D2Trc (puits 3) dans les co-immunoprécipitations et dans les extraits bruts de la D2 (puits 7) et de la D2Trc (puits 8). En second lieu, la comparaison des bandes visibles pour la D2 (puits 1), la D2Trc (puits 3) et pCMV-Myc (puits 5) ne permet pas d'identifier de bandes uniques à la D2Trc. Aucune traces visibles de la D2 (puits 2) et de la D2Trc (puits 4) n'ont été observées dans les lavages.

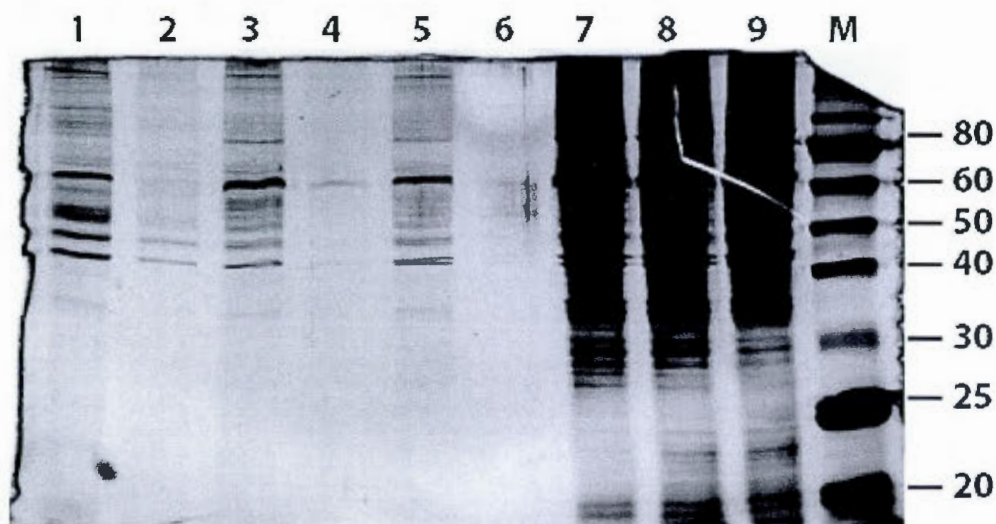


Figure 3.4 : Séparation des protéines par électrophorèse en présence de SDS et coloration du gel au nitrate d'argent. Des co-immunoprécipitations ont été effectuées avec 800 µg de protéines et 4 µg d'anticorps anti-Myc pour la D2 (puits 1), la D2Trc (puits 3) et le vecteur pCMV-Myc (puits 5). Le premier lavage pour la D2 (puits 2), la D2Trc (puits 4) et

pCMV-Myc (puits 6) ont été placés comme comparatifs. Des extraits bruts (30 µg) de la D2 (puits 7), la D2Trc (puits 8) et pCMV-Myc (puits 9) ont été déposés sur gel à titre de référence. M : Prestained protein marker de New England Biolabs.

3.4 Purification de la cycline D2 par chromatographie d'affinité

La chromatographie est une méthode habituellement utilisée pour la purification d'une grande quantité de protéines. Les échantillons protéiques sont passés dans une colonne contenant des billes d'acrylamide, sépharose ou agarose modifiées en fonctions des critères de séparation. La chromatographie peut séparer les protéines selon un gradient de charge (chromatographie à échange d'ions), de leur forme et taille (chromatographie de filtration sur gel) ou selon leur affinité pour des protéines, ADN ou autres molécules (chromatographie d'affinité). L'utilisation d'un anticorps lié aux billes pour la chromatographie d'affinité permet de cibler une protéine ou un groupe protéines en particulier. La chromatographie d'affinité permet d'isoler rapidement une grande quantité d'une protéine d'intérêt avec un degré de pureté supérieur aux deux autres types de chromatographie (Gräslund *et al.*, 2008).

Dans le cas présent, le lysat cellulaire a été passé en boucle dans une colonne contenant des billes de protéine G sépharose couplées à un anticorps anti- Myc. Une fois les billes lavées avec un tampon, les complexes protéiques ont été séparés de l'anticorps par compétition à l'aide du peptide Myc. Pour terminer, l'ensemble des protéines et anticorps restants ont été décrochés avec de la glycine.

La figure 3.5 A indique qu'une grande quantité de cycline D2 s'est dissociée de l'anticorps durant les premiers lavages (puits 1 à 8). Aucune protéine n'a été détectée durant l'élution avec le peptide Myc (non représenté). L'élution finale à la glycine (figure 3.5 B) indique qu'une très faible portion de la cycline D2 initiale a été récoltée dans les colonnes 7, 8 et 9 malgré la forte bande d'anticorps.

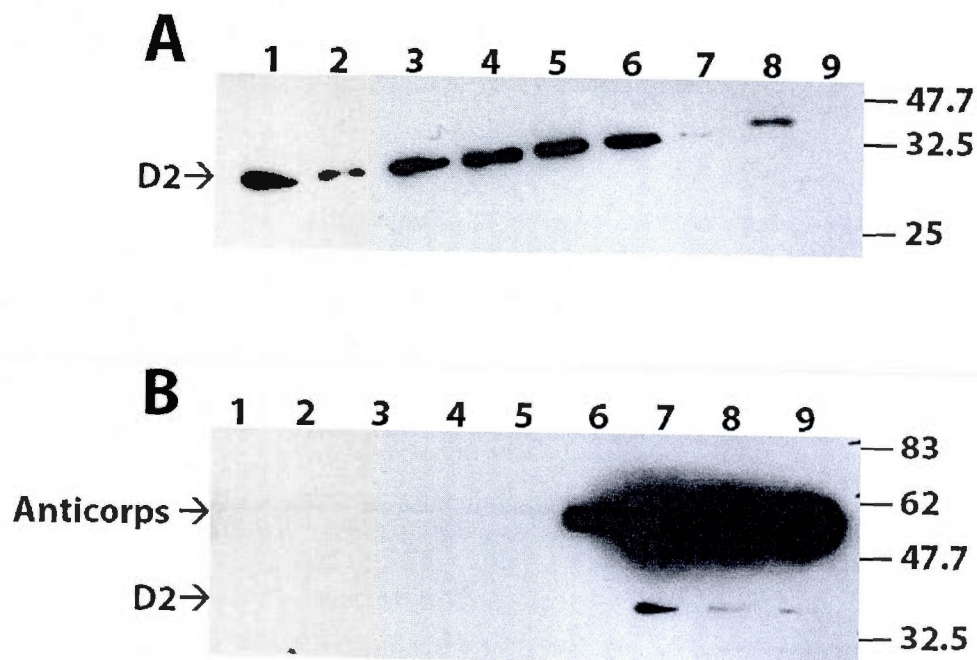


Figure 3.5: Purification de la cycline D2 par chromatographie d'affinité. L'échantillon de départ a été passé en boucle dans la colonne contenant des billes protéine G-Sépharose couplées à un anticorps anti-Myc. Les protéines ont été éluées avec du peptide Myc puis avec de la glycine. Les immunobuvardages A et B ont été réalisés à l'aide des fractions recueillies par chromatographie d'affinité. En A, les protéines contenues dans l'extrait de départ (puits 1) et les premiers lavages effectués avec le tampon (puits 2 à 9). En B, l'élué à la glycine de la cycline D2 (puits 1 à 9). Pour chaque fraction, 30 μ g de protéines ont été déposées sur gel. M : Prestained protein marker de New England Biolabs

3.5 Confirmation des interactions entre l'anticorps anti-myc et la forme native de la D2 et la D2Trc *in situ*

La conformation native d'une protéine représente la structure tridimensionnelle fonctionnelle de cette protéine dans son milieu physiologique. Cette structure est déterminée par les diverses interactions (hydrophiles, hydrophobes et charge électrique) entre les acides aminés qui constituent la protéine (Pace *et al.*, 1996; Goldberg, 2005). À l'heure actuelle, le mécanisme de repliement des protéines n'est pas totalement compris. L'altération de la séquence d'une protéine, comme l'ajout d'un épitope, est susceptible d'altérer la conformation de la protéine. Ces changements peuvent entraîner l'échec du repliement dans la forme native et produit des protéines aux propriétés différentes (Arnau *et al.*, 2006).

Un test de localisation *in situ* permet de visualiser l'affinité de l'anticorps pour les protéines sous leur forme native. La figure 3.6 montre que l'anticorps interagit avec la forme native de la D2-Myc (B) au noyau ainsi qu'avec la D2Trc-Myc (C) dans le cytoplasme. L'absence de signal dans le contrôle négatif, le vecteur pCMV-Myc (A), confirme les interactions avec les protéines ciblées.

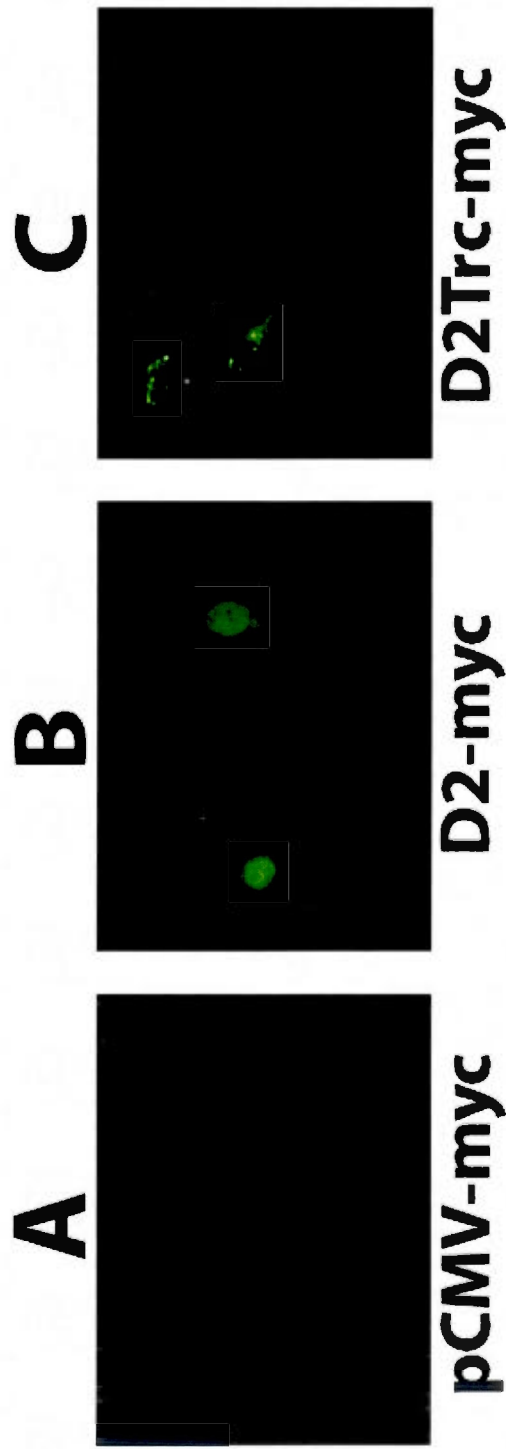


Figure 3.6 : Test de liaison in situ de l'anticorps avec la forme native de la D2 et la D2 Trc. Les cellules NIH/3T3 ont été transfectées avec le vecteur pCMV-Myc (A) (contrôle), D2-Myc (B) et D2Trc-Myc (C) et observées 36 heures après la transfection.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Expression de la protéine

Des constructions du vecteur d'expression pCMV-Myc en phase avec l'ADNc de la D2 ou de la D2Trc ont été transfectées dans des cellules NIH/3T3. L'expression des protéines a été observée et comparée dans un intervalle de temps allant de 24 et 48 heures. Les protéines ont été visualisées par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope Myc. Les données de la figure 3.1 confirment que la cycline D2 et de la cycline D2 tronquée sont bien les protéines exprimées comme en témoigne l'apparition d'une bande unique correspondant à leurs poids moléculaires respectifs, soit 34 kDa pour la D2 et 17 kDa pour la D2Trc. Pour l'intervalle d'expression (figure 3.2), aucune différence notable n'a été détectée entre 36 et 48 heures d'incubation tant pour la D2 que la D2Trc. Étant donné l'expression visiblement plus faible 24 heures après la transfection, nous avons considéré qu'une incubation de 36 heures était suffisante.

4.2 Purification des protéines

La purification est l'étape clé de ce projet, elle permet d'éliminer l'ensemble des composés cellulaires indésirables (protéines, débris cellulaires, etc.) contenus dans l'extrait brut. Dans le cas présent les protéines ont été isolées par affinité à l'aide d'un anticorps et de billes protéine G sépharose. L'ajout d'une étiquette Myc à l'extrémité N terminale de la D2 et la D2Trc a permis l'utilisation d'un seul anticorps (anti-Myc) pour les deux protéines et a diminué fortement le risque d'une contamination avec des protéines ayant des portions de séquence homologue à la cycline D2 endogène.

4.2.1 Dosage de l'anticorps

Un bon dosage de l'anticorps permet de récupérer un maximum de la protéine cible tout en évitant du gaspillage. Selon la figure 3.3, pour la D2, les données indiquent que les fractions 1/200 et 1/500 récoltent sensiblement la même quantité de protéines. Pour la D2Trc, la fraction 1/200 récolte légèrement plus de protéines que la fraction 1/500. Afin de minimiser la perte de protéines, nous avons favorisé la fraction 1/200. Le problème majeur est l'apparition d'une forte bande aux environs de 50 kDa. Cette bande serait constituée de la chaîne légère de l'anticorps qui s'est dissociée des billes lors de l'élution thermique.

4.2.2 Éluion au peptide Myc

Un des problèmes les plus couramment rencontrés avec les immunoprécipitations et co-immunoprécipitations est l'interférence des bandes d'anticorps lors de l'analyse des bandes du gel. La contamination par les chaînes légères et lourdes de l'anticorps engendre l'apparition de bandes à 25 kDa et 50 kDa sur gel SDS-PAGE. Pour les immunobuvardages, le problème est relativement simple à régler, l'utilisation de deux anticorps d'espèces différentes dirigés contre le même épitope pour la co-immunoprécipitation et l'immunobuvardage permet de masquer les bandes d'anticorps. Toutefois, dans notre cas l'objectif est l'identification de partenaires d'interaction et donc, le fait de masquer les bandes sur l'immunobuvardage ne les fera pas disparaître du gel coloré au nitrate d'argent. En consultant la figure 3.3, on constate la présence d'une forte bande aux environs de 50 kDa, correspondant aux chaînes lourdes d'anticorps. L'absence de bandes correspondant aux chaînes légères aux environs de 25 kDa serait due à la spécificité de l'anticorps secondaire. Généralement, l'anticorps secondaire reconnaît la région Fc de l'anticorps qui est située sur la chaîne lourde et lorsque l'anticorps est séparé en ses sous-unités il ne peut se lier aux chaînes légères (Thermo Scientific Pierce *protein interaction technical handbook*). L'intensité des bandes correspondant aux chaînes lourdes est nettement supérieure à l'intensité des bandes correspondant à D2 et la D2Trc. Donc la présence de la D2 ou la D2Trc sera accompagnée

d'une large bande d'anticorps risquant fortement de masquer des partenaires potentiels sur le gel, empêchant leur identification.

Afin de contourner ce problème, nous avons décidé de dissocier les protéines de l'anticorps par compétition à l'aide du peptide Myc. Par le passé, cette technique a fait ses preuves, plusieurs études ont utilisé ce procédé pour dissocier les protéines de l'anticorps sans le recueillir et une multitude de compagnies ont élaboré autant de trousseaux de purification de protéines dont l'élution des protéines basées sur le principe de compétition avec un peptide. En examinant la figure 3.3, il ressort que l'élution à l'aide du peptide Myc semble bien fonctionner. Autant pour la D2 que la D2Trc, on remarque que l'anticorps n'a pas été élué avec les protéines. Toutefois, ce procédé ne semble pas récolter autant de protéines que par élution thermique.

4.2.3 Visualisation des protéines sur gel coloré au nitrate d'argent

L'électrophorèse sur gel permet d'acquérir une multitude d'informations sur une protéine tel que le poids moléculaire, la charge électrique, la structure de ses sous-unités et la pureté d'une préparation de la dite protéine. L'utilisation de cette technique est relativement simple et les résultats sont aisément reproductibles. Les cyclines D2 et D2Trc ont été isolées du lysat cellulaire par co-immunoprécipitation à l'aide de billes protéines G sépharose et d'un anticorps anti-Myc. Les protéines ont été dissociées de l'anticorps par compétition à l'aide du peptide Myc et les protéines recueillies ont été séparées par électrophorèse en présence de SDS. Les bandes ont été révélées par une coloration au nitrate d'argent, une coloration dont le seuil de sensibilité est nettement inférieur à une coloration au bleu de Coomassie. La figure 3.4 représente le gel protéique coloré au nitrate d'argent. La présence de la D2 ou la D2Trc n'a été détectée dans aucun des échantillons; co-immunoprécipitation, lavage et extrait brut. De plus aucune bande unique à la D2Trc n'a pu être identifiée.

Une quantité de protéines insuffisante dans l'échantillon initial pourrait expliquer l'absence de bandes correspondant à la D2 ou à la D2Trc sur le gel. Les résultats obtenus à l'aide des immunobuvardages sont qualitatifs, ils ne permettent pas de déterminer la quantité de protéines recueillies dans les échantillons. L'intensité des bandes dépend à la fois du type d'anticorps utilisé et du temps d'exposition. L'immunobuvardage permet de détecter une infime quantité de protéines, jusqu'à 0,1 ng, comparativement à un maximum de 10 ng pour la coloration au nitrate d'argent. L'aspect qualitatif et la sensibilité de l'immunobuvardage pourrait avoir contribué à surévaluer la quantité de protéines récoltées par co-immunoprécipitation.

D'un autre côté, une faible liaison entre l'anticorps et nos protéines (D2 et D2Trc) pourrait être responsable de leur absence sur le gel. Il est possible que l'étiquette soit peu accessible dans la conformation de la protéine. Malgré sa petite taille, l'étiquette est susceptible d'altérer la conformation native de la protéine. Les partenaires d'interactions des protéines peuvent masquer l'étiquette, diminuant fortement les interactions avec l'anticorps.

4.3 Purification de la cycline D2 par chromatographie d'affinité

La chromatographie est une technique qui permet de séparer les constituants d'un mélange de façon à les fixer temporairement à un support (phase stationnaire) et en les éluant progressivement grâce à un liquide ou un gaz (phase mobile ou éluat). Dans le cas présent, la phase stationnaire est constituée de billes de protéines G sépharose liées de façon covalente à un anticorps dirigé contre l'épitope Myc (anti-Myc). Les échantillons de la D2 ont été passés en boucle à travers les billes et l'anticorps. Les billes ont été lavées avec un tampon et les protéines ont été décrochées par compétition à l'aide du peptide Myc.

L'analyse des fractions recueillies (figure 3.5) révèle que malgré une augmentation significative des protéines dans l'échantillon initial, seule une infime portion de la D2 a pu être isolée grâce à cette technique. Contrairement aux résultats attendus, aucune D2 n'a été détectée dans les fractions éluées à l'aide du peptide Myc. Dans les fractions finales (élution

à la glycine, figure 3.5B), très peu de D2 a été récoltée en comparaison des fortes bandes d'anticorps. La grande quantité de D2 qui a quitté la colonne dès les premiers lavages ainsi que les anticorps non associés à de la D2 renforce la thèse que l'étiquette serait masquée ou mal présentée, ce qui nuirait aux interactions entre l'anticorps et la protéine.

4.4 Test de liaison entre l'anticorps et les protéines sous leur forme native

Lorsque les protéines sont présentes sous leur forme native, l'épitope n'est pas toujours bien présenté, il est possible qu'il soit masqué par la conformation de la protéine ou les partenaires d'interaction, diminuant fortement les interactions avec l'anticorps. Suite aux résultats obtenus grâce à la chromatographie d'affinité, il est à même de se demander si l'anticorps peut interagir avec l'étiquette Myc de la D2 et la D2Trc sous leur forme native. La figure 3.6 montre que l'anticorps peut se lier à l'étiquette Myc de la forme native de la D2 et la D2Trc. Toutefois ces interactions seraient relativement faibles, ce qui expliquerait la perte de protéines lors des lavages de la chromatographie d'affinité.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES

À l'heure actuelle, la conformation native, les partenaires d'interaction de même que la fonction de la D2Trc sont inconnus. Malgré un dosage de divers paramètres; intervalle d'expression, quantité de protéines, d'anticorps et de l'élution par compétition à l'aide du peptide Myc, nous n'avons pu identifier concrètement la D2 ou la D2Trc sur un gel coloré au nitrate d'argent et encore moins des partenaires d'interaction potentiels. Les résultats de la chromatographie d'affinité sous-entendent que l'étiquette ne serait pas bien présentée, elle serait masquée par la conformation de la protéine ou par le complexe formé à l'aide de ses partenaires d'interaction. Nous avons démontré que l'anticorps a la capacité de se lier à l'étiquette Myc de la forme native de la D2 et la D2Trc. Donc lors de la co-immunoprécipitation l'anticorps s'associerait avec le complexe protéique mais la force de liaison ne serait pas suffisante pour retenir les protéines, ce qui entraînerait leur dissociation de l'anticorps lors des lavages.

La co-immunoprécipitation est la méthode de référence pour démontrer les interactions protéine-protéine, spécialement lorsque les protéines sont exprimées de façon endogène (non surexprimées). Cette approche est généralement utilisée pour confirmer les interactions avec des partenaires potentiels, elle n'est pas reconnue pour être une méthode de dépistage des partenaires d'interaction. L'utilisation de techniques mieux adaptées au dépistage de partenaires d'interaction serait à envisager comme le système double hybride chez la levure ou l'étiquette TAP (*Tandem Affinity Purification*).

La première méthode, le système simple hybride en levure, a révolutionné les techniques de détection des interactions protéine-protéine et protéine-ADN lors de sa découverte. De multiples interactions entre des protéines ont été révélées grâce à cette technique. Cette technique utilise un vecteur de levure dans lequel un domaine de liaison à l'ADN et une région flexible de liaison sans son domaine activateur associé ont été fusionnés avec la séquence d'ADNc codant pour la protéine d'intérêt. La protéine d'intérêt joue le rôle d'appât envers les partenaires potentiels. La création du second vecteur, nécessite l'utilisation d'une banque d'ADNc constituée de toutes les séquences codant pour des protéines dans un organisme ou tissu particulier. La banque d'ADNc est clonée sous la forme de multiples copies du second vecteur qui code pour un domaine d'activation fort et d'une région flexible de liaison. Ceci génère une banque de vecteurs exprimant de multiples protéines hybrides, contenant chacun une proie différente. Le vecteur appât et la banque de vecteurs proie sont transfectées dans des cellules de levures. Dans une même cellule, si la protéine d'appât et la protéine proie interagissent ensemble, le gène sera reconstitué et il y aura transcription du gène rapporteur. Les clones positifs peuvent alors être extraits des colonies et la protéine peut être identifiée par séquençage du clone ADN présent dans la colonie (Brückner *et al.*, 2009; Parrish *et al.*, 2006; Phizick et Fields, 1995).

La principale faille de cette technique réside au niveau des interactions non spécifiques avec d'autres protéines induisant l'apparition de nombreux faux positifs. Ces interactions non désirées génèrent une quantité importante de résultats nécessitant le criblage de banque de données ainsi le croisement avec les divers résultats obtenus. La technique du double hybride donne énormément d'indices sur les partenaires d'interaction potentiels mais elle ne prouve pas à elle seule les interactions entre deux protéines. Pour cette raison, l'utilisation d'une technique complémentaire (co-immunoprécipitation, colocalisation, etc.) est nécessaire pour valider les interactions (Brückner *et al.*, 2009; Parrish *et al.*, 2006; Phizick et Fields, 1995).

Une seconde méthode, la TAP, est une technique utilisée principalement pour la purification d'une protéine et/ou l'étude des interactions protéine-protéine. La TAP consiste à la création d'une protéine de fusion contenant l'étiquette TAP à l'extrémité N ou C terminale

de la protéine. Les protéines sont extraites du lysat cellulaire par une double purification (voir figure 5.1 ci-dessous). Elle permet une purification rapide de la protéine dans des conditions natives. Cette purification peut être effectuée à partir d'un petit nombre de cellules sans connaître préalablement la composition, l'activité ou la fonction du complexe protéique. L'utilisation conjointe de la TAP et de la spectrométrie de masse permet l'identification des constituants du complexe, c'est-à-dire les partenaires d'interaction de la protéine d'intérêt (Puig *et al.*, 2001; Rigaut *et al.*, 1999).

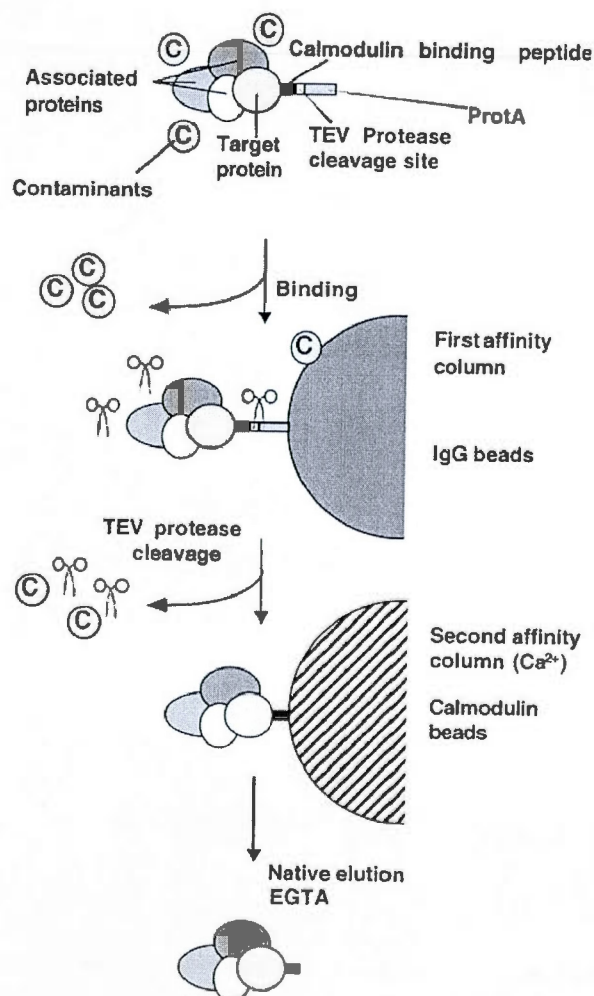


Figure 5.1 : schéma représentatif de la purification à l'aide de la protéine de fusion TAP. La première purification consiste à retenir les protéines sur une matrice IgG grâce à la

protéine A de la TAP. Les protéines sont éluées par clivage de la protéase TEV en amont de la protéine A. Lors de la seconde purification, l'éluât est incubé avec des billes recouvertes de calmoduline en présence de calcium. Cette étape permet l'élimination de la protéase TEV et des contaminants restant. Suite aux lavages, les protéines sont éluées avec de l'EGTA. Figure tirée de l'article de Puig et al., 2001.

Le principal avantage de la TAP est qu'à elle seule elle permet d'identifier des partenaires d'interaction sans connaissance préalable du complexe protéique. La technique est également simple d'utilisation et permet d'obtenir un échantillon protéique de grande qualité. D'un autre côté, il est possible que l'étiquette TAP nuise aux interactions entre la protéine d'intérêt et ses partenaires d'interaction. Malgré la haute spécificité de la protéase TEV, il est possible qu'elle clive certaines protéines du complexe (Puig *et al.*, 2001; Rigaut *et al.*, 1999).

Cette méthode me semblait très intéressante mais elle nécessitait la fabrication de nouvelles constructions et de valider à nouveau l'ensemble de l'approche expérimentale. Malheureusement, le manque de temps ne permettait pas le développement de cette méthode.

ANNEXE A

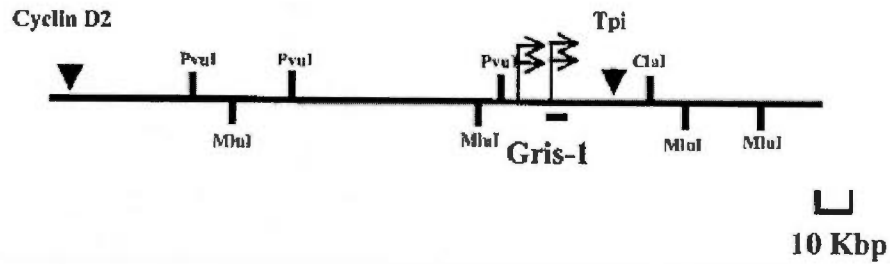


Figure 1 : Représentation physique du site d'insertion *Gris* du rétrovirus murin Graffi 75-85 kpb en aval du gène de la cycline D2. Les insertions provirales en *Gris1* sont localisées à 80 Kpb en amont du gène de la cycline D2. *Gris1* est le site d'intégration du rétrovirus Graffi détecté dans 13% des tumeurs analysées. L'insertion rétrovirale amplifie l'expression des deux isoformes (normale et tronquée) de la cycline D2. Figure tirée de l'article de Denicourt *et al.*, 2003.

RÉFÉRENCES

- Ajchenbaum F., Ando K., DeCaprio J.A., Griffin J.D. (1993). Independent Regulation of Human D-type Cyclin Gene Expression during G1 Phase in Primary Human T Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 268. 4113-4119.
- Aktas H., Cai H., Cooper G. M. (1997). Ras links growth factor signalling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and CDK inhibitor p27^{KIP1}. *Molecular and Cellular Biology* 17. 3850-3857.
- Alt J. R., Gladden A. B., Diehl J. A. (2002). p21 (Cip1) promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *Journal of Biological Chemistry* 277. 8517-8523.
- Arellano M., Moreno S. (1997). Regulation of CDK/cyclin Complexes During the Cell Cycle. *International Journal of Biochemistry* 29. 559-573.
- Arnau J., Lauritzen C., Peterson G. E., Pederson J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 48. 1-13.
- Assoian R. K. (1997). Control of the G1 phase cyclin-dependent kinases by mitogenic growth factors and the extracellular matrix. *Cytokine Growth Factor Reviews* 8. 165-170.
- Baldassarre G., Belletti B., Bruni P., Boccia A., Trapasso F., Pentimalli F., Barone M. V., Chiappetta G., Vento M. T., Spiezia S., Fusco A., Viglietto G. (1999). Overexpressed cyclin D3 contributes to retaining the growth inhibitor p27 in the cytoplasm of thyroid tumor cells. *Journal of Clinical Investigation* 104. 865-874.
- Beijersbergen R. L., Bernards R. (1996). Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory protein. *Biochemica et Biophysica Acta* 1287. 103-120.
- Bernards R. (1997). E2F: a nodal point in cell cycle regulation. *Biochemica et Biophysica Acta* 1333. M33-M40.
- Bockstaele L., Kooken H., Libert F., Paternot S., Dumont J. E., De Launoit Y., Roger P. P., Coulonval K. (2006). Regulated activating Thr172 phosphorylation of Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4): Its relationship with cyclins and CDK "inhibitors". *Molecular and Cellular Biology* 26. 5070-5085.
- Bromberg J., Wrzeszczynska M., Devgan G., *et al.* (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* 98. 295-303.

- Brückner A., Polge C., Lentze N., Auerbach D., Schlattner U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences* 10. 2763-2788.
- Cheng M., Sexl V., Sherr C.J., Roussel M. F. (1998) Assembly of cyclin D-dependant kinase and tritration of p27^{Kip1} regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95. 1091-1096.
- Comité directeur de la Société canadienne du cancer. (2011). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2011*. Toronto, Canada. Société canadienne du cancer. 145 p.
- Cobrinik D. (2005). Pocket protein and cell cycle control. *Oncogene* 24. 2796-2809.
- Coqueret O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299. 35-55.
- Denicourt C. (2002). Identification d'un nouvel isoforme de la cycline D2 activée dans des leucémies induites par le retrovirus murin Graffi. Thèse de doctorat. Montréal. Université du Québec à Montréal. 216p.
- Denicourt C., Kozak C. A., Rassart E. (2003). Gris 1, a new common integration site in Graffi murine leukemia virus-induced leukemia: Overexpression of a truncated cyclinD2 due to alternative splicing. *Journal of Virology* 77. 37-44.
- Denicourt C., Legault P., McNabb F.-A., Rassart E. (2008). Human and mouse cyclin D2 splice variants: transforming activity and subcellular localization. *Oncogene* 21. 1253-1262.
- Diao L., Chen Y.-G. (2007). PTEN, a general negative regulator of cyclin D expression. *Cell Research* 17. 291-292.
- Diehl J. A., Cheng M., Roussel M F., Sherr C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Developpement* 12. 3499-3511.
- Erlandsson F., Linnman C., Ekholm S., Bengtsson E., Zetterberg A. (2000). A detailed analysis of cyclin A accumulation at the G(1)/S border in normal and transformed cells. *Experimental Cell Research* 259. 86-95.
- Girard F., Strausfeld U., Fernandez A., Lamb N. J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67. 1169-1179.
- Goldstone S, Pavey S., Forrest A., Sinnamon J., Gabrielli B. (2001). Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR. *Oncogene* 20. 921-932.

- Glotzer M., Murray A. W., Kirschner M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349. 132-138.
- Goldberg M. E. (2005). Le repliement des protéines : seconde traduction du message génétique. *Médecine science* 21. 563-566.
- Grana X., Garriga J. Mayrol X. (1998). Role of the retinoblastoma protein family, pRb, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 17. 3365-3383.
- Gräslund S., Nordlund P., Weigelt J., Hallberg B.M., Bray J., Gileadi O., *et al.* (2008). Protein production and purification. *Nature Methods* 5. 135-146.
- Guttridge D.C., Albanese C., Reuther J.Y., Pestell R.G., Baldwin A.S. Jr. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology*. 19: 5785-5799.
- Hanna Z., Jankowski M., Tremblay P., Jiang X., Milatovich A., Francke U., Jolicoeur P. (1993). The Vin-1 gene, identified by provirus insertional mutagenesis, is the cyclin D2. *Oncogene* 8. 1661-1666.
- Hinz M., Krappmann D., Eichten A., Heder A., Scheidereit C., Strauss M. (1999). NF-kB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Molecular and Cellular Biology* 19. 2690-2698.
- Hirano T., Kobayashi R., Hirano M. (1997). Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. *Cell* 89: 511-521.
- Huang S., Chen C. S., Ingber, E. D. (1998). Control of cyclin D1, p27^{kip}, and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Molecular and Cellular Biology* 9: 3179-3193.
- Huang W., Chang H. Y., Fei T., Chen Y.-G. (2007). GSK3 β mediated suppression of cyclin D2 expression by tumor suppressor PTEN Expression of cyclin D2 expression by PTEN. *Oncogene* 26. 2471-2482.
- Iaquinta P. J., Lees J. A. (2007). Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Current Opinon in Cell Biology* 6. 649-657.
- Johnson D. G., Walker C. J. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39. 295-312.

- Joyce D., Bouzahzah B., Fu M., Albanese C., D'Amico M., Steer, J., *et al.* (1997). Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through an NF-kB-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry* 274. 25245–25249.
- Kastan M. B., Bartek J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432. 316-323.
- Kim K. K., Chamberlin H. M., Morgan D. O., Kim S. H. (1996). Three-dimensional structure of human cyclin H, a positive regulator of the CDK-activating kinase. *Nature Structural and Molecular Biology* 3. 849-855.
- Knudsen K. E. (2006). The cyclin D1b splice variant: an old oncogene learns new tricks. *Cell Division*. 1-15.
- Koff A., Cross F., Fisher, A., Schumacher, J., Lguellec, K., Philippe, M., *et al.*, (1991). Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 66. 1217–1228.
- LaBaer J., Garrett M. D., Stevenson L. F., Slingerland J. M., Sandhu C., Chou H. S., Fattaey A., Harlow E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Development* 11. 847-862.
- Lebwohl D. E., Muise-Helmericks R., Sepp-Lorenzino L., Serve S., Timaul M., Bol R., Borgen P., Rosen N. (1994). A truncated cyclin D1 gene encodes a stable mRNA in a human breast cancer cell line. *Oncogene* 9. 1925-1929.
- Lee J. (2009). Regulation of CIP/KIP cell cycle inhibitors and their biological implications. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 3. 128-137.
- Leslie K., Lang C., Devgan G., Azare J., Berishaj M., Gerald W., Kim Y. B., Paz K., Darnell J. E., Albanese C., Sakamaki T., Pestell R., Bromberg J. (2006). Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Research* 66: 2544-2552.
- Lolli G., Johnson L. N. (2005). CAK-Cyclin-dependant activating kinase, a key kinase in cell cycle control and target for drugs?. *Cell Cycle* 4. 572-577.
- Lu F., Gladden A. B., Diehl J. A. (2003). An Alternatively Spliced Cyclin D1 Isoform, Cyclin D1b, Is a Nuclear Oncogene. *Cancer Research* 63. 7056-7061.
- Lukas C., Bartkova J., Welker M., Peterson O. W., Peters G., Strauss, M., Bartek J. (1995). Cyclin D2 is a moderately oscillating nucleus protein required for G1 phase progression in specific cell types. *Oncogene* 10. 2125-2134.

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

Lukas J., Lukas C., Bartek J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* 3. 997-1007.

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

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

Matsushime H., Quelle D. E., Shurtleff S. A., Shibuya M., Sherr C. J., Kato J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* 14: 2066-2076.

Matsushime H., Roussel M. F., Ashmun R. A., Sherr C. J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65 : 701-13.

McNabb F.-A. (2008). Caractérisation de la cycline D2 tronquée de souris : son implication dans le cancer. Mémoire de maîtrise. Montréal. Université du Québec à Montréal. 83p.

Morgan D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374. 131-134.

Morgan D. O. (1997). Cyclin-dependant kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13. 261-291.

Nigg E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Review Molecular Cell Biology* 2. 21-32.

Obaya A. J., Sedivy J. M. (2002). Regulation of cyclin-CDK activity in mammalian cells. *Cellular and molecular life science* 59. 126-142.

Ohtsubo M., Theodoras A. M., Schumacher J., Roberts J. M., Pagano M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential to G1-to-S phase transition. *Cancer Research* 55. 2612-2624.

Pace C. N., Shirley B. A., McNutt M., Gajiwala K. (1996). Forces contributing to the conformational stability of proteins. *The FASEB Journal* 10. 75-83.

- Parrish J. R., Gulyas K. D., Finley Jr R. L. (2006). Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping. *Current Opinion in Biotechnology* 17. 387-393.
- Patronetto M. P., Cappellari M., Busà R., Pedrotti S., Vitali R., Comstock C., Hyslop T., Knudsen K. E., Sette C. (2009). Alternative Splicing of the Cyclin D1 Proto-Oncogene Is Regulated by the RNA-Binding Protein Sam68. *Cancer Research* 70. 229-239.
- Pavletich N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependant kinase regulation: structure of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of Molecular Biology* 287. 821-828.
- Peter M., Nakagawa J., Dorée M., Labbé J. C., Nigg E. A. (1990). *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61. 591-602.
- Phizick E. M., Fields S. (1995). Protein-protein interactions : methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews* 59. 94-123.
- Pines J. (1997). Cyclin-dependent kinase inhibitors: the age of crystals. *Biochimica et biophysica acta* 1332. 39-42.
- Puig O., Caspary F., Rigaut G., Rutz B., Bouveret E., Bragado-Nilsson E., Wilm M., Séraphin B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24. 218-229.
- Radu A., Neubauer V., Akagi T., Hanafusa H., Georgescu M.-M. (2003). PTEN Induces Cell Cycle Arrest by Decreasing the Level and Nuclear Localization of Cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology* 23. 6139-6149.
- Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Séraphin B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology* 17. 1030-1032.
- Schafer K. A. (1998) The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology* 35. 461-478.
- Schwartz M. A., Assoian R. K. (2001). Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signalling pathways. *Journal of Cell Science*. 114. 2553-2560.
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73. 1059-1065.
- Sherr C. J. (1995). D-type cyclins. *Trends in Biochemical Science* 20. 187-190.

- Sherr C. J. (1996). *Cancer Cell Cycles*. *Science* 274. 1672-1677.
- Sherr C. J., Roberts J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Development* 13. 1501-1512.
- Sherr C. J., Roberts J. M. (2004). Living with or without cyclin and cyclin-dependant kinases. *Genes & Development* 18. 2699-2711.
- Sicinska E., Aifantis I., Le Cam L., Swat W., Borowski C., Yu Q., Ferrando A. A., Levin S. D., Geng Y., von Boehmer H., Sicinski P. (2003). Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell* 4. 451-461.
- Sun Q., Zhang F., Wafa K., Baptist T., Pasumarthi K. B. S. (2009). A splice variant of cyclin D2 regulates cardiomyocyte cell cycle through a novel protein aggregation pathway. *Journal of Cell Science* 122. 1563-1573.
- Taïeb F., Jessus C. (1996). *Xenopus* cyclin D2: cloning and expression in oocytes and during early development. *Biology of the Cell* 88. 99-111.
- Takano Y., Kato Y., Masuda M., Ohshima Y., Okayasu I. (1999). Cyclin D2, but not Cyclin D1, overexpression closely correlates with gastric cancer progression and prognosis. *Journal of Pathology* 189. 194-200.
- Takano Y., Kato Y., van Diest P. J., Masuda M., Mitomi H., Okayasu I., (2000). Cyclin D2 Overexpression and Lack of p27 Correlate Positively and Cyclin E Inversely with a Poor Prognosis in Gastric Cancer Cases. *American Journal of Pathology* 156. 585-594.
- Thermo Scientific. (2010). *Thermo Scientific Pierce protein interaction technical handbook*. 74p.
- Tremblay P. J., Kozak C. A., Jolicoeur, P. (1992). Identification of a novel gene, Vin-1, in murine leukemia virus-induced T-cell leukemias by provirus insertional mutagenesis. *Journal of Virology* 66. 1344-1353.
- Trimarchi J. M., Lees J. A. (2002). Siblings rivalry in the E2F family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3. 11-20.
- Vermeulen K., Bockstaele D. R., Berneman Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation* 36. 131-149.
- Watanabe G., Lee R.J., Albanese C., Rainey W. E., Batle D., Pestell, R. G. (1996). Angiotensin II activation of cyclin D1-dependent kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* 271. 22570-22577

Wells N. J., Watanabe N., Tokusumi T., Jiang W., Verdecia M. A., Hunter T. (1999). The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase MYT1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G2/M progression. *Journal of Cell Science* 112. 3361-3371.

Zhu X., Kwon C. H., Schlosshauer P. W., Ellenson L. H., Baker S. J. (2001). PTEN induces G(1) cell cycle arrest and decreases cyclin D3 levels in endometrial carcinoma cells. *Cancer Research* 61. 4569-4575

Zheng N., Frankel E., Pabo C. O., Pavletich N. P. (1999) Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-Dp. *Genes & Development*. 666-673.