



UNIVERSITE DE STRASBOURG



THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Etienne SCHAEFFER

Etude des modifications post- traductionnelles de la protéine ATF7

Soutenue publiquement le 24 Juin 2014

Membres du Jury :

Directeur de Thèse :	Pr. Bruno CHATTON, IREBS, Strasbourg
Rapporteur Externe :	Pr. Pierre JALINOT, ENS, Lyon
Rapporteur Externe :	Dr. Michaël BOYER-GUITTAUT, Université de Franche-Comté, Besançon
Rapporteur Interne :	Pr. Philippe CARBON, IBMC, Strasbourg
Membre Invité :	Dr. Mariel DONZEAU, IREBS, Strasbourg

Travail réalisé au sein de l'équipe Modifications post-traductionnelles et cancérogénèse
Institut de Recherche de l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

IREBS, CNRS-UMR72

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX	5
TABLE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	13
Partie 1 : Modifications post-traductionnelles et le facteur de transcription ATF7	15
1. L'expansion du répertoire protéique – Les modifications post-traductionnelles	15
A. La phosphorylation	15
i. La famille des MAP kinases	15
ii. Autres familles de protéines kinases	18
B. La SUMOylation	18
2. La protéine ATF7	23
A. Activation de la transcription	25
B. Répression de la transcription	27
C. Le variant d'épissage alternatif ATF7-4	30
Partie 2 : Le cycle cellulaire	33
1. Les phases du cycle cellulaire	34
2. Le contrôle du cycle cellulaire	38
A. Les CDKs et les cyclines	39
B. Les points de contrôle pour la progression du cycle cellulaire	42
i. La progression dans la phase G1	42
i. La transition G1-S	43
i. La transition S-G2	43
ii. La transition G2-M	44
iii. Les CDKs sont-elles toutes essentielles ?	45
C. Induction du cycle cellulaire par les facteurs de croissance	50
i. Les facteurs de croissance mitogènes : La voie de signalisation de l'EGF	52
ii. Les facteurs de croissance mitogènes : La voie de signalisation Wnt	55
D. Régulation négative du cycle cellulaire	57
i. Les inhibiteurs de CDKs	58
ii. La voie TGF β	59
iii. Les points de contrôle du cycle cellulaire ou « Checkpoints »	61
3. Disfonctionnements de la régulation du cycle cellulaire : les cancers	67
Partie 3 : La sélection d'anticorps recombinants	68

1.	Structure et format des anticorps	68
A.	La structure des Immunoglobulines G	68
B.	Le format scFv	69
2.	La méthode de sélection d'antigènes présentés par des phages	71
A.	Le phage M13	71
B.	La sélection par la méthode du « phage display »	73
i.	L'expression des scFvs à la surface des phages	73
ii.	La sélection des scFvs d'intérêt	75
OBJECTIFS DE LA THESE		77
RESULTATS		79
Partie 1 : Création d'outils d'étude des modifications post-traductionnelles d'ATF7		79
1.	La sélection de scFvs contre les protéines ATF7 et SUMO.	80
A.	Purification des protéines cibles	80
B.	La sélection de scFvs	81
C.	Le criblage des clones sélectionnés	85
2.	La construction des séquences qui permettent d'augmenter la valence des scFvs	88
A.	Les hélices chargées	88
B.	Le domaine de tétramérisation de la protéine p53	95
3.	La sumoylation de la protéine ATF7	99
A.	L'utilisation d'un kit de sumoylation	99
B.	Sumoylation à l'aide d'extraits bactériens	100
C.	La sumoylation <i>in vivo</i> en système bactérien	102
Partie 2 : Etudes des modifications post-traductionnelle de la protéine ATF7		106
1.	La phosphorylation de la T112 au cours de la mitose	106
2.	Etude de la croissance cellulaire et des mécanismes de résistance et de migration des cellules	107
A.	La croissance des cellules	107
i.	Surexpression d'ATF7 et croissance des cellules	107
ii.	Le phénotype de croissance est-il lié à la transcription ?	111
B.	Résistance et migration des cellules	117
3.	La phosphorylation de la serine 111 de la protéine ATF7	125
DISCUSSION		129
1.	Projet n°1 : le développement de nouveaux outils permettant l'étude de la sumoylation de la protéine ATF7.	129
A.	La sumoylation de protéines :	129
B.	La sélection de scFv :	130
C.	L'utilisation d'hélices chargées pour dimériser des scFv :	130

D.	La formation de scFvs sous forme de tétramères :	131
2.	Projet n°2 : L'étude de la relation de la protéine ATF7 avec le cycle cellulaire et des modifications post traductionnelles associées.	134
E.	La phosphorylation de la T112 durant la mitose	134
F.	La protéine ATF7 et la croissance des cellules	136
G.	Les mutants de la protéine ATF7-4 ont un avenir prometteur	137
H.	La migration et la résistance des cellules lorsqu'ATF7 est surexprimée	138
I.	Conclusions personnelles.	139

REFERENCES----- 140

ANNEXES----- 157

1.	La thréonine 34 de la protéine ATF7	157
2.	Validation des anticorps dirigés contre la forme non phosphorylée de la T112.	161

TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1 : La voie d'activation des MAP kinases.....	17
Figure 2 : Les structures tridimensionnelles de l'ubiquitine et de la protéine SUMO1.....	19
Figure 3 : Alignement protéique de l'ubiquitine et des protéines SUMO1-4.	20
Figure 4 : La voie enzymatique de sumoylation des protéines.....	21
Figure 5 : Les domaines conservés des protéines de la famille b-ZIP.....	24
Figure 6 : Modèle d'activation de la protéine ATF7.	26
Figure 7 : Les complexes de remodelage de la chromatine qui impliquent SETDB1 et SUMO.	27
Figure 8 : ATF7 et la répression de la transcription.....	29
Figure 9 : Rôle et interrelations des modifications post-traductionnelles d'ATF7.	30
Figure 10 : Les différentes isoformes de la protéine ATF7.....	31
Figure 11 : Modèle de rétention des kinases par la protéine ATF7-4.....	32
Figure 12 : La prolifération à l'encontre de la différenciation.	34
Figure 13 : Le cycle cellulaire de la mitose.....	35
Figure 14 : Les étapes de la mitose.	37
Figure 15: L'évolution des CDKs chez les Eucaryotes première légende qui complète admirablement ce qui est décrit dans le texte).	40
Figure 16 : La progression de la phase G1 précoce à la phase G1 tardive.....	44
Figure 17 : Les délétions multiples des CDKs chez la souris.....	47
Figure 18 : Comparaison du cycle cellulaire de la levure et des mammifères.	50
Figure 19 : La voie de signalisation de l'EGF.....	54
Figure 20 : La voie de signalisation Wnt/ β caténine.	56
Figure 21 : La réponse des dommages à l'ADN de type cassure double brin (DSB).....	62
Figure 22 : Le point de contrôle d'entrée en mitose.....	66
Figure 23 : La structure tridimensionnelle et l'organisation d'une immunoglobuline G (IgG).	69
Figure 24 : Représentation schématique des différents formats d'anticorps.	70
Figure 25 : La structure et le cycle de vie du bactériophage M13.	72
Figure 26 : Les cycles de sélection de scFv par la stratégie du « phage display ».	75

Figure 27 : Présentation de la stratégie de « phage display » utilisée	81
Figure 28 : Profil du nombre de phage élués à chaque cycle de sélection pour chacune des sélections	83
Figure 29 : Analyse de la qualité globale du pool de phages-scFvs	84
Figure 30 Analyse individuelle des scFvs issus des sélections	85
Figure 31 : Analyse individuelle des scFvs issus des sélections – résultats	86
Figure 32 : Les hélices chargées utilisées pour dimériser des scFvs.	89
Figure 33 : Les constructions qui permettent l’expression des scFvs en fusion avec les hélices.	90
Figure 34 : Analyses par « western blot » de l’expression des fusions scFvs-hélices.	91
Figure 35 : Purification des scFvs-hélices sur colonne de Ni-NTA agarose.....	93
Figure 36 : Analyse fonctionnelle de la capacité de reconnaissance des fusions scFv-hélices par ELISA.	94
Figure 37 : Le domaine de tétramérisation de la protéine p53 et les mutants.....	95
Figure 38 : Expression des scFvs fusionnées aux domaines de tétramérisation de p53 mutés	96
Figure 39 : Purification des scFvs fusionnés aux domaines p53_{tet} mutés.....	97
Figure 40 : Purification des scFvs fusionnés aux p53_{tet} mutés en absence d’imidazole dans le tampon de fixation.	97
Figure 41 : Reconnaissance des protéines ATF7 et ATF7-SUMO par les scFvs fusionnés aux domaines p53_{tet}.....	98
Figure 42 : Stratégies mises en place pour sumoyler la protéine ATF7.....	99
Figure 43 : Tests de sumoylation de la protéine ATF7 à l’aide du kit de sumoylation.	100
Figure 44 : Tests de sumoylation de la protéine ATF7 avec des extraits bactériens qui surexpriment les enzymes E1, E2 et la protéine S1.....	101
Figure 45 : Combinaison des stratégies 1 et 2 pour établir un système de sumoylation in vitro fonctionnel.	102
Figure 46 : Co-expression de la protéine ATF7-1 et la machinerie de sumoylation.	103
Figure 47 : Purification des protéines sumoylées.	105
Figure 48 : Croissance des cellules XLP-ATF7	107
Figure 49 : Comparaison du cycle cellulaire de cellules XLP-ATF7 et XLP-CARM1	109
Figure 50 : Croissance des cellules Mel501 et des lignées dérivées	110

Figure 51 : Comparaison du cycle cellulaire de cellules Mel501 et Mel-ATF7	111
Figure 52 : Croissance des cellules Mel501 en milieu compensé par des surnageants de culture.	112
Figure 53 : L'inhibition de la phosphorylation des résidus T51 et T53 d'ATF7 par les mutants de la protéine ATF7-4.	114
Figure 54 : Inhibition de l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 par la protéine ATF7-4 et les mutants KR, RK et RR.	115
Figure 55 : Croissance des cellules Mel501 en présence de la protéine ATF7-4	116
Figure 56 : Tests de clonogénicité des cellules Mel501 et Mel ATF7 C2xx dans différentes conditions.....	118
Figure 57 : Tests de clonogénicité des cellules Mel501 et Mel ATF7 C2xx traitées aux UVs	119
Figure 58 : Tests de cicatrisation des cellules Mel501	121
Figure 59 : Tests de cicatrisation des cellules Mel ATF2	122
Figure 60 : Tests de cicatrisation des cellules Mel ATF7-2	123
Figure 61 : Tests de cicatrisation des cellules Mel ATF7-1 C2xx	124
Figure 62 : Phosphorylation d'ATF7 pendant le phénomène de cicatrisation	125
Figure 63 : Phosphorylation de la T112 d'ATF7 sauvage et mutant	126
Figure 64 : Reconnaissance des peptides par l'anticorps 2F3.....	127
Figure 65 : Résumé du projet de développement de nouveaux outils.	133
Figure 66 : La phosphorylation de la protéine ATF7 au cours du cycle cellulaire.	136
Figure 67 : Localisation subcellulaire de la protéine ATF7 et des mutants de la région T34.	158
Figure 68 : Reconnaissance des peptides PC3 et PL13 par différents anticorps	159
Figure 69 : Validation des anticorps dirigés contre la forme non phosphorylée de la T112	161
Tableau 1 : Durée des phases du cycle cellulaire de cellules HeLa en culture en conditions optimales.	36
Tableau 2 : Conditions de purification des protéines utilisées pour les sélections par phage display	80

Tableau 3 : Résultats de l'ensemble des sélections	82
Tableau 4 : Présentations de certains scFvs issus de la banque utilisée.	87
Tableau 5 : Les souches bactériennes utilisées pour l'expression des fusions scFvs-hélices90	

TABLE DES ABREVIATIONS

ARN : Acide RiboNucléique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ADP-ribose : Adénosine Di-Posphate associée à un ribose

SUMO : Small Ubiquitin-like MOdifier

pb : paire de base

miRNA : micro-RNA

snRNA : small nuclear-RNA

GTF : Facteur général de la transcription

TBP : protéine liant la boîte TATA

TAF : facteur associé à la TBP

NTP : riboNucléosides Triphosphates

pol II : ARN polymérase II

PIC : complexe de pré-initiation de la transcription

Inr : motif initiateur du promoteur minimal

DPE : élément promoteur aval

MTE : motif dix éléments

BRE^{u/d} : Motif reconnu par TFIIB (amont ou aval)

DCE : élément en aval du promoteur minimal

ATF : Activating transcription factor

HAT : Histone acetyl transferase

HDAC : Histone De-ACetylase

SWI/SNF : switching/sucrose non fermenting

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MAPKK ou MAP2K : mitogen-activated protein kinase kinase

MAPKKK ou MAP3K : mitogen-activated protein kinase kinase kinase

IL-1 : interleukine 1

TNF α : facteur nécrosant les tumeurs alpha

JNK : Jun N-terminal Kinase

S : résidu sérine

T : résidu thréonine

Y : résidu tyrosine

SENp : Sentrin-specific protease

Ubc9 : Ubiquitin-Conjugating Enzyme 9+

E1 : enzyme d'activation

E2 : enzyme de conjugaison

E3 : protéine ligase

NDSM : Negatively charged amino acid-dependant Sumoylation Motif

PIAS : Protein Inhibitor of Activated STAT

PDSM : Phosphorylation-Dependant Sumoylation Motif)

SIM : motif d'interaction aux protéines SUMO

b-ZIP : motif riche en acide aminés basiques suivi d'une glissière à leucines

Cter : extrémité carboxy-terminale

Nter : extrémité amino-terminale

CRE : cyclic AMP responsive element

TRE TPA responsive element

ZF : motif replié en doigt capable de lier du zinc

UV : rayonnement ultraviolet

K : résidu lysine

MCAF1 : MBD1-containing Chromatin Associated Factor

mAM : murine ATF7 Modulator

H3K9me3 : Lysine 9 de l'histone H3 qui est triplement méthylée

IPs : Induced pluripotent cells

Cellules ES : Cellules souches embryonnaires

N : génome haploïde

2N : génome diploïde

S (phase) : phase de réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire

M (phase) : phase de la division cellulaire lors du cycle cellulaire

APC/C : Anaphase-Promoting Complexe / Cyclosome

CDK : cycline dépendante des kinases

KO : knock out, individu ou animal ne possédant pas le gène indiqué suite à une manipulation génétique.

HCG : hormone coriono-gonadique

TGF β : Transforming Growth Factor beta

RTK : récepteur tyrosine kinase

EGF : epithelial growth factor

GDP : Guanine Di-phosphate

GTP : Guanine Tri-phosphate

CK1 : Caséine kinase 1

Fz : la protéine Frizzled

Dvl : la protéine Dishevelled

CSP : cellules souches progéniteurs

DSB : cassure double brin de l'ADN

ROS : Reactive Oxygene Species

DDR : DNA Damage Response

NHEJ : Non-Homologous End-Joining

HDR : Homology Directed Repair

HP1 hétérochromatine protein 1

Ni-Co-NTA : Nickel- Cobalt- Nitrilo triacetic acid

INTRODUCTION

La biologie est la discipline qui étudie le vivant, du grec *bios* (la vie) et *logos* (l'étude). La plus petite unité morpho fonctionnelle vivante est la cellule. Elle est la base de la vie et permet l'élaboration d'organismes plus ou moins complexes allant des organismes unicellulaires à ceux qui en possèdent une multitude, (10^{13} chez l'Homme (Bianconi et al., 2013)). La vie d'un organisme vivant dépend du contrôle de son homéostasie, mais aussi de sa capacité à se reproduire. Pour pallier à ses besoins, un organisme contrôle son métabolisme, son développement, mais il doit aussi être capable de répondre aux stimuli extérieurs et d'évoluer pour s'adapter aux changements d'environnement. Les organismes multicellulaires vont donc contrôler le devenir de leurs cellules, certaines seront vouées à proliférer, d'autres à être quiescentes ou encore se spécialiser (différencier) et sortir du cycle cellulaire, d'autres entreront en apoptose ou deviendront sénescents.

Afin de maintenir leur homéostasie, d'assurer les différentes tâches nécessaires à leur propre maintenance, mais aussi à assurer leur descendance, les organismes ont besoin de molécules effectrices. Les protéines sont un des types de molécules qui assurent ces fonctions.

Chez les eucaryotes, deux principaux mécanismes co-existent afin d'augmenter la diversité de protéines à partir d'un nombre restreint de gènes. D'une part, l'épissage alternatif permet de donner naissance à plusieurs ARN messagers (ARNm) matures à partir d'un seul ARN pré-messager. D'autre part, les protéines synthétisées vont subir des modifications par ajout de petits composés (phosphates, groupements méthyle, ADP-ribose, Acétyl...) ou par ajout de protéines (Ubiquitine, protéines SUMO). Celles-ci sont nommées modifications post – traductionnelles du fait qu'elle interviennent après la synthèse des protéines (Bairoch and Apweiler, 2000; Nørregaard Jensen, 2004). Ces modifications vont permettre à ces protéines d'acquérir de nouvelles fonctions et d'influer sur leur activité, leur capacité d'interaction, leur stabilité ou leur localisation au sein de la cellule. La cellule sera alors capable de répondre de manière rapide face à un stress ou un signal extracellulaire (prolifération, différenciation, apoptose) sans avoir à synthétiser un nouveau protéome. Les modifications post-traductionnelles ne sont pas uniquement la résultante de stress ou de

signaux extracellulaires, mais apparaissent (subviennent) aussi au cours du cycle cellulaire (Trinh et al., 2013; Vermeulen et al., 2003). Afin d'assurer un déroulement optimal du cycle cellulaire, certaines protéines doivent être activées ou inactivées à des phases spécifiques. De nombreuses protéines sont modifiées au cours du cycle cellulaire et les facteurs de transcription ne font pas exception à la règle (Chuang et al., 2012).

Nous verrons succinctement le processus d'expression des gènes car la protéine ATF7 étudiée est un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes. Nous parlerons ensuite des modifications post-traductionnelles ainsi que du cycle cellulaire. Je terminerai sur les anticorps recombinant qui sont des outils développés lors de ce travail.

Partie 1 : Modifications post-traductionnelles et le facteur de transcription ATF7

1. L'expansion du répertoire protéique – Les modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles chez les eucaryotes sont variées et plus de 300 ont été recensées (Kato et al., 1993; Nørregaard Jensen, 2004). On distingue deux catégories majeures de modifications post traductionnelles i) le clivage de la chaîne principale de la protéine cible de manière auto-catalytique ou par des protéases ; ii) l'adjonction de groupements ou de protéines sur les chaînes latérales des acides aminés cibles. Nous décrivons uniquement cette deuxième catégorie.

A. La phosphorylation

La phosphorylation est le transfert d'un groupement phosphate sur un résidu sérine (S), thréonine (T) ou tyrosine (Y) cible. Le phosphate transféré sur la protéine cible provient de molécules d'adénosine triphosphate (ATP) et la réaction est catalysée par une enzyme appelée kinase. Les kinases sont très nombreuses chez l'homme et l'ensemble de celles-ci dénommé le kinome, regroupe plus de 500 membres (Bartek et al., 2004; Cimprich and Cortez, 2008; Kastan and Bartek, 2004; Manning, 2005). Au vu de la diversité des protéines kinases, il n'est pas possible d'établir un modèle de fonctionnement global qui tienne compte de la spécificité de chacune des kinases, ni de la globalité des substrats. Nous allons donc nous focaliser sur deux familles en rapport avec le facteur de transcription ATF7.

i. La famille des MAP kinases

Propriétés

Les MAP kinases (mitogen-activated protein kinase ou MAPK) sont des sérine/thréonine kinases. Ces MAPK sont activées par une cascade de phosphorylations en réponse à un stimulus intra ou extra cellulaire, qui conduit à une réponse biologique spécifique, telle la prolifération, la différenciation, la migration ou l'apoptose. Chez l'homme, les MAPK sont divisées en six groupes, dont les kinases p38.

Les MAPK de la famille p38

Elles sont capables d'être activées suite à une stimulation par des lipopolysaccharides (LPS) (Han et al., 1993) ou à un choc osmotique (Han et al., 1994) et ont été isolées dans des cellules immunitaires où elles permettent la régulation de l'expression de cytokines inflammatoires telles l'interleukine 1 (IL-1) et le TNF α (tumor necrosis factor).

La famille p38 comprend quatre kinases codées par des gènes distincts, p38 α , p38 β (aussi nommée p38 β_2), p38 γ et p38 δ (Enslin, 1998; Wang, 1997). Les différentes p38 diffèrent par leur profil d'expression, leurs activateurs et leurs substrats. Elles ne possèdent que 60% d'identité, suggérant qu'elles exercent des fonctions diverses (Raman et al., 2007). Les kinases p38 α et β_2 sont exprimées de manière ubiquitaire bien que p38 α soit plus fortement exprimée que p38 β_2 . Ces deux kinases sont sensibles aux inhibiteurs dérivés de pyridinyl imidazole comme le SB203580 (Wagner and Nebreda, 2009). Parallèlement, p38 γ et δ ne sont exprimés que dans certains tissus (Thornton and Rincon, 2009; Zarubin and Han, 2005). Par exemple, dans le sang, les macrophages expriment p38 γ alors que les granulocytes expriment p38 δ (Korb et al., 2006).

Cascade d'activation

L'activation des kinases p38 est une succession d'évènements complexes. Le point initial est un stimulus intra- ou extra-cellulaire qui provient de cytokines pro inflammatoires (IL1, TNF α), de facteurs de croissance, d'une irradiation aux ultraviolets ou encore d'un stress oxydatif ou osmotique (Ono and Han, 2000; Pietersma et al., 1997; Rouse et al., 1994).

Les voies de signalisations spécifiques qui seront activées vont alors mettre en scène des protéines G telles Rac et Cdc42 qui s'associeront à des S/T kinases appelées MAP kinase kinase kinase (MAPKKK ou MAP3K) (Raman et al., 2007; Roux and Blenis, 2004; Wagner and Nebreda, 2009). Les MAP3Ks seront alors activées et phosphoryleront ensuite des MAP2Ks, qui à leur tour phosphoryleront les MAPKs au niveau d'un motif TXY (thréonine – acide aminé quelconque – tyrosine) présents dans leur boucle d'activation. Pour les kinases p38, l'acide aminé X est une glycine (Zhou, 2002). Les MAPK vont alors pouvoir phosphoryler leurs substrats. (Figure 1).

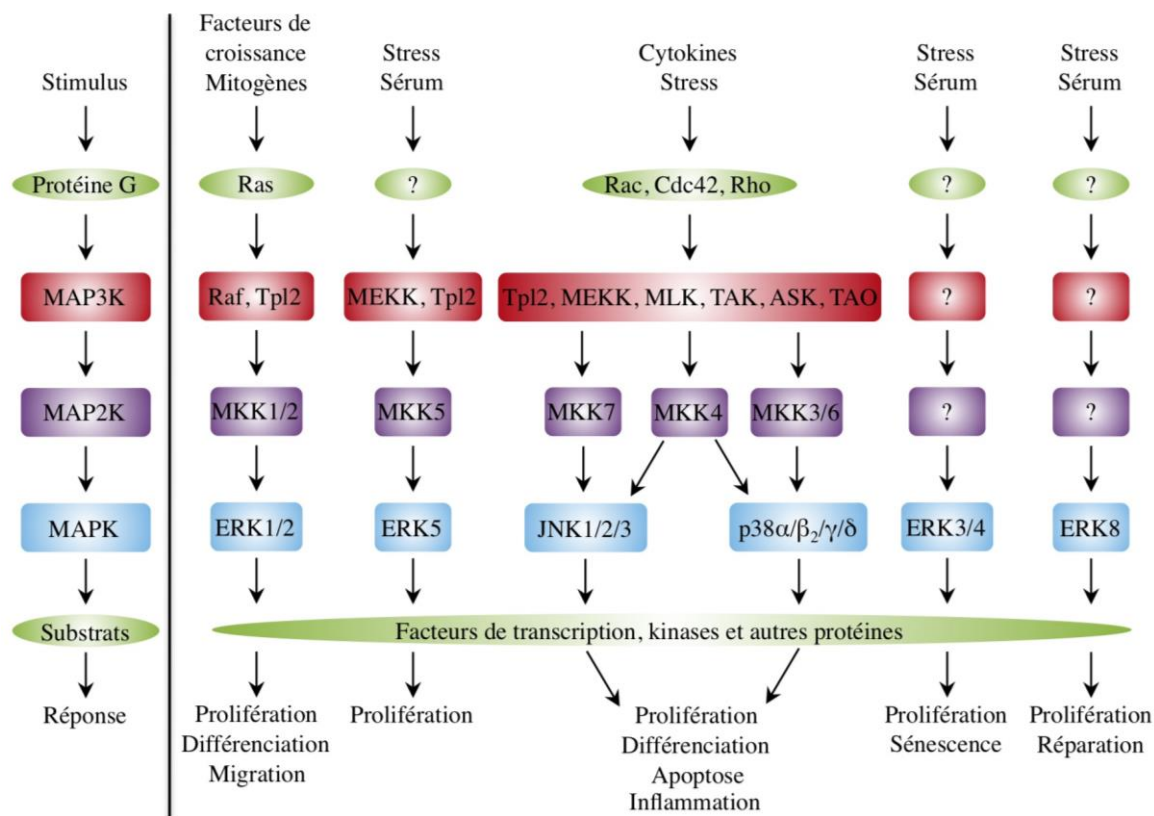


Figure 1 : La voie d'activation des MAP kinases.

Les MAP kinases permettent aux cellules de répondre à de nombreux stimuli extracellulaires. Pour cela des récepteurs membranaires répondent aux différents signaux, ce qui active les protéines G associées, qui, à leur tour déclenchent les cascades de phosphorylation des MAP kinases. Les MAP3K sont ainsi phosphorylées, et activent à leur tour les MAP2K et ainsi les MAPK pour conduire à la phosphorylation de nombreux substrats. Les substrats activés peuvent être des facteurs de transcription, des protéines kinases ou encore d'autres protéines. Il en résulte alors une réponse biologique adaptée à chaque stimulus. D'après (Abe et al., 2002; Dhillon et al., 2007; Hazzalin et Mahadevan, 2002; Lee et al., 1995). Pour un exemple de voie de MAP kinases précise voir la figure 19 qui décrit la voie de signalisation de l'EGF.

Notons que toutes les MAP3K n'activent pas toutes les MAP2K, elles-mêmes spécifiques de certaines MAPK. Ceci permet une spécificité de réponse bien que certaines MAP3K soient aussi retrouvées dans les cascades d'activation d'autres familles de MAPK telles les JNK (Jun N-terminal Kinase)

Substrats des p38

Les kinases p38 sont capables d'activer un nombre important de substrats qui possèdent un motif S/T suivi d'une proline (S/TP), comme certains facteurs de transcription ou d'autres kinases.

Beaucoup de facteurs de transcription sont des cibles majeures de kinases et permettent à la cellule de répondre de manière adaptée à un stimulus (Zarubin and Han, 2005). Un des groupes de facteurs régulés par les kinases p38 sont les protéines formant les complexes AP1 comme les protéines c-Jun, c-Fos, ATF2 et ATF7 qui peuvent s'homo ou de s'hétérodimériser afin d'activer ou d'inhiber la transcription de gènes cibles. Nous reparlerons de certains de ces facteurs dans la partie qui leur est dédiée.

ii. Autres familles de protéines kinases

Les kinases dépendantes des cyclines ou CDKs (pour cyclin dependent kinases) sont une famille de kinases dont certaines ont un rôle primordial dans la régulation fine du cycle cellulaire (Huang et al., 2007). Nous discuterons plus en détail des CDKs dans la partie qui traite du cycle cellulaire.

Nous parlerons aussi des protéines kinases associées aux récepteurs membranaires qui permettent de relayer le signal extracellulaire (porté par les facteurs de croissance par exemple) pour conduire à la transcription de gènes cibles.

B. La SUMOylation

Une grande partie des protéines de la cellule peuvent être modifiées par l'ajout covalent d'une protéine. Le mécanisme de modification de protéines par l'ajout d'une protéine ubiquitine (monoubiquitinylation) ou de plusieurs ubiquitines (polyubiquitinylation) qui forment alors une chaîne branchée sur le résidu modifié est bien connu. Cependant, d'autres protéines peuvent être ajoutées comme la protéine Nedd (neddylation) et les protéines de la famille SUMO (sumoylation).

La famille SUMO (pour Small Ubiquitin-like MOdifier) comprend actuellement quatre membres. Les protéines SUMO1-4 sont constituées d'environ cent acides aminés (Kamitani, 1998; Lapenta et al., 1997; Mannen et al., 1996) exprimées de manière ubiquitaire (Xu and Au, 2005), à l'exception de SUMO4 qui n'est retrouvée que dans le rein et la rate (Bohren, 2004; Guo et al., 2004). La structure tridimensionnelle de la protéine SUMO1 et de l'ubiquitine sont très similaires (figure 2). Ces protéines possèdent une structure globulaire formée de cinq feuillets β et deux hélices α ainsi qu'une extension C-terminale. Les protéines SUMO présentent également une extension N-terminale flexible d'une vingtaine d'acides

aminés. Cette extension est fortement chargée et jouerait un rôle dans les interactions protéine-protéine mais aussi comme site de branchement pour l'élaboration de chaînes de poly-SUMO (Bayer et al., 1998).

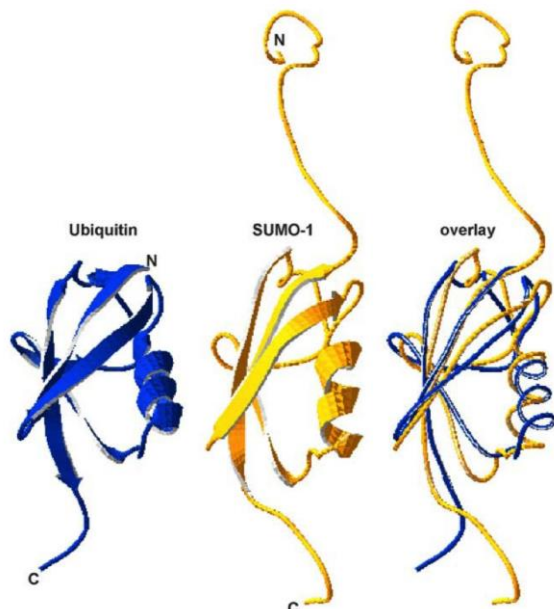


Figure 2 : Les structures tridimensionnelles de l'ubiquitine et de la protéine SUMO1.

Les deux protéines possèdent une structure tridimensionnelle globulaire avec une extension C-terminale. Cette extension se termine chez les protéines matures par le motif di-glycine leur permettant d'être conjuguées aux substrats. La protéine SUMO1 possède une extension N-terminale supplémentaire flexible de fonction inconnue. La structure de l'ubiquitine a été déterminée par diffraction aux rayons X, tandis que celle de SUMO-1 a été résolue par RMN en solution. Identifiants de la Protein Data Bank (PDB) : 1UBQ et 1A5R respectivement. D'après (Bayer et al., 1998); Dohmen, 2004; Vijay-Kumar et al., 1987).

Cependant, les protéines SUMO présentent une identité de séquence inférieure à 20% avec l'ubiquitine. De même, les protéines SUMO ne sont pas identiques entre-elles (figure 3). SUMO1 est la protéine qui diverge le plus et présente moins de 50% d'acides aminés en commun avec les trois autres. Nous pouvons constater que les protéines SUMO2, 3 et 4 possèdent un site de sumoylation (que nous verrons dans la section suivante) indiquant qu'elles peuvent être elles-mêmes sumoylées et ainsi former de chaînes de protéines SUMO à l'instar de l'ubiquitine. Le motif di-glycine, situé dans la région C-terminale des protéines ubiquitine et SUMO, peut-être clivé pour donner naissance aux protéines matures qui seront conjuguées. La protéine SUMO1 est majoritairement retrouvée associée aux protéines contrairement à SUMO2/3 qui sont principalement libres. Cependant, suite à un stress cellulaire, les protéines SUMO2/3 sont rapidement conjuguées à leurs

substrats (Matunis et al., 1996; Saitoh, 2000). La protéine SUMO4 n'est pas maturée, et ne peut donc être conjuguée aux protéines à cause d'une proline en amont du site di-glycine, mais une étude isolée a montré qu'elle est capable d'exercer des liaisons non covalentes avec les protéines (Owerbach et al., 2005).

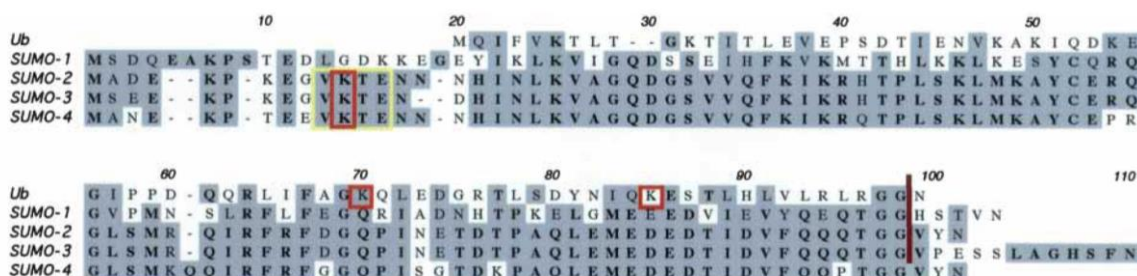


Figure 3 : Alignement protéique de l'ubiquitine et des protéines SUMO1-4.

Les trois protéines SUMO possèdent une extension N-terminale absente chez l'ubiquitine. Nous pouvons remarquer le site de maturation à l'extrémité C-terminale des protéines (barre rouge verticale) qui est clivé pour donner naissance aux protéines conjuguables. SUMO4 n'est pas clivé, ni retrouvée conjuguée sur d'autres protéines. L'ubiquitine peut être ubiquitinylée sur les résidus lysines encadrés en rouge permettant l'élaboration de chaîne de poly-ubiquitine. Les protéines SUMO peuvent être sumoylées pour former des chaînes SUMO, et la lysine modifiée est encadrée en rouge, et le cadre jaune montre le site de sumoylation. Celui-ci est absent chez SUMO1.

A l'instar de la voie de l'ubiquitinylation, la sumoylation met en jeu une cascade d'enzymes (figure 4) (Verger et al., 2003) qui catalysent des réactions permettant la maturation de SUMO, son activation, sa conjugaison, son transfert sur la protéine cible et qui peuvent aussi induire le clivage permettant de retirer SUMO des protéines cibles.

1. La maturation des protéines SUMO est réalisée par clivage protéolytique directement en aval du site di-glycine en position C-terminale de la protéine. Ce clivage est réalisé par des protéases de la famille SENP (pour SENTrin-specific Protease car un des noms précédents des protéines SUMO fut Sentrin provenant de sentry pour « sentinelle » car sa surexpression protège les cellules de la signalisation par Fas qui induit l'apoptose) (Yeh et al., 2000).
2. L'activation des protéines SUMO est réalisée par un hétérodimère des protéines SAE1/SAE2 (pour Sumo-Activating Enzyme 1 et 2) communément appelée E1. Une molécule d'ATP est hydrolysée par SAE1 pour former une liaison thioester entre le dernier résidu glycine de SUMO et une cystéine catalytique de SAE2 (Desterro, 1999).

3. La protéine SUMO activée est ensuite transférée sur UBC9 (Ubiquitin-Conjugating Enzyme 9), l'unique enzyme de conjugaison E2 et forme une liaison thioester via une cystéine. Puis UBC9 va directement transférer la protéine SUMO sur un groupement amine primaire d'un résidu lysine de la protéine cible et former une liaison isopeptidique covalente. Les enzymes E1 et E2 sont nécessaires et suffisantes pour la sumoylation *in vitro*, mais dans la cellule une troisième enzyme est nécessaire pour permettre la reconnaissance de la protéine à modifier (Desterro et al., 1997).
4. Les enzymes E3 ligases tissent le lien entre la protéine Ubc9 et les protéines cibles. Elles sont capables de reconnaître et de se lier à la fois aux deux partenaires. De ce fait, il est aisé de concevoir qu'une grande diversité de protéine E3 ligases existe afin de discriminer entre les différents substrats selon la situation (Johnson, 2004).
5. Les protéines de la famille SENP qui activent les protéines SUMO sont aussi celles qui dégradent la liaison isopeptidique qui lie SUMO aux protéines cibles. Ce phénomène est nommé désomoylation. Les protéines SUMO ainsi recyclées peuvent être utilisées à nouveau pour modifier une autre protéine cible (Yeh, 2008).

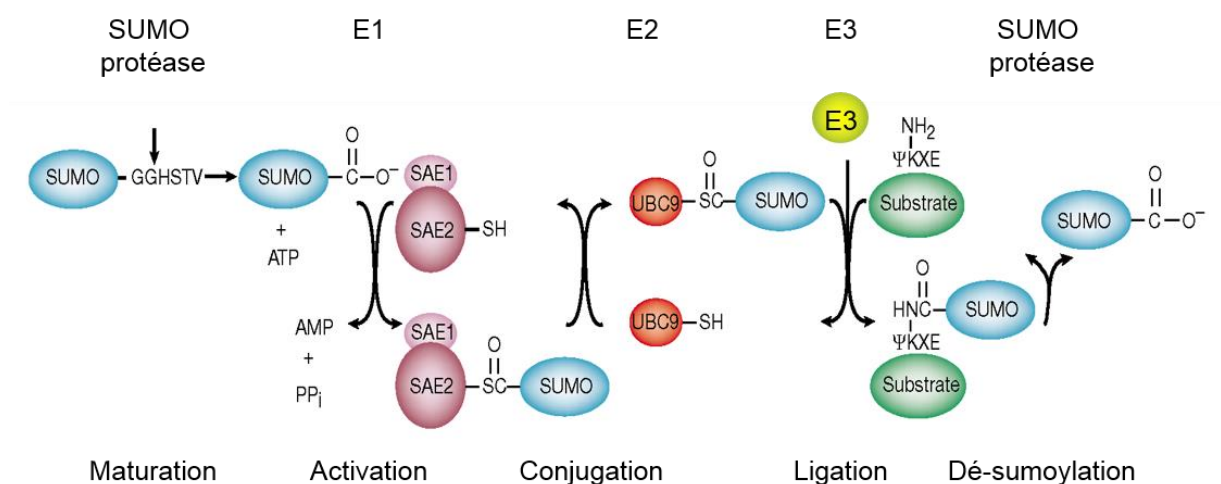


Figure 4 : La voie enzymatique de sumoylation des protéines.

Les protéines SUMO subissent une maturation par les SUMO protéases afin de cliver l'extrémité C-terminale libérant un motif di-glycine. Une enzyme de la voie de sumoylation dite enzyme d'activation E1 crée une liaison covalente entre le C-terminale de SUMO et un groupement sulfate d'une de ses cystéines. L'enzyme E1 de la voie SUMO est constituée de deux sous unités SAE1 et SAE2. SAE2 fixe SUMO alors que SAE1 hydrolyse de l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire à la formation de la liaison covalente. SUMO est transféré l'enzyme de conjugaison E2 qui forme aussi un intermédiaire lié covalamment à SUMO. *In vivo*, une enzyme E3 ligase est nécessaire pour permettre le recrutement de la protéine cible et la conformation du complexe accroissant ainsi fortement l'efficacité de la réaction. Les protéines peuvent aussi être désomoylées par les mêmes SUMO-protéases qui permettent la maturation de SUMO permettant ainsi le recyclage de SUMO déjà maturé.

La sumoylation n'intervient pas sur toutes les lysines accessibles des protéines. Les lysines modifiées appartiennent à une séquence consensus formée d'un résidu hydrophobe (ϕ), la lysine modifiée (K), un acide aminé quelconque (x) et un acide glutamique (E) (Johnson and Blobel, 1999). Ce motif est nécessaire pour l'interaction avec Ubc9 et suffisant pour un substrat artificiel *in vitro* et *in vivo* (Lin, 2002; Rodriguez, 2000; Sampson, 2001). La liaison de E2 avec la protéine cible est renforcée par la présence d'un motif riche en acides aminés chargés négativement (NDSM pour Negatively Charged Amino acid-dependent sumoylation motif) (2014a).

Les protéines SUMO-E3 ligases sont divisées en deux sous familles : i) Les protéines Siz/PIAS (pour Protein Inhibitor of Activated STAT) qui possèdent un domaine apparenté au domaine RING de certaines Ubiquitine-E3 ligases (Kotaja et al., 2002) et ii) les protéines Pc2 et RanBP2. La protéine Pc2 appartient au complexe polycomb impliqué dans la répression transcriptionnelle et la méthylation des histones (Kagey et al., 2005). La protéine RanBP2 est un composant du pore nucléaire. Elle possède un domaine interne de 50 acides aminés répété deux fois qui possède une activité E3 ligase. La protéine E2 de la voie SUMO, Ubc9 se lie à ce domaine répété ainsi que la protéine RanGAP1 sumoylée (Pichler et al., 2002). La protéine ATF7 est aussi une cible sumoylée par le complexe RanBP2-Ubc9, modification qui a comme conséquence d'inhiber son activité transcriptionnelle (Hamard et al., 2007).

La sumoylation des protéines est influencée par les autres modifications post-traductionnelles. Par exemple, la phosphorylation peut avoir un effet positif ou négatif selon la protéine cible. Les facteurs de transcription c-Jun et c-Fos sont moins sumoylés lorsqu'ils sont phosphorylés dans leur domaine activateur (Bossis et al., 2005). Il en est de même pour le facteur de transcription ATF7 qui est désumoylé puis phosphorylé au niveau de son domaine activateur suite à un stress cellulaire (Hamard et al., 2007). Le facteur de transcription MEF2 quant à lui présente une sumoylation accrue lorsqu'un résidu sérine adjacent au site de sumoylation est phosphorylé (Gregoire, 2006). Un tel site est nommé PDSM (pour Phosphorylation-Dependent Sumoylation Motif) et le site consensus est ϕ KxExxSP ou nous retrouvons le motif de sumoylation suivi par deux acides aminés quelconques, la sérine phosphorylée et une proline. Les charges négatives du groupement phosphate permettent un meilleur recrutement d'Ubc9 (Yang and Zhang, 2012). Les modifications qui affectent les lysines peuvent entrer en compétition avec la sumoylation

pour la disponibilité des sites accepteurs. Ainsi, l'acétylation du facteur p300 ou l'ubiquitinylation de la protéine PCNA sont deux exemples de modifications intervenant sur les mêmes lysines que la sumoylation de ces facteurs respectifs (Bouras, 2005; Watts, 2006).

La majorité des protéines sumoylées sont nucléaires et parmi celles-ci, de nombreux facteurs de transcription ou cofacteurs. La sumoylation d'une protéine n'induit pas sa dégradation comme certaines formes de poly-ubiquitinylation, mais cela va plutôt permettre à la protéine d'interagir avec de nouveaux partenaires cellulaires qui possèdent un motif d'interaction avec la protéine SUMO (SIM). Certains facteurs de transcription sumoylés sont capables de recruter des corépresseurs spécifiques au niveau de promoteurs afin d'induire un remodelage de la chromatine conduisant à la répression transcriptionnelle (Garcia-Dominguez and Reyes, 2009). Les protéines modifiées peuvent aussi subir une relocalisation subcellulaire dans les corps nucléaires PML par exemple (Van Damme et al., 2010).

2. La protéine ATF7

La protéine ATF7 (pour Activating Transcription Factor 7) appartient à la grande famille de protéines à motif b-ZIP (pour Basic region and leucine ZIPper) qui sont des facteurs de transcription impliqués dans de nombreux processus cellulaires, notamment la prolifération, la différenciation l'apoptose et la réponse cellulaire au stress et stimuli extérieurs.

Les facteurs de la famille b-ZIP possèdent deux domaines conservés (figure 5) (Chatton et al., 1993; Gaire et al., 1990; Matsuda et al., 1991; Nomura et al., 1993). Le premier domaine nommé b-ZIP est situé dans la région C-terminale des protéines. Il est constitué d'une région riche en acides aminés basiques suivie d'un motif de type glissière à leucines (ZIP). Le motif ZIP permet à ces facteurs de se dimériser. La protéine ATF7 est capable de former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres membres de la famille comme les protéines c-Jun et c-Fos. La région riche en acides aminés basique permet la liaison à l'ADN lorsque la protéine est sous forme dimérique. La protéine ATF7 est capable de lier les éléments d'ADN de type CRE (pour Cyclic AMP Responsive Element) sous forme d'homodimère, alors que sous forme d'hétérodimère avec les protéines c-Jun ou c-Fos, elle se lie à des éléments de type TRE (pour TPA Responsive Element) (Chatton et al., 1994; Masquillier and Sassone-Corsi, 1992; Nomura et al., 1993; Vinson et al., 2002). Ce domaine

contrôle aussi la localisation subcellulaire de ces protéines car il présente un motif de type NLS (Miller, 2009), Goetz et al 1996) .

Le second domaine est situé dans la région N-terminale des protéines de la famille bZIP et constitue le domaine activateur de la transcription. Il comprend un motif en doigt à zinc (ZF pour Zinc Finger) de type C2H2 impliqué dans les interactions protéine-protéine (Chatton et al., 1993 (Nagadoi et al., 1999) ainsi que des résidus thréonines modifiables par phosphorylation et sumoylation comme nous le développerons dans la section suivante. La protéine ATF2 possède une organisation structurale repliée et ce domaine est masqué par son domaine bZIP (Habdell-Hafiz et al., 1993) . Seule la dimérisation permet à la protéine d'adopter une conformation permettant l'activation de la protéine ATF7 (Chatton et al., 1994; Li and Green, 1996) (figure 5).

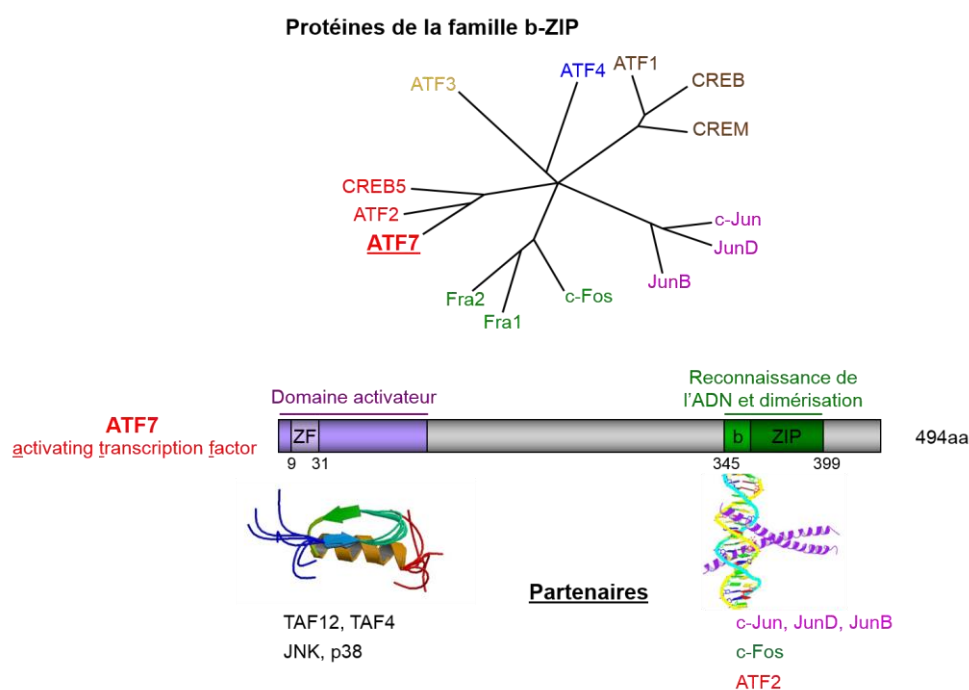


Figure 5 : Les domaines conservés des protéines de la famille b-ZIP.

La protéine ATF7 appartient à la famille des facteurs de transcription à motif bZIP. Ce motif est constitué d'une région riche en acides aminés basiques et intervient dans la reconnaissance de l'ADN et d'un motif en glissière à leucines « Leucin Zipper » qui permet la dimérisation entre protéines de la famille bZIP. Ce domaine est très fortement conservé entre les membres de la famille bZIP. La région amino terminale de la protéine ATF7 possède un motif en doigt à zinc contenu dans une région de la protéine appelée domaine activateur. Ce domaine permet l'interaction avec les protéines de la machinerie transcriptionnelle de base favorisant la transmission du signal d'activation ou de répression de l'expression des gènes. C'est aussi un domaine sur lequel vont se fixer des protéines kinases qui vont phosphoryler des résidus thréonines clés impliqués dans l'activité transcriptionnelle du facteur. Cette région N-terminale est fortement conservée entre la protéine ATF7 et son proche parent ATF2.

La régulation du gène codant pour la protéine ATF7 n'a pas encore été élucidée. Le promoteur de ce gène ne contient pas de boîte TATA, mais il contient des sites de liaison pour les facteurs de transcription Sp1 (Specificity Protein), E2F, NF- κ B, Myc, AP1/2, ainsi qu'un élément de réponse à l'interferon (Goetz et al., 1996).

A. Activation de la transcription

La protéine ATF7 a été caractérisée au départ comme se liant aux éléments CRE de gènes cellulaires et viraux (Gaire et al., 1990; Maekawa et al., 1989; Nomura et al., 1993). Elle est capable de recruter la protéine E1A de l'adénovirus au niveau des promoteurs de gènes cibles. Ceci permet d'activer les gènes viraux et de reprogrammer la cellule pour permettre au virus de se répliquer (Chatton et al., 1993; Liu and Green, 1990; Matsuda et al., 1991). Pour le moment, seuls quelques gènes cibles d'ATF7 sont identifiés. Par exemple, la transcription du facteur de croissance TGF β 2 est activée par ATF7, mais la protéine du rétinoblastome (Rb) annihile complètement cet effet (Gong et al., 1995). L'hétérodimère ATF7/JunD se fixe au niveau de l'enhancer du gène qui code pour la protéine ERBB2 qui est surexprimée dans 20-25% des cancers du sein (Newman et al., 2000). Le gène qui code pour la sélectine E est transcrit lorsqu'on co-exprime les facteurs ATF7 et NF κ B (Kaszubska et al., 1993). La sélectine E est une protéine qui permet l'adhésion des neutrophiles aux vaisseaux sanguins afin qu'ils puissent effectuer la diapédèse pour se rendre au point initiateur de la réaction d'inflammation.

Le mécanisme d'activation de la transcription par la protéine ATF7 a quant à lui été intensivement étudié. L'activité transcriptionnelle du facteur de transcription ATF7 est relayée directement par la machinerie transcriptionnelle de base. Lorsque la protéine ATF7 se fixe au niveau du promoteur de la sélectine E, elle interagit avec la protéine TAF12, une protéine initialement caractérisée comme associée à TAF4 ou TAF4b au sein des complexes TFIID, en fonction du type cellulaire étudié. L'interaction est établie entre le domaine activateur d'ATF7 et le domaine « histone fold » de TAF12 (Hamard et al., 2005). TAF4b est exprimée principalement dans les cellules ovariennes de la granulosa, les lymphocytes B, les hépatocytes et les mélanocytes (Davidson et al., 2005; Dikstein et al., 1996; Gangloff et al., 2000). Lorsque le complexe TFIID contient le facteur TAF4b, l'activité transcriptionnelle d'ATF7 est relayée et la transcription initiée. Cependant lorsque TAF4 est présent, cette

activité n'est pas retrouvée (Hamard et al., 2005). Le mécanisme d'activation de la protéine ATF7 met en jeu de multiples modifications post-traductionnelles suite à un stress cellulaire (traitement aux UVs, choc osmotique). En absence de stress, une fraction des protéines ATF7 qui entrent dans le noyau est maintenue au niveau du complexe de pore nucléaire (NPC) pour y être sumoylée par le complexe Ubc9-RanBP2, sur la lysine 118 (K118R) (Hamard et al., 2007). Un stress cellulaire conduit à la désumoylation de la protéine ATF7, ainsi que sa phosphorylation sur les résidus T53 et T112. Parallèlement la MAP2K MKK6 est activée et phosphoryle la MAPK p38 β 2 dans le cytoplasme, ce qui induit sa translocation vers le noyau où elle peut phosphoryler ATF7 sur la thréonine 51 (T51). C'est sous cette forme que la protéine ATF7 interagit avec TAF12 (Hamard et al., 2005). Il est intéressant de noter que la protéine ATF7 n'est pas phosphorylée sur ces trois résidus tant qu'elle est sumoylée sur le résidu K118, indiquant que ces modifications sont mutuellement exclusives (Camuzeaux et al., 2008) (figure 6).

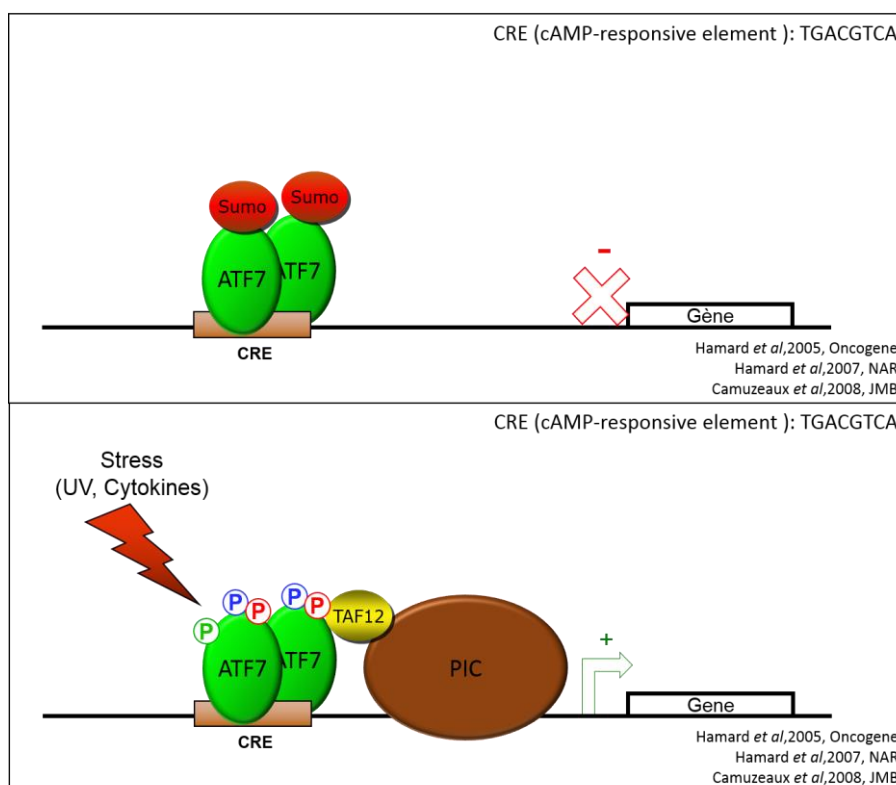


Figure 6 : Modèle d'activation de la protéine ATF7.

En absence de stress la protéine ATF7 est sumoylée sur la lysine 118 ce qui inhibe son activité transcriptionnelle. Suite à un stress (Rayonnement UV, choc osmotique) la protéine ATF7 est désumoylée et phosphorylée sur les résidus thréonines T53, T112 et T51. Ceci lui permet d'interagir avec la protéine TAF12 qui appartient à la machinerie transcriptionnelle de base qui forme le complexe de pré-initiation de la transcription. Cette interaction relaye l'activité transcriptionnelle d'ATF7 pour induire l'expression des gènes cibles.

B. Répression de la transcription

Un crible par la technique du double hybride dans la levure, avec le domaine activateur de la protéine ATF7, a montré que la protéine ATF7 interagit avec la protéine MCAF1 (MBD1-containing Chromatin Associated Factor). Cette protéine a d'abord été appelée mAM (pour murine ATF7 Modulator) chez la souris car elle est capable d'interagir avec la protéine ATF7, conduisant à la perte de l'activité transcriptionnelle (De Graeve et al., 2000a). Le mécanisme qui conduit à la perte d'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 n'est pas connu, cependant plusieurs pistes ont été énoncées.

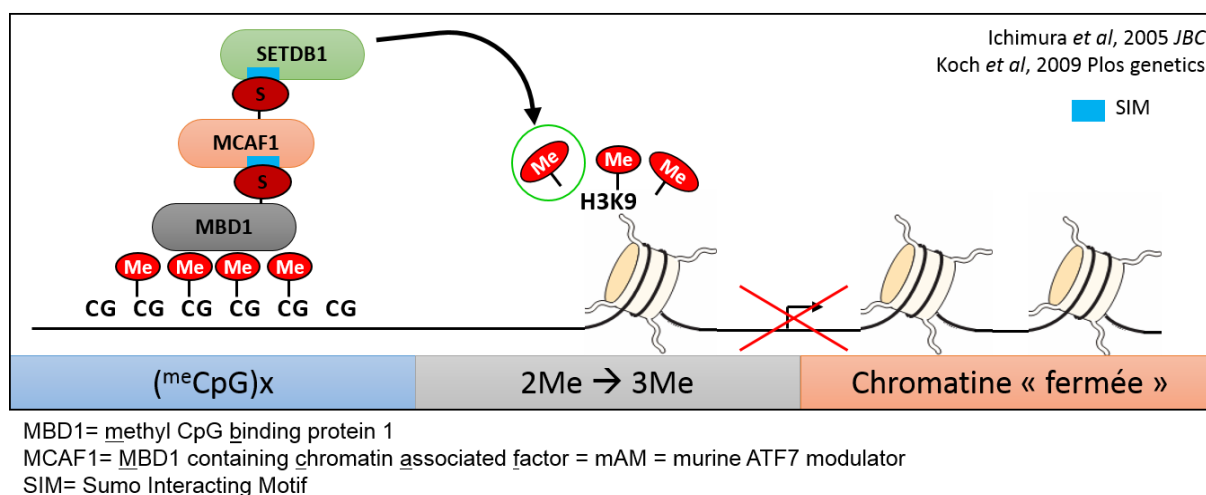


Figure 7 : Les complexes de remodelage de la chromatine qui impliquent SETDB1 et SUMO.

Les régions de l'ADN riches en îlots CpG méthylés permettent le recrutement de la protéine MBD1 qui est sumoylée. Elle est alors reconnue par la protéine MCAF1 qui possède un motif d'interaction avec les protéines sumoylées (SIM). La protéine MCAF1 est elle aussi sumoylée et sert de plateforme pour le recrutement de la protéine SETDB1 via son SIM. SETDB1 est une histone méthyl transférase qui permet l'ajout d'un troisième groupement méthyl sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3). H3K9me3 est une marque de chromatine « fermée » (ou éteinte) non transcrite car cela permet le recrutement de la protéine HP1 qui aide à la condensation de la chromatine.

La protéine MCAF1 est retrouvée associée à la protéine MBD1 (Methyl-CpG Binding Domain Containing Protein) qui reconnaît les îlots CpG méthylés, et y recrute des facteurs qui vont désacétyler les histones et inhiber la transcription des gènes (Fujita et al., 2003). La protéine MBD1 est sumoylée lorsqu'elle est fixée aux îlots CpG méthylés. La protéine MCAF1 possède un motif SIM (SUMO-Interacting Motif) capable de reconnaître la protéine SUMO. La protéine MCAF1 liée à MBD1-SUMO est elle aussi sumoylée ce qui permet le recrutement de la protéine histone acétyle transférase SETDB1 qui possède elle aussi un motif SIM

(Uchimura et al., 2006). SETDB1 catalyse l'étape de triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me2 → H3K9me3). La protéine HP1 est alors recrutée pour induire la formation d'hétérochromatine fermée inerte à la transcription (Ichimura et al., 2005; Wang et al., 2003). De plus, MCAF1 réprime aussi la transcription induite par le facteur de transcription Sp1 en interagissant directement avec lui via ces complexes (Fujita et al., 2003; Ichimura et al., 2005; 2014b). MCAF1 peut aussi avoir un rôle de coactivateur de la transcription lorsque il n'interagit pas avec MBD1 dans les régions du génome hors îlots CpG méthylés où il va alors permettre le recrutement du facteur Sp1 (Figure 7) (Liu et al., 2009).

La protéine ATF7 étant un interactant de MCAF1 ainsi qu'une protéine qui, lorsqu'elle est sumoylée ne présente pas d'activité transcriptionnelle, pourrait éventuellement être impliquée dans ce type de complexes de remodelage de la chromatine. Elle pourrait permettre le recrutement de MCAF1 et SETDB1 au niveau de sites CRE de certains gènes. Cependant nous manquons d'arguments fonctionnels.

Des lignées de souris déficientes pour le gène ATF7 ont été établies (Maekawa et al., 2010). Les souris mutantes homozygotes possédant le gène ATF7 invalidé présentent un phénotype inattendu de dépression nerveuse. Le mécanisme moléculaire impliqué dans ce phénotype a été décrypté et semble lié à la surexpression du récepteur 5-hydroxytryptamine (HTR5b), un des récepteurs de la sérotonine chez la souris. Ceci est le premier lien concret entre le facteur de transcription ATF7 et la répression transcriptionnelle (Figure 8).

Chez les souris sauvages, la protéine ATF7 se lie au promoteur du gène *Htr5b* où il interagit avec la protéine ESET (l'homologue murin de SETDB1). Ceci induit la triméthylation de la H3K9 et la répression du gène *Htr5b*. Cependant lorsque les souris subissent un stress par isolement social, la protéine ATF7 est phosphorylée par la voie des MAPK p38 et ne se fixe plus sur le promoteur du gène *Htr5b*, ce qui conduit à l'expression du récepteur et finalement à la dépression (figure 8) (Maekawa et al., 2010; Seong et al., 2012).

Ces travaux apportent un argument supplémentaire indiquant que la protéine ATF7 pourrait intervenir dans le recrutement de complexes de répression de la transcription. Cependant, lors de cette étude, la fixation de la protéine ATF7 sur l'ADN a été étudiée par immunoprécipitation de la chromatine en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine ATF7 mais aucun lien direct avec la protéine MCAF1 n'a été révélé (Figure 8). Cette étude

n'est valable que pour la souris car le récepteur HTR5b n'est pas exprimé chez l'homme où un codon stop est présent au début de sa séquence.

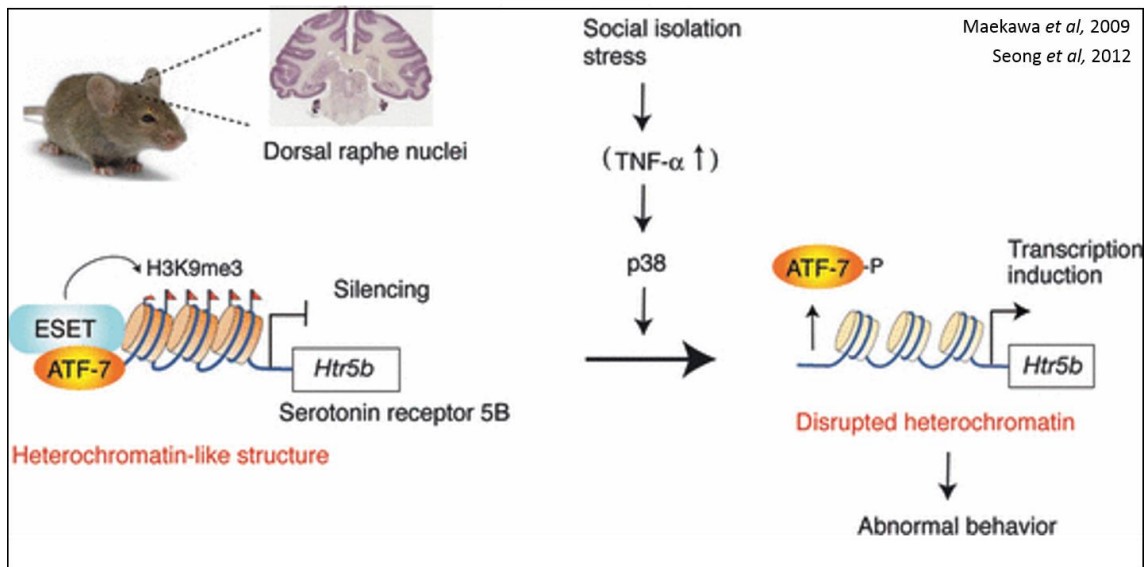


Figure 8 : ATF7 et la répression de la transcription.

Le « knock-out » de la protéine ATF7 chez la souris a permis de montrer que les souris mutantes ont un comportement dépressif. Celui-ci est dû à la répression du récepteur 5b de la sérotonine (HTR5b) au niveau des noyaux du raphé dorsal des souris. Pour induire cette répression transcriptionnelle, la protéine ATF7 recrute la protéine ESET (homologue murin de la protéine SETDB1 humaine) qui permet le passage de l'état di-méthyl à l'état tri-méthyl de la lysine 9 de l'histone H3 ce qui induit la formation d'hétérochromatine (panel de gauche). Les mêmes auteurs ont aussi montré que lors d'isolation sociale chronique des souris sauvages, celles-ci produisent du TNF α qui active les kinases p38. Celles-ci phosphorylent la protéine ATF7 qui est alors détachée du promoteur du gène Htr5b qui n'est alors plus réprimé, et l'hétérochromatine décondensée, permettant ainsi son expression causant chez les souris sauvages les mêmes problèmes comportementaux que les souris « knock-out ».

Une étude de la réponse immunitaire contre *Pseudomonas Aeruginosa* chez le nématode a été réalisée. Celle-ci démontre que le facteur de transcription ATF7 est capable de réprimer l'expression de gènes de réponse immunitaire innée en absence d'infection. Lors d'une infection par *P. aeruginosa*, la voie TIR1-NSY1-SEK1 est activée et conduit à la phosphorylation de PMK1 qui interagit alors avec la protéine ATF7 et la phosphoryle ce qui va lui permettre d'activer la transcription des gènes cibles. Ceci montre le rôle d'interrupteur moléculaire de la transcription que peut jouer la protéine ATF7 (Shivers et al., 2010).

Nous pouvons conclure que la protéine ATF7 possède une activité largement influencée par ses modifications post-traductionnelles. La figure 9 résume le rôle de ces modifications.

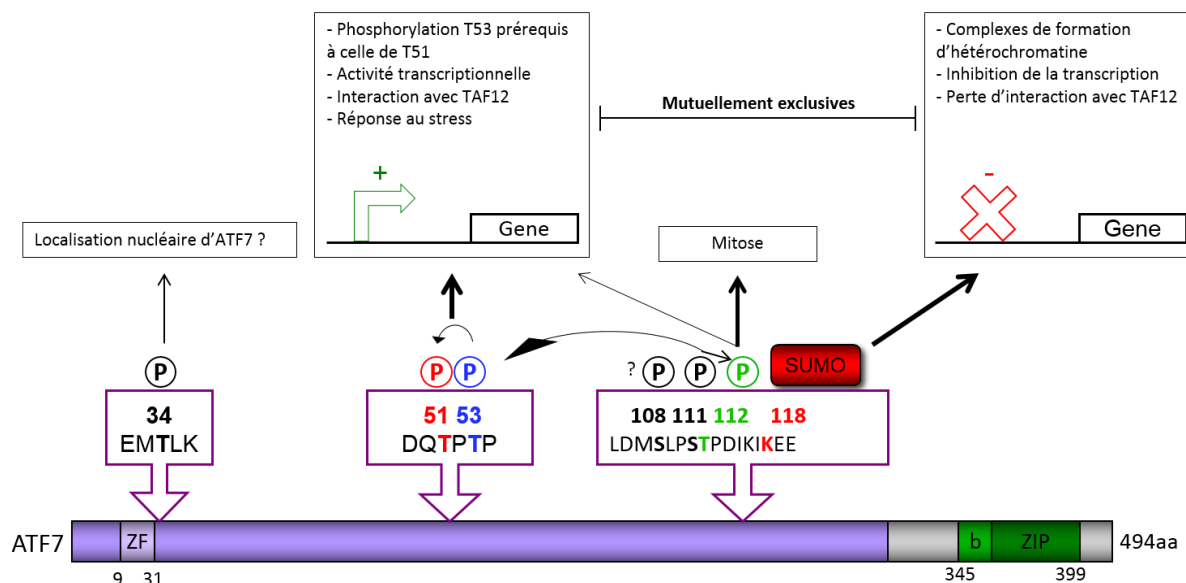


Figure 9 : Rôle et interrelations des modifications post-traductionnelles d'ATF7.

Zoom sur la région amino terminale de la protéine ATF7, sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles. La phosphorylation du résidu thréonine 34 (T34P) d'ATF7 est-elle nécessaire à sa localisation nucléaire comme son homologue chez la protéine ATF2 ? Un stress cellulaire (e.g. UV) induit la phosphorylation des thréonines 53 et 112, puis celle de la T51. S'en suit l'interaction d'ATF7 avec TAF12 qui initie l'activation de la transcription. Le rôle de la phosphorylation des sérines 108 et 111 (S108 et S111) reste inconnu. La T112 peut être phosphorylée par deux voies distinctes, suite à un stress cellulaire ou en absence de stress au moment de la mitose. Lors de la mitose, la T112 est très fortement phosphorylée, et cette phosphorylation disparaît à l'entrée des cellules en télophase. La lysine 118 (K118) peut quant à elle être sumoylée ce qui va permettre à ATF7 de recruter des protéines appartenant à des complexes de remodelage de la chromatine pour induire la répression de la transcription. Sous cette forme, ATF7 n'est pas capable d'activer la transcription, ni d'interagir avec TAF12. La Sumoylation de la K118 est mutuellement exclusive de la phosphorylation des T51 et 53.

C. Le variant d'épissage alternatif ATF7-4

Plusieurs isoformes de la protéine ATF7 sont produites par épissage alternatif, formant ainsi différents ARNm matures. Ces isoformes, ATF7-1, ATF7-2 et ATF7-3 varient au niveau de la région N-terminale (Figure 10). L'isoforme ATF7-1 est la plus courte. ATF7-2 possède une région de 21 acides aminés riche en résidus sérine et proline. L'isoforme ATF7-3 possède en plus de la région de 21 acides aminés, une courte région de 11 acides aminés riche en résidus basiques (Chatton et al., 1993; Gaire et al., 1990; Goetz et al., 1996). Cependant la fonction de ces régions n'est pas connue et aucune différence fonctionnelle n'a été mise en évidence. Les isoformes d'ATF7-1 et 2 sont exprimées dans tous les tissus embryonnaires et adultes de la souris avec une plus forte expression dans le cerveau (hippocampe et cellules de Purkinje), le poumon, le rein et la rate (Goetz et al., 1996).

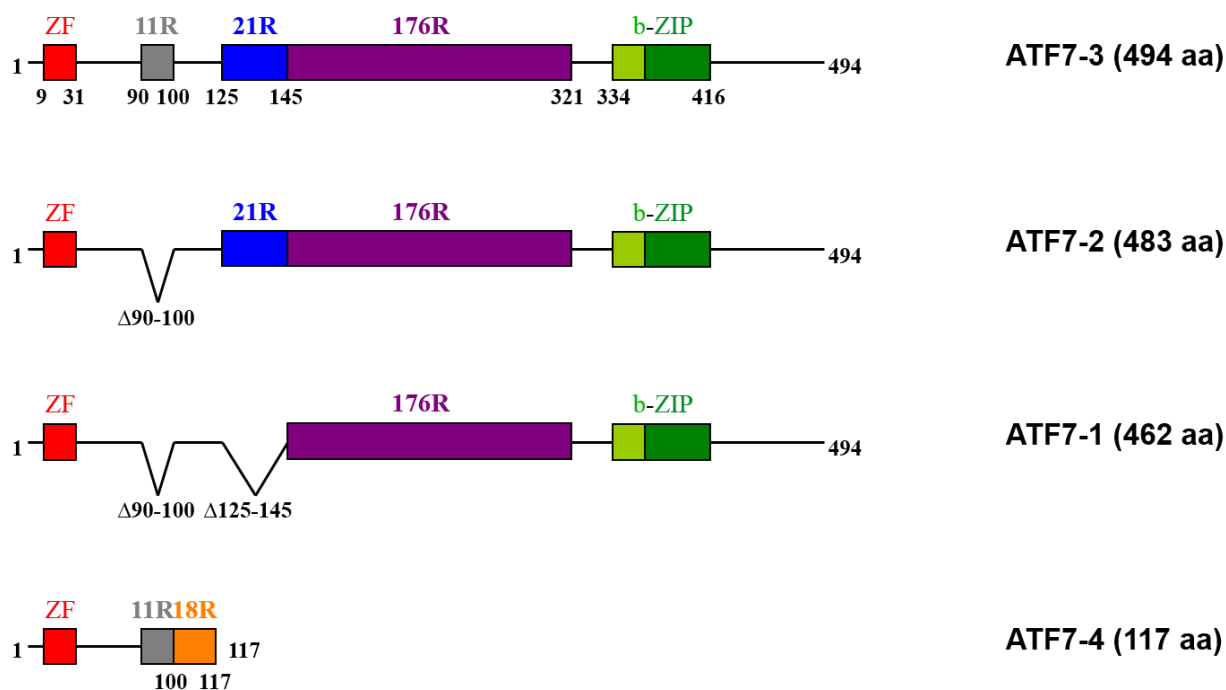


Figure 10 : Les différentes isoformes de la protéine ATF7.

Le gène qui code pour la protéine ATF7 peut donner naissance à quatre protéines différentes grâce à un mécanisme d'épissage alternatif. L'isoforme ATF7-3 est la plus longue et possède 494 acides aminés (aa). ATF7-2 ne possède pas une courte séquence d'onze aa dans la région amino terminale. ATF7-1 ne dispose pas de cette séquence d'onze aa et ne possède pas non plus un bloc de 21 résidus dans la région centrale de la protéine. Le petit variant ATF7-4 quant à lui ne possède pas la partie centrale ni la partie C-terminale car l'épissage alternatif produit au niveau de l'exon 4 lui amène un petit exon nommé 4a qui est constitué d'un bloc de 18 résidus hydrophobes et qui se termine par un codon stop. L'ensemble des isoformes ATF7-1, 2 et 3 ne présentent pas d'activité transcriptionnelle distincte et sont regroupées sous la nomination ATF7-FL. Lorsque le nom de l'isoforme n'est pas précisé, il s'agit de la protéine ATF7-1 qui est la plus étudiée.

Récemment, une nouvelle isoforme d'ATF7 (ATF7-4) issue d'un épissage alternatif du gène ATF7 a été caractérisée au laboratoire. ATF7-4 est aussi un régulateur négatif de l'activité transcriptionnelle d'ATF7. Cette nouvelle protéine, localisée dans le cytoplasme, partage avec les isoformes nucléaires l'intégralité des acides aminés du domaine d'activation (1-98), mais ne possède pas les domaines de fixation à l'ADN, de dimérisation ni de NLS. Le modèle proposé actuellement (figure 11) suppose qu'ATF7-4 séquestre la kinase responsable de la phosphorylation de la T53 de la protéine ATF7 dans le cytoplasme. Suite à un stress cellulaire, ATF7-4 est phosphorylé sur ces résidus T51 et T53 ce qui induit sa poly-ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. La kinase responsable de la phosphorylation de la T53 d'ATF7 est alors libre et peut être adressée au noyau pour phosphoryler ATF7 (Diring et al., 2011).

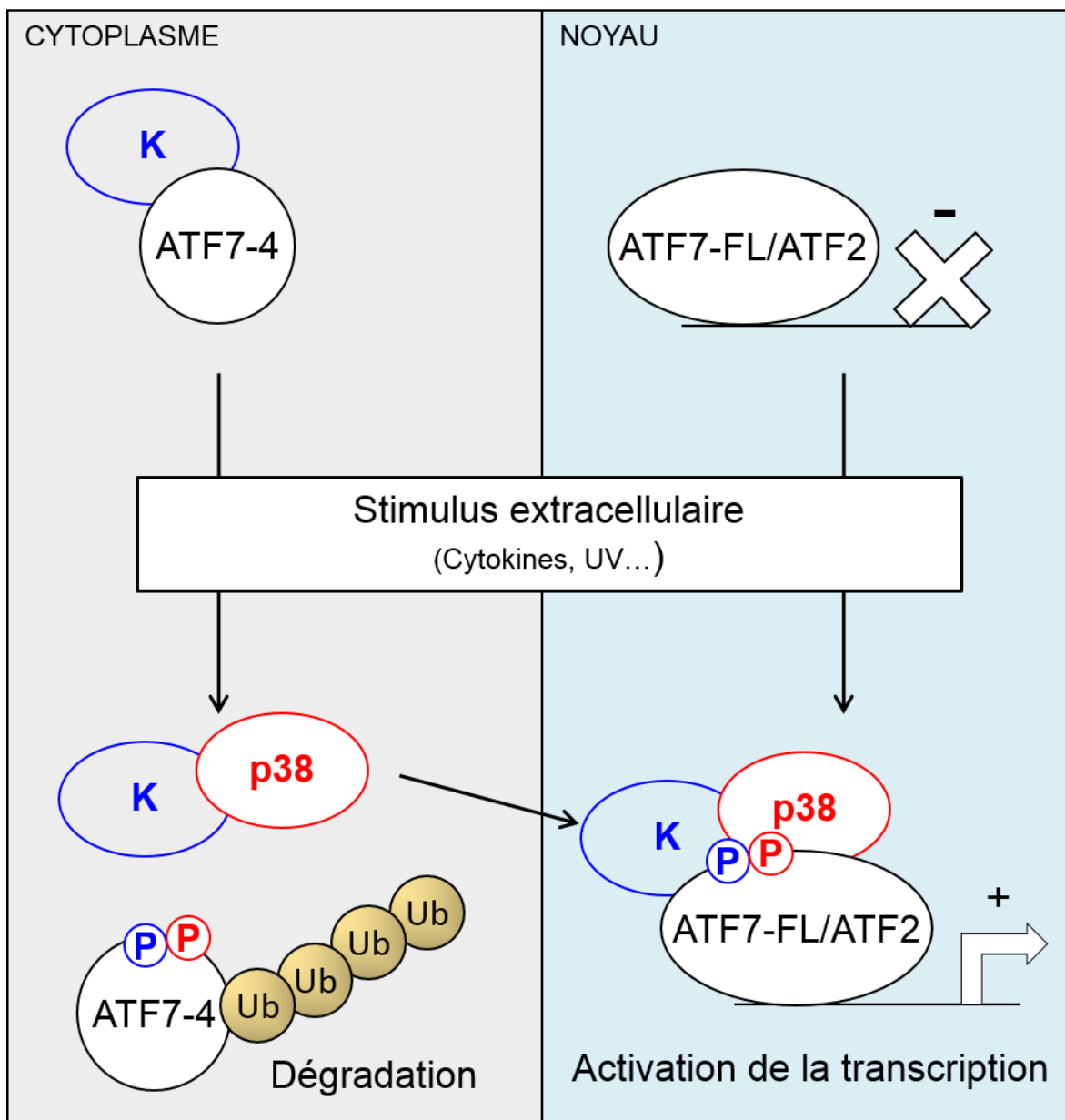


Figure 11 : Modèle de rétention des kinases par la protéine ATF7-4.

La protéine ATF7-4 ne possède pas de NLS contrairement à la protéine ATF7-FL ou la protéine ATF2 et est donc localisée dans le cytoplasme des cellules ou elle est retrouvée associée à une protéine kinase inconnue. Suite à un stimulus la protéine ATF7-4 est phosphorylée sur les résidus T51 et T53 ce qui conduit à sa poly-ubiquitinylation et à sa dégradation par le protéasome. Les kinases qui phosphorylent ATF7-4 sont alors libres de rejoindre le compartiment nucléaire pour phosphoryler les protéines ATF7 et ATF2 ce qui leur permet d'activer la transcription des gènes cibles.

Partie 2 : Le cycle cellulaire

Les cellules de tout organisme sont capables de proliférer. Chez l'Homme, les cellules souches sont capables de se diviser afin d'augmenter le nombre total de cellules de l'organisme. On peut distinguer plusieurs types de cellules souches. La première cellule souche est issue de la fécondation des gamètes mâle et femelle. Cette cellule est dite totipotente car elle a la capacité de donner naissance (après plusieurs générations) à tous les types cellulaires de l'organisme. Après plusieurs divisions successives, les cellules souches embryonnaires vont permettre la génération de cellules de plus en plus différenciées. L'organisme adulte possède aussi des cellules souches dans ses tissus. Ces cellules permettent le maintien de l'homéostasie de chacun de ces tissus c'est-à-dire le maintien constant du nombre de cellules. Ces cellules souches se divisent de manière asymétrique, générant ainsi deux cellules filles différentes. Une cellule sera une nouvelle cellule souche possédant les mêmes caractéristiques que la cellule mère et l'autre cellule sera nommée cellule géniteur qui va être capable de se diviser pour donner des cellules spécifiques au tissu. Ces cellules seront différenciées, c'est-à-dire qu'elles ne vont plus se diviser et acquérir des fonctions spécifiques (figure 12). Notons que dans certaines espèces, des cellules différenciées sont capables de revenir à l'état dédifférencié des cellules souches, on les appelle alors IPs (Induced pluripotent cells) car elles peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires (Welstead et al., 2008). Le nombre de cellules d'un organisme est finement contrôlé, par des mécanismes qui contrôlent le cycle cellulaire. En plus de ces régulations, le mécanisme d'apoptose (ou mort cellulaire programmée) permet d'éliminer celles qui sont excédentaires ou endommagées (Kerr et al., 1972). Le contrôle de la prolifération et de l'apoptose est un point crucial de tout organisme pluricellulaire afin d'éviter le développement de pathologie telles que les cancers (Liu et al., 2014).

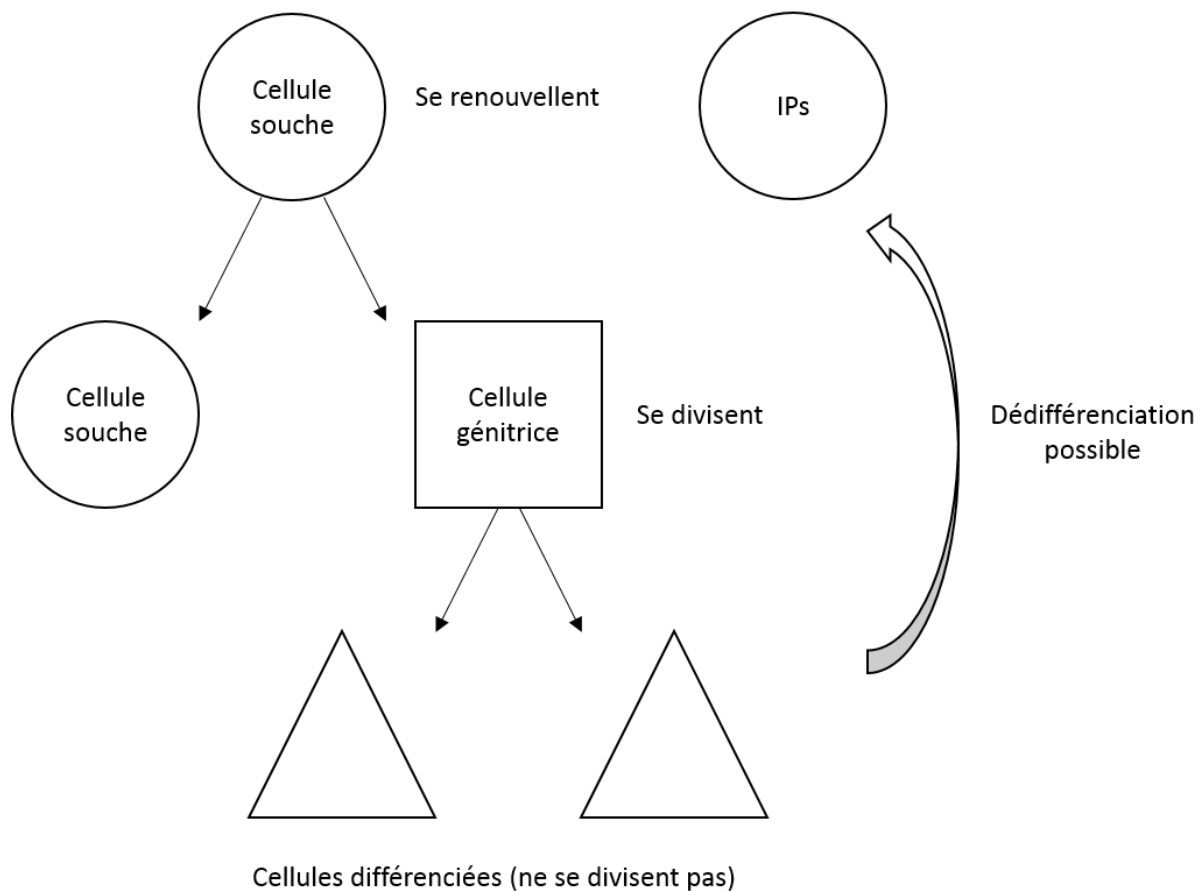


Figure 12 : La prolifération à l'encontre de la différenciation.

Les cellules de l'organisme ne sont pas toutes égales face au cycle cellulaire et à l'acquisition de fonctions spécialisées. Les cellules souches existent sous deux types, les cellules souches embryonnaires (ES) et les cellules souches adultes. Les cellules souches embryonnaires auront pour rôle de donner naissance à toutes les cellules de l'organisme et devront posséder pour cela une grande capacité de prolifération, sans pour toutefois acquérir des fonctions spécialisées car elles doivent demeurer totipotentes c'est-à-dire, capable de donner naissance à tous les types cellulaires. Les cellules souches adultes permettent le renouvellement des cellules pour garantir le maintien de l'homéostasie des tissus. Elles ont donc aussi une grande capacité de prolifération ainsi que la possibilité de donner naissance à une multitude de types cellulaires. Les cellules souches se divisent de manière asymétrique afin de donner naissance à une nouvelle cellule souche d'une part, mais aussi à une cellule génitrice. Les cellules génitrices se divisent pour donner naissance à deux cellules différenciées qui ne se diviseront plus mais qui auront acquis des fonctions spécifiques au tissu où elles se trouvent. Les cellules différenciées gardent tout de même la capacité à se dédifférencier pour devenir des cellules pluripotentes induites (IPs) possédant à nouveau la capacité de se multiplier et de donner naissance à différents types cellulaires.

1. Les phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un phénomène complexe composé de plusieurs phases aboutissant à la division des cellules. Afin de produire deux cellules à partir d'une seule, la cellule mère doit dupliquer son matériel génétique au cours d'une phase nommée synthèse (phase S). Lors de la phase, S les chromatides de chaque chromosome sont dupliqués ce qui

permet à la cellule mère d'en transmettre une à chacune des cellules filles. (Figure 13). Notons toutefois que la méiose est aussi un moyen de se diviser pour les cellules germinales, mais ce phénomène conduit à la formation de quatre gamètes haploïdes (N) contrairement à la mitose où les deux cellules filles sont diploïdes (2N) (Shenhar and Kassir, 2001). Les cellules somatiques se divisent par le mécanisme de mitose.

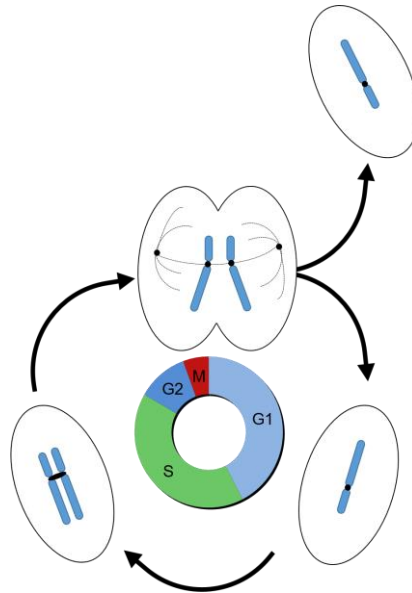


Figure 13 : Le cycle cellulaire de la mitose.

Les cellules somatiques de l'organisme parcourent une série d'étapes pour parvenir à se diviser et donner naissance à deux cellules filles. Un point crucial est la transmission du patrimoine génétique qui n'est possible que si la cellule mère le duplique avant de se diviser. C'est lors de la phase de synthèse (phase S) que les cellules dupliquent l'ensemble des chromosomes. Les chromatides synthétisés sont reliés aux chromatides qui ont servi de matrice par une structure nommée le kinétochore. Lors de la phase de mitose, la cellule mère sépare les paires de chromatides afin d'en distribuer une de chaque chromosome à chacune des cellules filles avant séparation physique de la cellule. Ces étapes sont espacées temporellement par des intervalles G1 et G2 qui donnent à la cellule le temps d'accomplir les événements nécessaires à chaque phase, de réaliser les contrôles afin d'éviter un problème de synthèse ou de ségrégation de chromosomes. La taille des portions du diagramme est proportionnelle à la durée des phases du cycle cellulaire de cellules HeLa en culture.

La cellule qui a dupliqué son génome pourra alors se diviser au cours de la phase de mitose (phase M). Ces deux phases sont séparées par des intervalles nommés G1 (entre S et M) et G2 (entre S et M). L'intervalle G1 permet à la cellule de se préparer pour la phase S et notamment lui permettre de croître en taille afin de pouvoir contenir l'ADN qui sera synthétisé. C'est aussi à ce moment-là que la cellule va pouvoir sortir du cycle cellulaire et pénétrer en G0 qui est une phase de quiescence où les cellules arrêtent de se diviser. La décision de poursuivre le cycle ou d'entrer en G0 est due à la présence ou non de facteurs de croissance ainsi que la réception ou non de signaux de différenciation. De plus, la transition

G1-S est un point critique de contrôle du cycle cellulaire. L'intervalle G2 quant à lui permet de vérifier l'ADN néosynthétisé, afin qu'il soit correctement répliqué et préparé avant la division cellulaire. Cela correspond au dépôt de nouveaux nucléosomes sur les molécules d'ADN nues qui n'en auraient pas été dotées lors de la phase S. La progression d'une phase à l'autre est régulée finement par un ensemble de molécules. Le cycle cellulaire peut être partitionné en deux portions, l'interphase, constituée des phases G1, S et G2, et la mitose (tableau 4) (Milo et al., 2009).

Tableau 1 : Durée des phases du cycle cellulaire de cellules HeLa en culture en conditions optimales.

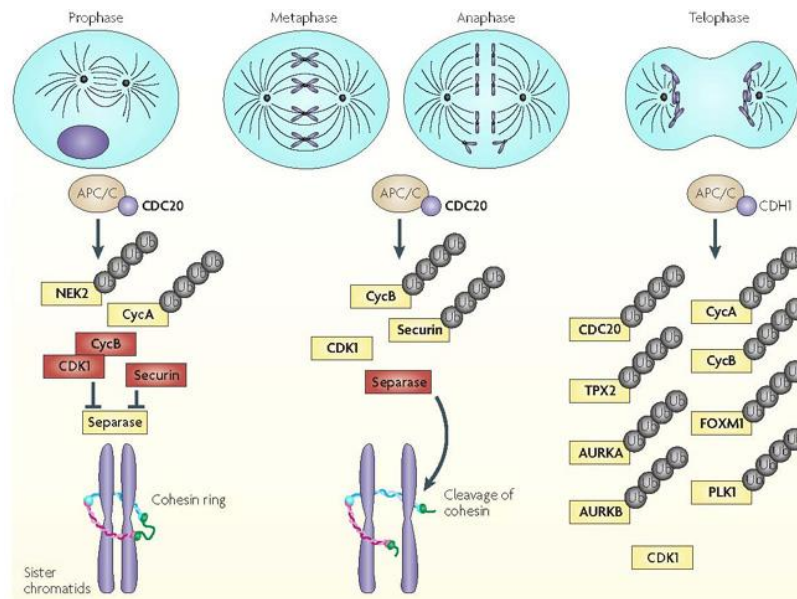
Le cycle complet dure 16,2 +/- 1,8h.

Phase	Durée
G1	7,6 +/- 0,8h
S	7,3 +/- 0,8h
G2	0,8 +/- 0,1h
M	0,5 +/- 0,1h

La complexité des événements mitotiques nous oblige à la subdiviser en plusieurs étapes (figure 14).

Prophase

La prophase est le premier événement de la mitose, c'est à ce moment que les chromosomes se condensent pour adopter leur célèbre apparence en « H ». Au même moment dans la cellule, les microtubules sont réorganisés en deux fuseaux dont chaque centre (appelé centrosome) est situé de part et d'autre de la cellule. Cette phase est facilement observable en microscopie optique en colorant des cellules avec du Dapi® où le matériel génétique apparaît alors comme une masse granuleuse et les nucléoles ne sont plus visibles. Lors de cette phase, le complexe APC/C (Anaphase-Promoting Complexe / Cyclosome), qui possède une activité E3 ligase, polyubiquitinyne des cibles cellulaires ce qui les conduit à la dégradation via le protéasome. La protéine Cdc20 s'associe à APC/C pour lui permettre d'ubiquitinyler la cycline A et la protéine Nek2 afin de permettre leur dégradation. La CDK1/CyclineB1 ainsi que la Sécurine inhibent la Séparase pour l'empêcher de cliver la Cohésine qui maintient les chromatides sœurs (Hayes 2006 ; Wolthuis 2008).



Nature Reviews | Cancer

Figure 14 : Les étapes de la mitose.

La première étape de la mitose est la **prophase**. Pendant cette phase les chromosomes se condensent pour adopter leur célèbre forme en « H » ou les deux chromatides sont reliés par un kinétochore. Celui-ci leur permet aussi d'être attachés au fuseau mitotique formé de microtubules qui rayonnent depuis les centrosomes. Les centrosomes migrent à chaque pôle de la cellule. Le complexe APC/C régule l'ubiquitinylation de nombreuses cibles cellulaires, en prophase, il permettra la dégradation de la cycline A qui n'est plus nécessaire une fois les cellules entrées en mitose, de même que la kinase NEK2 (qui contrôle la liaison des deux centrioles de chaque centrosome). La CDK1 est alors libre de s'associer avec la cycline B pour permettre avec la Securin d'inhiber la Separase. La migration des centrosomes pendant la prophase permet d'instaurer une tension sur les chromosomes qui tirés dans des directions opposées par leurs chromatides vont s'aligner en une ligne centrale pendant la **métaphase**. L'enveloppe nucléaire est désorganisée ce qui permet la répartition des centrosomes jusqu'aux bornes de la cellule. La cycline B et la Securin sont alors dégradées suite au marquage par APC/C ce qui permet à la Separase de rompre l'anneau de Cohésin qui maintient les chromatides ensemble. L'**anaphase** est alors initiée, les chromatides dissociés vont se soumettre à la tension qui les tire aux extrémités de la cellule. Les centrosomes continuent leur migration tirant la cellule aux deux pôles, l'allongeant et lui donnant une forme « d'os ». C'est le début de la **télophase**. L'ADN se décondense et la membrane plasmique est étranglée par un anneau contractile (formé de filaments d'actine et de myosine) jusqu'à permettre la séparation des deux cellules filles. Ce phénomène est nommé la cytokinèse. Les acteurs des points de contrôle ainsi que ceux de contrôle de la progression de la mitose n'étant plus nécessaires sont dégradés à l'exception de la CDK1 qui est nécessaire tout au long du cycle cellulaire. La cellule peut entrer en phase G1. Les protéines jaunes sont inactives, les rouges sont actives.

Métaphase

L'enveloppe nucléaire formée de lamine se désorganise, ce qui permet aux chromosomes de s'associer aux fuseaux de microtubules par leurs kinétochores. Un complexe ternaire entre les centrosomes, microtubules et chromosomes est donc formé. Les chromosomes s'alignent et la ligne formée est perpendiculaire au vecteur virtuel reliant les deux centrosomes. Cette phase est très caractéristique lorsque l'on marque l'ADN et l'observe en microscopie optique.

Anaphase

Les chromatides vont se détacher les unes des autres ce qui va permettre à la tension exercée par les réseaux de microtubules tirés par les centrosomes, d'amener les chromosomes aux pôles opposés de la cellule. Ce phénomène est nommé ségrégation des chromosomes. Pour ce faire, la CDK1 est inactivée, et la Sécurine dégradée, permettant ainsi à la Séparase de cliver la sous unité RAD21 de la Cohésine pour permettre la séparation des chromatides (Musacchio 2007). L'inactivation de la CDK1 se fait par dégradation de la cycline B via sa polyubiquitinylation par le complexe APC/C toujours associé à Cdc20 ; il en est de même pour la Sécurine. La préparation de cette étape est vitale car les deux futures cellules filles doivent chacune recevoir une chromatide provenant de chacun des chromosomes. Une erreur de ségrégation conduit à un phénomène d'aneuploïdie qui consiste en un défaut du nombre d'un ou plusieurs chromosomes. Par microscopie optique on peut observer l'ADN divisé en deux lignes séparées de plusieurs micromètres.

Télophase

La cellule est tirée aux deux pôles par les centrosomes et adopte une structure étirée qui ressemble à un os, avec l'ADN de chaque cellule fille qui se décondense aux extrémités. La membrane plasmique est étranglée par un anneau contractile formé de filaments d'actine et de myosine, jusqu'à permettre la séparation des deux cellules filles. Ce phénomène est nommé la cytokinèse. APC/C et son partenaire CDH1 vont cibler les cyclines A, B, CDC20, TPX2, les kinases AURORA A et B, PLK1, FOXM1 pour les poly-ubiquitinyler ce qui va permettre leur dégradation via le protéasome (Hayes 2006 ; Wolthuis 2008 ; Nakayama 2006). De plus la réexpression de cycline B après la télophase induit une recondensation des chromosomes et empêche la sortie de mitose (Potapova 2006).

2. Le contrôle du cycle cellulaire

Les évènements complexes du cycle cellulaire ne se déroulent et ne se succèdent pas de manière anarchique, chaque phase est contrôlée afin de se produire uniquement au moment chronologique précis où elle doit s'effectuer. La cellule est aussi capable de répondre à des signaux extracellulaires qui vont activer ou inhiber le cycle cellulaire. Nous décrirons dans un premier temps les mécanismes de régulation du cycle cellulaire, puis la réponse à ces signaux.

Depuis les années 1970, on sait qu'il y a des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire chez la levure (Hartwell et al., 1970), alors que les cyclines ont seulement été découvertes en 1983 (Evans et al., 1983). Le système de régulation du cycle cellulaire est fortement conservé de la levure à l'homme (Malumbres and Barbacid, 2009) signifiant qu'il s'agit d'un mécanisme vital pour la cellule.

A. [Les CDKs et les cyclines](#)

Chaque phase du cycle cellulaire nécessite l'intervention de protéines spécifiques qui doivent être activées et /ou synthétisées dans un ordre bien précis pour que le système fonctionne. Les kinases dépendantes des cyclines (CDKs) sont capables d'activer ou d'inhiber l'activité d'autres protéines par phosphorylation. Cependant, les CDKs seules n'ont pas d'activité kinase mais ont besoin d'être associées à d'autres protéines nommées cyclines (Malumbres and Barbacid, 2001). Les cyclines agissent comme des activateurs allostériques et servent aussi à conduire les CDKs vers certaines de leurs protéines cibles. Chaque cycline n'est exprimée que pendant un court laps de temps durant le cycle cellulaire et est rapidement dégradée, permettant une régulation temporelle des CDKs qui sont quant à elles présentes tout au long du cycle cellulaire.

Chez la levure, une seule CDK contrôle la progression du cycle cellulaire. Chez *Saccharomyces Cerevisiae*, elle se nomme CDC28 (pour Cell Division Control) alors que chez *Schizosaccharomyces Pombe*, c'est CDC2. Il existe d'autres CDKs de levures, et l'ensemble d'entre elles est regroupée en deux sous-groupes : les CDKs qui ne s'associent qu'à une seule cycline telles Ctk1, Kin28, Sgv1, Srb10 et les CDKs qui peuvent s'associer à plusieurs cyclines différentes comme Cdc28 et Pho85.

- Pho85 est une kinase multifonctionnelle, qui dans l'assemblage du cytosquelette d'actine, la transcription, le métabolisme du glycogène et du phosphate, et qui est aussi capable de relayer les changements de l'environnement extracellulaire (Huang et al., 2007). Les quatre kinases qui ne s'associent qu'à une seule cycline sont liées à la machinerie transcriptionnelle et sont probablement liées à la régulation du complexe holoenzyme de l'ARN polymérase II et de cofacteurs (Nebreda, 2006) (Figure 15). Dix cyclines différentes sont capables de se lier à Pho85, elles appartiennent à la famille des cyclines de type Pcl comme par exemple Pcl1, 2, 7 et 9 qui sont exprimées de manière spécifique au cours du

cycle cellulaire du début de la phase G1 jusqu'à la phase S. De ce fait Pho85 pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance des signaux mitogéniques qui promeuvent la progression de la phase G1 (Huang et al., 2007).

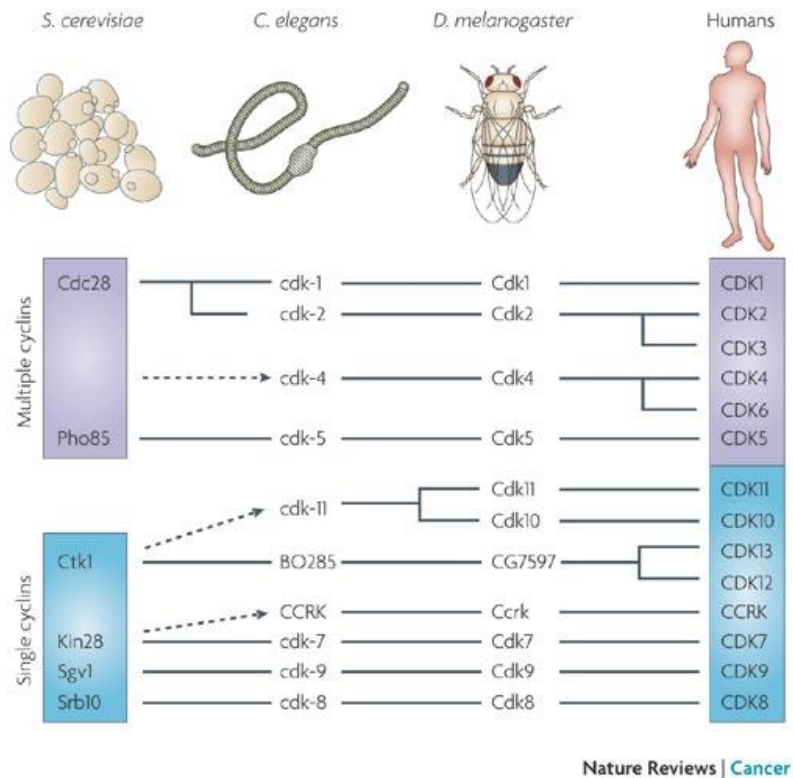


Figure 15: L'évolution des CDKs chez les Eucaryotes première légende qui complète admirablement ce qui est décrit dans le texte).

La levure ne possède qu'une seule CDK directement impliquée dans la progression du cycle cellulaire, Cdc28 qui est l'homologue de la CDK1 chez l'homme. On remarque aussi que les CDK4 et 6 sont très proches et la CDK6 est apparue très tard dans l'évolution car absente chez la drosophile. Chez l'homme, les CDKs directement impliquées dans la progression du cycle cellulaire sont les CDK1, 2, 4 et 6 qui peuvent interagir avec plusieurs cyclines (Malumbres 2008).

- Cdc28 lie les cyclines des sous-catégories Cln et Clb (Cln sont les cyclines interphasiques alors que Clb sont les cyclines mitotiques chez la levure) qui contiennent 9 membres. La progression en G1 nécessite la présence d'une des trois Cln pour activer Cdc28. Les Clb5 et 6 permettent d'activer Cdc28 pour la réplication de l'ADN. Enfin les cyclines Clb 1-4 en association avec Cdc28 sont essentielles pour les événements mitotiques (Bloom and Cross, 2007).

Chez l'Homme, la famille des protéines CDK est constituée de 13 membres qui interagissent avec au moins 29 cyclines et protéines apparentées aux cyclines (Malumbres and Barbacid, 2005). Elles sont aussi regroupées en deux sous-familles en fonction de leur

capacité à lier un seul ou plusieurs types de cyclines. Seules 10 cyclines sont directement impliquées dans la progression directe du cycle cellulaire (3 cyclines D, 2 cyclines E, 2 cyclines A et 3 cyclines de type B) (Nebreda, 2006).

Les CDKs qui peuvent interagir avec plusieurs cyclines :

- La protéine CDK1 est la kinase responsable de la mitose et l'homologue de Cdc28 de *S. Cerevisae*. La CDK1 peut interagir avec les cyclines A et les cyclines B. Cependant, la liaison CDK1-cycline B n'est possible qu'en l'absence de cycline A.
- Les protéines CDK2, 3, 4 et 6 sont les CDKs interphasiques qui interviennent dans le cycle cellulaire lors des trois premières phases du cycle cellulaire. CDK3 est aussi impliquée dans l'interphase et se lie à la cycline C (Ren and Rollins, 2004) cependant elle est inactive dans la majorité des souches de souris de laboratoire et n'est de ce fait que peu étudiée (Ye et al., 2001).
- La protéine CDK5 est active dans les neurones post-mitotiques et phosphoryle des protéines du cytosquelette. Elle est essentielle pour la différenciation des neurones et leur sortie du cycle cellulaire, et est impliquée dans leur apoptose lors de maladies neuronales (Zhang et al., 2008).

Les CDKs qui n'interagissent qu'avec une seule cycline :

- La protéine CDK7 s'associe avec la cycline H pour activer d'autres CDKs dont notamment les CDK1 et 2 (Larochelle et al., 2007). La CDK2 est phosphorylée au niveau de sa T160 suite à son interaction avec la cycline A (Jeffrey et al., 1995). Le couple CDK7-cycline H contrôle également la transcription en s'associant au facteur TFIIF et phosphorylant la partie carboxy-terminale (CTD pour C-Terminal Domain) de la grande sous unité de l'ARN polymérase II (Fisher, 2005). Le double rôle des CDKs dans le contrôle du cycle cellulaire et la transcription permet un couplage de ces deux processus lors de la prolifération des cellules (LOYER et al., 2005).
- Les CDKs 8 et 9 phosphorylent des composants de la machinerie transcriptionnelle de base (Malumbres and Barbacid, 2005). La CDK8 est aussi impliquée dans certains cancers du côlon. L'augmentation de l'activité de la CDK8 induit la répression du facteur pro apoptotique E2F1 et l'activation de la transcription de certaines cibles transcriptionnelles de la β -caténine (Firestein et al., 2008; Morris et al., 2008).

- Les CDK 10 et 11 jouent plusieurs rôles dans la transition entre les phases G2 et M mais aussi dans la transcription. La CDK11 participe à la maturation des centrosomes, à la formation du fuseau de microtubules, à l'adhésion des chromatides sœurs mais aussi à la cytokinèse (Hu et al., 2007; Wilker et al., 2007; Yokoyama et al., 2008). Elle est de plus essentielle lors du développement chez la souris (Li et al., 2004). De manière intéressante, les CDKs 10 et 11, qui sont fortement apparentées chez l'homme, ne possèdent pas de gènes orthologues chez la levure. Cependant la CDK qui leur est la plus similaire est Ctk1 qui est impliquée dans le contrôle de la transcription et la traduction ainsi que dans la modulation de la structure de la chromatine (Hampsey and Kinzy, 2007). Les fonctions mitotiques de la CDK11 semblent donc avoir émergé plus tard au cours de l'évolution.
- Les CDK 12 et 13 régulent l'épissage alternatif (Chen et al., 2006; 2007). Elles s'associent à la cycline L1 pour phosphoryler les protéines de la famille SR riches en acides aminés sérine et arginine. Lorsque les protéines SR sont phosphorylées elles sont relocalisées dans le noyau et peuvent reconnaître leur pré-ARNm cible et recruter la machinerie d'épissage.

Bien évidemment, il existe aussi des CDKs que l'on ne peut classer dans aucune famille car leurs fonctions ainsi que les cyclines impliquées sont inconnues (Malumbres et al., 2008).

B. Les points de contrôle pour la progression du cycle cellulaire

La phase G1 est définie comme la première phase du cycle cellulaire car c'est par celle-ci que va débuter un nouveau cycle. Comment la cellule va-t-elle décider de poursuivre la progression en G1 ? De passer à la phase suivante c'est-à-dire la phase S ?

i. La progression dans la phase G1

Lors de la phase G1, la cellule va décider de poursuivre le cycle cellulaire ou non. Ce choix est fortement influencé par la présence de facteurs de croissance comme nous le verrons dans la section suivante. La phase G1 est donc divisée en une période précoce et une phase tardive. Pour passer en phase G1 tardive, la cellule doit être capable de synthétiser la cycline E. Pour cela, en réponse à des signaux mitogènes externes, les cyclines D (D1, D2 et D3) sont synthétisées et se fixent préférentiellement aux CDKs 4 et 6

(Malumbres and Barbacid, 2001). Ces CDKs vont alors activer de manière indirecte la transcription des cyclines E1 et E2.

L'expression des cyclines E est contrôlée par le facteur de transcription E2F qui se fixe sur des éléments de réponse spécifiques et recrute la machinerie transcriptionnelle pour permettre leur expression. En l'absence de signaux mitogènes, E2F est inactif afin d'éviter que les cellules progressent dans le cycle cellulaire sans y avoir été conviées par des facteurs de croissance. C'est la protéine Rb (Rétinoblastome) qui inactive E2F en s'y fixant. Les CDK4 et 6 associées à la cycline D phosphorylent Rb pour l'inactiver ce qui va induire son relargage d'E2F. Il en résulte l'expression de la cycline E qui va permettre de conduire les cellules vers la phase S (Harbour et al., 1999). E2F va aussi permettre la synthèse d'autres protéines notamment celles qui permettent la synthèse d'ADN. Les cyclines D vont être dégradées (figure 16) (Kato et al., 1993).

i. La transition G1-S

Lors de la phase G1 tardive, la cycline E est exprimée et la cellule est maintenant indépendante de tout facteur de croissance. La cycline E se fixe à la CDK2 et ce complexe est nécessaire à la transition vers la phase S. Ceci a été démontré par l'utilisation de mutants dominants négatifs de CDK2 incapables d'exercer une activité kinase même après liaison à la cycline E qui inhibent la progression vers la phase S dans plusieurs lignées cellulaires tumorales (Pagano et al., 1993; van den Heuvel and Harlow, 1993).

i. La transition S-G2

A nouveau, la CDK2 est l'acteur responsable de la transition mais elle est alors activée par la cycline A2 (A1 dans les cellules de la lignée germinale), les cyclines E ayant été dégradées en début de phase S. Les cellules arrivées en G2 subissent un point de passage (ou « checkpoint »). Celui-ci consiste en la vérification de la bonne réplication de l'ADN nucléaire. Des erreurs de réplication pourraient être transmises aux cellules filles, il existe donc des mécanismes qui empêchent les cellules de progresser afin qu'elles puissent réparer les erreurs. Si les erreurs ne sont pas réparables les cellules entrent alors en apoptose (Bartek et al., 2004; Cimprich and Cortez, 2008; Kastan and Bartek, 2004).

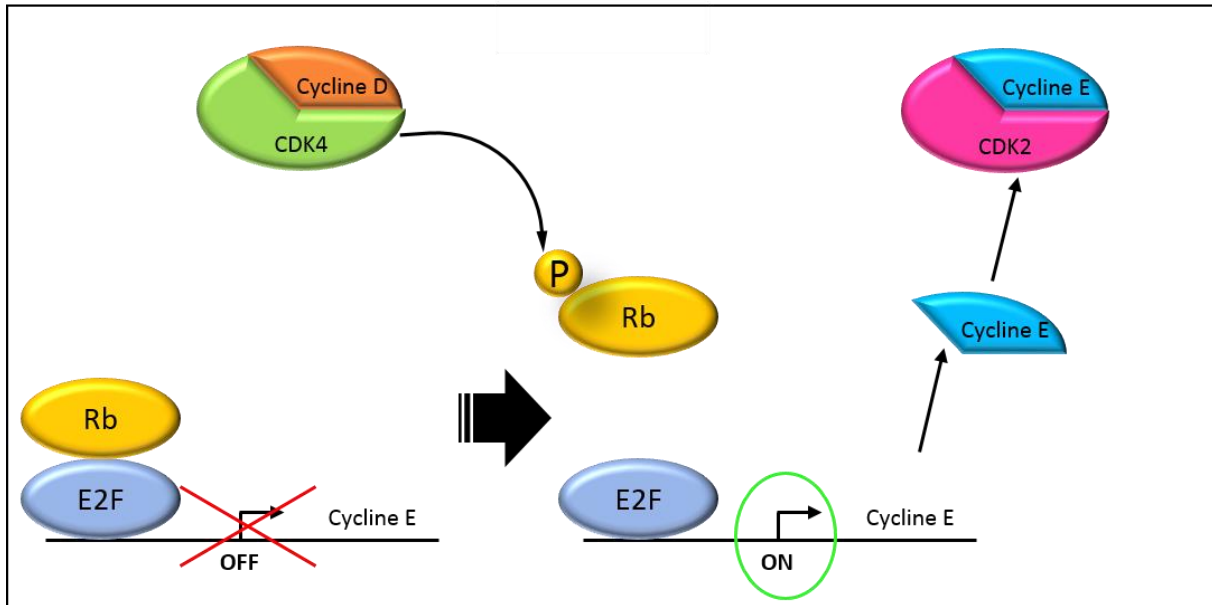
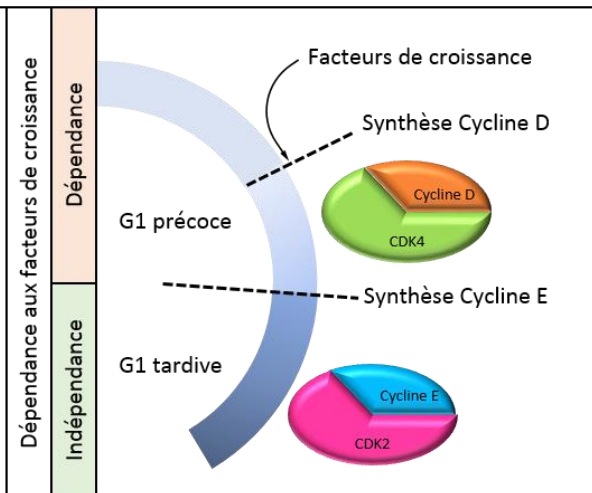


Figure 16 : La progression de la phase G1 précoce à la phase G1 tardive.

La phase G1 peut être divisée en phase précoce et tardive. Le point clé de l’une à l’autre est l’acquisition de l’indépendance aux facteurs de croissance suite à la synthèse de la cycline E (cadre de droite). Ceux-ci permettent la synthèse de la cycline D qui s’associe à la CDK4 pour permettre la synthèse de la cycline E. Le mécanisme (cadre de haut) met en jeu le facteur de transcription E2F qui est dans la situation normale inhibé par la protéine rétinoblastome (Rb). Lorsque la CDK4 est activée par la cycline D elle phosphoryle la protéine Rb qui ne peut plus s’associer au facteur E2F qui peut alors activer la transcription de la cycline E. Les cellules sont indépendantes des facteurs de croissance. Celle-ci peut alors s’associer à la CDK2 pour induire la progression dans le cycle cellulaire.



ii. La transition G2-M

L’entrée en mitose est contrôlée par la CDK1 qui est la CDK mitotique (et la seule kinase nécessaire au cycle cellulaire chez la levure). Cette kinase est activée par les cyclines de type A. Celles-ci seront dégradées lors de la métaphase, lorsque les chromosomes sont alignés et maintenus au fuseau mitotique de microtubules. La CDK1 peut maintenant être activée par les cyclines de type B qui seront ensuite dégradées par le complexe qui induit l’anaphase (Malumbres and Barbacid, 2005). La sortie de mitose et le retour à l’état G1 précoce est retrouvé après la cytokinèse.

Ceci constitue le modèle simplifié de la progression des cellules tout au long du cycle cellulaire. Cependant le modèle n'est pas aussi simple et plusieurs questions restent en suspens.

1. Toutes les CDKs sont-elles réellement nécessaires à l'accomplissement du cycle cellulaire ?
2. Comment et pourquoi est initié le cycle cellulaire ?
3. Quels sont les mécanismes de sauvegarde qui permettent à la cellule de contrôler sa croissance ?
4. Quels recours possèdent les cellules pour éviter de transmettre des lésions non réparables aux cellules filles ?
5. Que se passe-t-il en cas de dérégulation du cycle cellulaire et/ou du dysfonctionnement des mécanismes de sauvegarde ?

iii. Les CDKs sont-elles toutes essentielles ?

L'effet de la suppression des CDKs chez la souris

La souris est un organisme modèle de choix car il est possible de générer des individus déficients pour un ou plusieurs gènes simultanément. L'effet de la délétion des CDKs a été étudié chez la souris. Notons que seule la CDK1 s'est révélée essentielle car les souris déficientes en CDK1 ne peuvent pas accomplir leur développement, conduisant à une létalité embryonnaire précoce. C'est bien le cycle cellulaire qui est inhibé chez ces mutants car les cellules arrêtent leur développement au stade 2 cellules (Santamaría et al., 2007). L'élimination de la CDK2 n'a pas d'effet sur le cycle cellulaire et les souris sont parfaitement viables. Le seul défaut notable est la stérilité de ces souris qui ne sont pas capables de générer des gamètes. Effectivement, cette kinase est nécessaire à l'accomplissement de la méiose mais pas de la mitose (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003). Les souris déficientes (KO ou « knock out ») en CDK4 terminent leur développement embryonnaire sans encombre mais, à nouveau, des types cellulaires ultra-spécialisés sont affectés. Les cellules endocrines β du pancréas ainsi que les cellules qui produisent l'hormone pituitaire ne prolifèrent plus et ces souris développent des diabètes (Jirawatnotai, 2004; Martín et al., 2003; Mettus and Rane, 2003; Rane et al., 2002; Tsutsui et al., 1999). Il en est de même pour la CDK6 qui ne

semble être nécessaire que pour certaines cellules hématopoïétiques dont les érythrocytes. Les souris ne présentent qu'une légère anémie (Malumbres et al., 2004).

Nous en concluons donc que parmi les quatre CDKs directement impliquées dans le cycle cellulaire, **seule la CDK1 est absolument nécessaire** pour la croissance de la majorité des cellules alors que les CDK2, 4 et 6 ne sont nécessaires que pour des types cellulaires particuliers. Cela laisse sous-entendre une redondance fonctionnelle entre la CDK1 et les autres CDKs impliquées dans le cycle cellulaire. Des études ont donc été menées dans des souris KO pour plusieurs de ces CDKs simultanément. Ces souris présentent les mêmes problèmes que les souris déficientes pour chacune des kinases dont elles sont privées, mais de manière accentuée. Certaines combinaisons de KO conduisent à de nouveaux phénotypes :

- Les souris déficientes à la fois en CDK2 et 4 terminent leur embryogénèse et ne présentent pas de nouveau symptôme excepté au niveau des cardiomyocytes pendant leur développement embryonnaire. Les adultes survivent sans nouveau symptôme (Barrière et al., 2007; Berthet et al., 2006). Le KO simultané des CDK2 et 6 ne génère aucun nouveau phénotype par rapport aux mutants simples (Malumbres et al., 2004). Le défaut des cellules hématopoïétiques observé chez les souris KO pour la CDK6 est accentué dans les doubles mutants CDK4 et 6, et une létalité embryonnaire tardive survient. Ceci est dû au fait que les CDK4 et 6 sont les kinases de la phase G1 et leur redondance permet la perte de l'une ou l'autre, mais la perte des deux ne peut être compensée dans ces cellules par la CDK1 (Malumbres et al., 2004) (figure 17).

Au vu des nombreuses redondances entre les CDKs la question que l'on peut se poser est la suivante : qu'en est-il au niveau des cyclines ? Sont-elles aussi redondantes ? Une seule cycline peut-elle être suffisante pour que la cellule puisse poursuivre correctement le cycle cellulaire ?

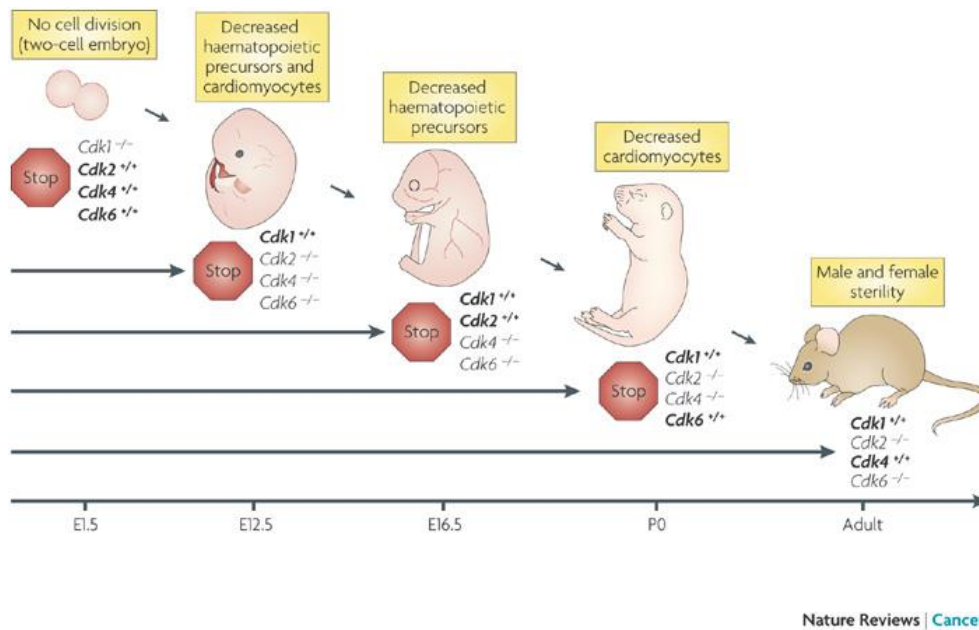


Figure 17 : Les délétions multiples des CDKs chez la souris.

Les souris déficientes en CDK1 ne se développent pas et les embryons meurent au stade 2 cellules car elles ne sont pas capables de se diviser. Celles qui ne possèdent pas la CDK2 sont stériles mais ne présentent aucun autre problème. Celles déficientes en CDK4 terminent le développement embryonnaire mais présentent des diabètes et celles déficientes en CDK6 sont anémiques. Seule la CDK1 est absolument nécessaire au cycle cellulaire, cependant les délétions multiples induisent des phénotypes synergiques et peuvent également conduire à des létalités embryonnaires. Les souris mutés pour la CDK2 et 6 parviennent à l'état adulte mais sont stériles. L'élimination des CDKs 2 et 4, conduit à un manque de cardiomyocytes fatal à la naissance. Lorsque la CDK2 est présente (CDK4 et 6 -/-) les souris meurent au 16^{ème} jour après coïte (E16,5) à cause d'un problème de précurseurs hématopoïétiques. Les souris triple mutantes (CDK2, 4, 6 -/-) présentent un phénotype synergique et leur développement s'arrête à E12,5. (Malumbres 2009)

L'absence des cyclines

Chaque sous-famille de cyclines comporte plusieurs membres. Par exemple les cyclines D sont au nombre de 3 et le KO individuel de chacune de ces cyclines conduit à des défauts spécifiques de développement, car chacune possède son propre profil d'expression. Cependant, seule l'absence simultanée des 3 cyclines de type D induit une létalité embryonnaire due à un défaut d'hématopoïèse comme cela est observé pour les souris double KO « CDK4 et 6 ». Cela montre bien que les cyclines D sont les activateurs des CDK4 et 6 de la phase G1 (Kozar et al., 2004). L'élimination des cyclines E conduit aussi à une létalité embryonnaire à cause d'un défaut d'endoréplication des cellules du trophoblaste où a lieu la synthèse d'hormone coriono-gonadique (HCG). L'endoréplication est le mécanisme de réplication du génome mais qui ne résulte pas en une division des cellules (Aleem et al., 2005; Geng et al., 2003). La compensation (aussi nommée « rescue ») de ce défaut par la méthode de compensation des tétraploïdes permet à l'embryon de se développer

correctement indiquant qu'aucun autre type cellulaire n'est affecté par l'absence des cyclines E (Geng et al., 2003). Cette technique consiste à prélever des embryons (au stade 2 cellules) issus d'une souris sauvage gestante. Ces embryons sont fusionnés par l'injection d'un fort courant électrique et forment des embryons au stade une cellule tétraploïdes et sont gardés in vitro pour croître jusqu'au stade blastocyste. Un tel embryon ne peut pas se développer mais est capable de former le placenta et les tissus extra-embryonnaires. Les cellules ES mutantes sont alors injectés dans ces blastocystes qui sont réimplantés dans une femelle pseudo-gestante et l'embryon peut alors se développer. Nous savons que la cycline E active la CDK2, cependant le KO de la CDK2 n'induit pas ces problèmes indiquant que la cycline E a aussi un rôle indépendant de la CDK2 (Geng et al., 1999). Par contre, le KO des cyclines A2 et B1 conduit à une létalité embryonnaire attendue car elles activent toutes les 2 la CDK1 qui est la kinase mitotique indispensable (Brandeis et al., 1998).

Le point intéressant de ce type d'études est qu'il a permis de démontrer une redondance fonctionnelle entre certaines cyclines. Effectivement, nous savons que les cyclines sont exprimées pendant un court laps de temps et sont ensuite dégradées. L'expression de la cycline E1 dans le locus de la cycline D1, suite à une recombinaison homologue, permet de restaurer le phénotype observé par l'absence de la cycline D1 (Geng et al., 1999).

Comparaison du cycle cellulaire de la levure et de l'Homme

Le cycle cellulaire de la levure *S. cerevisiae* ne fait intervenir qu'une seule CDK nommée Cdc28 qui est l'homologue de CDK1. Il n'y a pas de CDKs spécifiques de l'interphase comme c'est le cas chez l'Homme qui possède les CDK4/6 pour la phase G1 et la CDK2 pour la phase S. Cependant la levure possède aussi deux familles de cyclines, les cyclines mitotiques (Clb) et les cyclines qui permettent la transition entre la phase G1 et la phase S.

En tenant compte des expériences de KO des CDK et des cyclines présentées dans le paragraphe précédent, on remarque que le cycle cellulaire peut être effectué de la même manière chez les deux espèces en ne faisant intervenir qu'une seule CDK. Chez l'Homme, nous pouvons le nommer cycle cellulaire « essentiel » qui suffit à faire proliférer la majorité des cellules non spécialisées. Ce cycle est le cycle cellulaire qui a été conservé au cours de l'évolution. Cependant chez l'homme nous devons distinguer un cycle cellulaire « classique »

qui est le modèle le plus connu, durant lequel interviennent des CDK4/6 et cycline D en phase G1, ensuite le couple CDK2 /cycline E pour la transition en phase S, puis avec la cycline A pour le passage en G2, et puis la combinaison CDK1 /cycline A pour l'entrée en mitose et avec la cycline B pour les évènements mitotiques. Ce cycle cellulaire présente une réelle spécialisation de l'interphase grâce à l'intervention de différentes CDKs. Nous pouvons aussi définir un cycle cellulaire spécialisé qui est spécifique à certaines cellules. Comme nous l'avons vu lors des expériences de KO des CDKs, les cellules β du pancréas et les cellules lactotrophes nécessitent la CDK4 pour proliférer alors que les cellules hématopoïétiques requièrent la CDK6. Les cellules de la lignée germinale ont, quant à elles, besoin de la CDK2 sans quoi les individus sont stériles (Barrière et al., 2007; Berthet et al., 2006; Santamaría et al., 2007) (figure 18).

En conclusions :

1. La CDK1 (Cdc28 chez *S. cerevisiae*) est capable seule de promouvoir l'avancement du cycle cellulaire de la majorité des types cellulaires de l'Homme (au moins jusqu'au milieu de la gestation).
2. L'augmentation du nombre de CDKs impliquées dans le cycle cellulaire, observée chez l'Homme en comparaison à la levure, permet une régulation spécifique de la croissance dans certains types cellulaires.
3. Les CDKs présentent une certaine redondance fonctionnelle, et les CDKs interphasiques ne sont nécessaires et non remplaçables uniquement dans des types cellulaires précis.
4. Les cyclines sont nécessaires à l'activation des CDKs et leur présence est nécessaire à chaque moment du cycle : cependant, dans certains cas, l'expression d'une cycline dans le locus d'une autre permet de pallier l'absence de celle-ci (e.g. la cycline E1 peut partiellement remplacer la cycline D1 lorsqu'elle est exprimée dans son locus) (Geng et al., 1999).

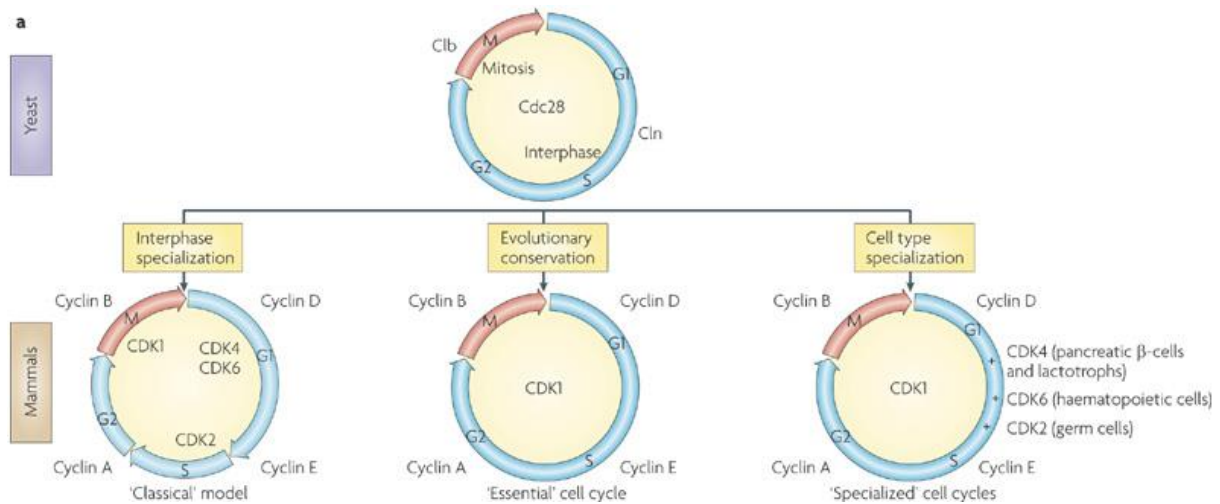


Figure 18 : Comparaison du cycle cellulaire de la levure et des mammifères.

La levure n'a besoin que de l'homologue de la CDK1 (CDC28) et des cyclines de l'interphase (Cln) et de la mitose (Clb) pour accomplir son cycle cellulaire. La complexification des organismes multicellulaires a entraîné l'émergence de diverses CDKs et cyclines. Ceci a permis aux organismes mammifères une régulation plus fine du cycle cellulaire, spécifique à chaque type cellulaire. Sur le panel du bas, à gauche nous pouvons observer le **modèle classique du cycle cellulaire** où la différence avec la levure est une spécialisation de l'interphase, avec l'intervention des CDK4/6 et cyclines D et E en G1. L'intervention de la CDK2/cycline E en phase S est poursuivie par l'association CDK1 cycline A en G2 et CDK1/cycline B en phase M. Un modèle de **cycle cellulaire « essentiel »** conservé depuis la levure qui ne fait intervenir que la CDK1 peut être défini grâce aux études de suppression des CDKs (voir figure 17) qui montrent que les autres CDKs ne sont nécessaires que dans certains types cellulaires spécifiques qui obéissent à un modèle de **cycle cellulaire « spécialisé »**.

Les questions qui peuvent découler de ces informations :

1. Lors d'une dérégulation du cycle cellulaire, les cyclines et kinases sont-elles toujours nécessaires à la cellule pour proliférer ?
2. Si oui, la CDK1 permet-elle d'assurer la prolifération à elle seule ?
3. Des cellules cancéreuses dérivées de types cellulaires spécialisés nécessitent-elles toujours la présence de la CDK nécessaire à la prolifération de ce type cellulaire ?

Nous répondrons à ces questions dans le chapitre traitant de la dérégulation du cycle cellulaire.

C. Induction du cycle cellulaire par les facteurs de croissance

Les cellules décident-elles d'entrer dans le cycle cellulaire sans raison ? Sont-elles en division perpétuelle ? Y-a-t-il des événements qui vont permettre aux cellules d'initier le cycle cellulaire ? Nous allons traiter ces points au cours de cette partie.

Les facteurs de croissance sont nécessaires pour le passage de l'état précoce à l'état tardif de la phase G1 dont le principal événement est la synthèse de la cycline E. Celle-ci n'est synthétisée que suite à l'activation des CDKs 4 et 6 par la cycline D. Seulement, les cyclines D ne sont pas exprimées naturellement par la cellule en absence de stimulus. L'objectif des facteurs de croissance est donc de permettre la synthèse de cycline D afin d'initier le cycle cellulaire et de passer en phase G1 tardive. De ce fait, les facteurs de croissance peuvent aussi permettre aux cellules quiescentes (en phase G0) de réintégrer le cycle cellulaire au niveau de la phase G1 tardive.

Cette régulation de la cycline D empêche une prolifération anarchique et un contrôle du nombre de cellules de chaque membre pour les organismes multicellulaires. De plus les cellules ne peuvent proliférer que dans un milieu favorable contenant les nutriments nécessaires à sa survie. Ceci est d'autant plus important chez les organismes unicellulaires, comme les levures, où chaque cellule constitue un organisme qui est en compétition directe avec les cellules avoisinantes pour les nutriments.

Afin de répondre aux facteurs de croissance, les cellules ont mis en place des mécanismes de transduction du signal qui forment des voies de signalisation. Celles-ci mettent en jeu des récepteurs transmembranaires qui vont lier les facteurs de croissance sur des domaines protéiques extracellulaires. Les deux classes majeures de récepteurs de surface sont les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les récepteurs couplés aux enzymes. Ceux-ci sont liés à des protéines kinases, on distingue les récepteurs liés à des activités tyrosine-kinases (RTK) et ceux liés à une activité serine/thréonine-kinases. Les protéines des voies de signalisation possèdent des mécanismes d'interrupteurs moléculaires (switch) qui permettent de les activer ou inactiver rapidement. Plusieurs mécanismes d'activation existent, comme la multimérisation de récepteurs suite à la reconnaissance d'un ligand, la fixation de GTP à la protéine RAS, ou la stabilisation de protéines (β -caténine). L'inactivation peut être conduite par l'internalisation ou la désensibilisation de récepteurs, l'hydrolyse du GTP, ou encore la dégradation de protéines (cas de la β -caténine).

Les facteurs de croissance sont divisés en deux catégories : Les facteurs mitogènes qui induisent la prolifération des cellules et les facteurs anti-mitogènes qui l'inhibent. L'équilibre de ces deux types de facteurs est nécessaire au bon fonctionnement d'un

organisme afin que les cellules puissent se multiplier si nécessaire mais ne pas envahir le tissu concerné. Un exemple marquant est le facteur de croissance des épithéliums (EGF) qui permet aux cellules proches d'une blessure de proliférer afin de pouvoir la guérir. Le facteur anti-mitogène TGF β (pour Transforming Growth Factor beta) stoppe la prolifération des cellules lorsque celle-ci n'est plus nécessaire pour réparer la blessure.

i. Les facteurs de croissance mitogènes : La voie de signalisation de l'EGF

L'EGF est sécrété suite aux blessures dans les tissus concomitamment avec des cytokines pro-inflammatoires, par les cellules immunitaires inflammatoires mais aussi par les cellules épithéliales avoisinantes. L'EGF ainsi libéré va se fixer sur son récepteur au niveau des cellules avoisinantes.

Le récepteur de l'EGF appartient à la famille ErbB qui fait partie des récepteurs tyrosine kinase (RTK). La famille ErbB est constituée de quatre membres capables de s'homo- ou s'hétérodimériser suite à la reconnaissance de leur ligand. De manière intéressante, le récepteur ErbB2 (aussi nommé HER2/neu) ne possède pas la capacité de lier des facteurs de croissance, il fonctionne en tant qu'hétérodimère avec un autre récepteur de la famille pour la reconnaissance des facteurs de croissance tel EGF. Le récepteur de l'EGF ne possède qu'un seul domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire possédant une activité tyrosine kinase (Burgess et al., 2003).

La voie de signalisation de l'EGF est activée en plusieurs étapes (figure 19) (Citri and Yarden, 2006) :

1. La fixation de l'EGF sur son récepteur induit sa dimérisation, chaque molécule de récepteur phosphoryle l'autre sur des résidus tyrosine spécifiques, on parle de transphosphorylation.
2. La protéine Grb2 possède un domaine SH2 qui est capable de reconnaître les résidus tyrosines phosphorylés. Grb2 possède aussi un domaine SH3 qui va permettre la fixation d'autres protéines, et sert donc d'adaptateur.
3. La protéine Sos se lie au domaine SH3 de Grb2. C'est une protéine capable d'échanger des nucléotides de type guanine (GEF pour Guanine Exchange Factor).

Elle permet d'échanger le GDP (Guanine Di-Phosphate) de la protéine Ras contre une molécule de GTP (Guanine Tri-Phosphate).

4. La protéine Ras est fixée à la membrane plasmique, inactive lorsque liée au GDP et active lorsque le GDP est remplacé par du GTP. Une fois activée, Ras se lie à la protéine kinase Raf et l'active.
5. Raf phosphoryle MEK (une MAP2K) ce qui l'active. Elle va à son tour phosphoryler des MAPK dont la protéine kinase Erk.
6. Erk active une pléiade de facteurs de transcriptions dont le facteur Myc (qui est le produit issu de la transcription du gène c-Myc).
7. Myc va alors activer la transcription de la cycline D.

L'expression de la cycline D va permettre à la cellule d'entrer dans le cycle cellulaire suite à l'activation des CDK4 et 6 comme nous l'avons vu précédemment. Cette voie de signalisation permet donc de lier la réponse à des facteurs de croissance extracellulaires à une réponse au niveau du noyau qui va conduire à la prolifération des cellules.

Cependant la voie des MAPKs n'est pas la seule activée par l'EGF ; la voie JAK/STAT ainsi que la voie de la kinase PI3 (phosphatidyl-inositol-3) /Akt/mTOR qui vont activer le facteur de transcription NFκB sont aussi stimulées. L'ensemble des trois voies de signalisation vont induire la transcription de facteurs anti-apoptotiques tels Bcl-2 en sus de la cycline D (Engel et al., 2013; Shilo, 2005).

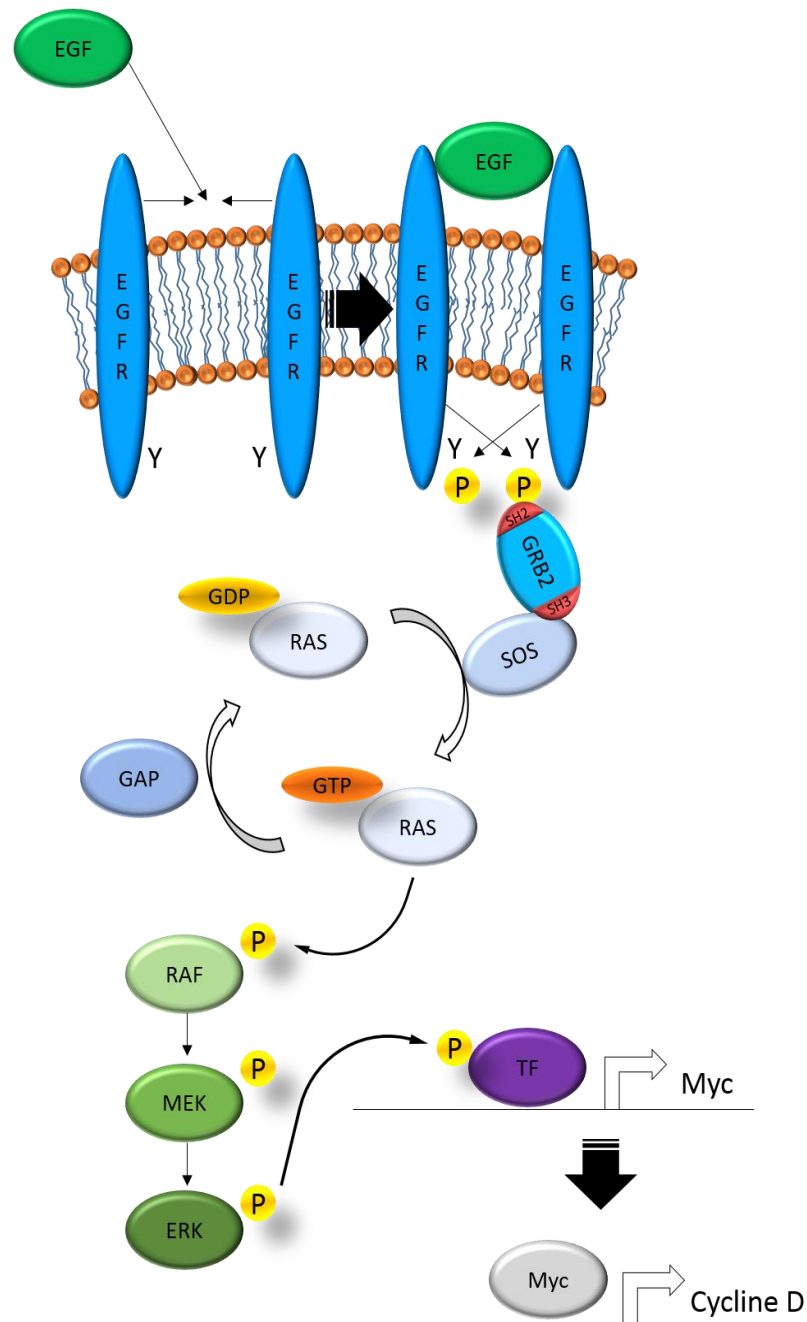


Figure 19 : La voie de signalisation de l'EGF.

Les récepteurs de l'EGF de la famille ErbB possèdent un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire, ainsi qu'un domaine cytoplasmique portant une activité tyrosine kinase. La reconnaissance de l'EGF par son récepteur provoque sa dimérisation qui conduit à une transphosphorylation d'une tyrosine du domaine cytoplasmique. La protéine GRB2 possède un domaine SH2 capable de lier ces tyrosines phosphorylées et domaine SH3 qui va recruter la protéine SOS qui permet le remplacement du GDP de la protéine RAS par du GTP ce qui a pour conséquence de l'activer. RAS-GTP peut alors phosphoryler RAF (une MAP3K) activant alors la voie de phosphorylation des MAPKs. La MAP2K MEK est phosphorylée et active à son tour ERK (une MAPK) qui phosphoryle de nombreux facteurs de transcription pour conduire à la transcription des gènes cibles. Parmi eux, le gène Myc qui conduit à l'expression du facteur de transcription Myc qui va alors par voie de conséquence permettre la synthèse de la cycline D. Les cellules réagissant ainsi sont capables d'entrer dans le cycle cellulaire même si elles étaient à l'état quiescent en phase G0. La protéine GAP permet l'hydrolyse du GTP de RAS pour contrôler la réponse et limiter la croissance cellulaire.

ii. Les facteurs de croissance mitogènes : La voie de signalisation Wnt

La signalisation par les glycoprotéines sécrétées de la famille Wnt est un mécanisme principal de la prolifération cellulaire, de leur polarité ainsi que du devenir des cellules pendant l'embryogénèse mais aussi pour le maintien de l'homéostasie des tissus (Logan and Nusse, 2004). La voie de signalisation Wnt contrôle la protéolyse de la protéine Caténine- β (bCAT) qui est un coactivateur de la transcription. De nombreux acteurs sont impliqués dans cette voie de signalisation, nous allons donc décrypter cette voie en absence de Wnt et en présence de Wnt.

En l'absence de la protéine Wnt :

La bCAT est constamment dégradée par l'action du complexe Axine, l'empêchant d'accéder au noyau pour jouer son rôle de co-activateur de la transcription. La protéine Axine joue un rôle de plateforme qui regroupe deux protéines kinases, GSK3 (pour Glycogen synthase kinase 3) et la caséine kinase 1A (CK1), ainsi qu'un complexe d'une vingtaine de sous unités possédant une activité E3 ubiquitine-ligase nommé Adenomatous Polyposis Coli (APC).

Initialement, la protéine bCAT est phosphorylé sur le résidu S45 par CK1 (Zeng et al., 2007), puis GSK3 peut alors à son tour la phosphoryler sur les résidus S33, S37 et T41 (Peifer et al., 1994). Ensuite, la protéine Trcp- β , une sous-unité d'APC qui est une E3 ubiquitine-ligase, va polyubiquitinyler bCAT. qui sera prise en charge par le protéasome et dégradée (He, 2004; MacDonald et al., 2007) (figure 20).

Pendant ce temps, dans le noyau de la cellule, le facteur de transcription TCF (pour DNA-bound T Cell Factor, aussi nommé LEF pour Lymphoid Enhancer Factor) recrute la protéine TLE associée à une activité Histone désacétylase (HDAC), ce qui inhibe la transcription des gènes cibles dont la cycline D (Esufali and Bapat, 2004).

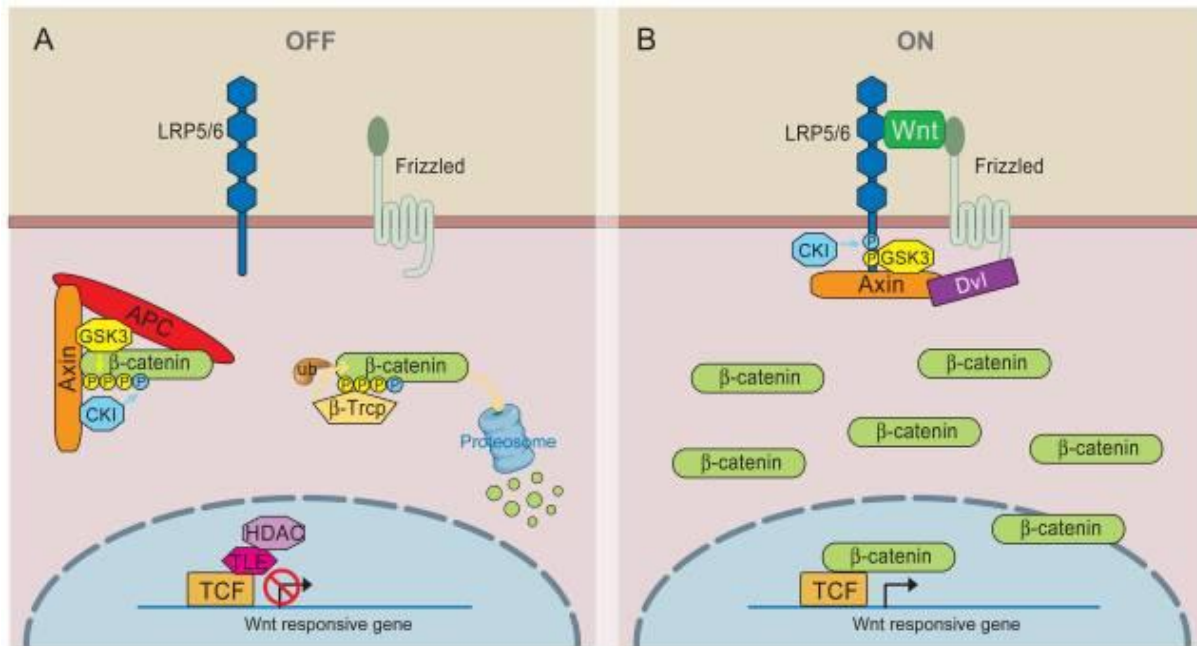


Figure 20 : La voie de signalisation Wnt/βcaténine.

En absence de signalisation par Wnt, la protéine β -caténine est dégradée par le complexe APC/Axine. Pour cela les kinases CKI et GSK3 phosphorylent la β -caténine qui est alors polyubiquitinylée par β -Trcp et envoyée au protéasome pour y être dégradée. Le facteur de transcription TCF est alors retrouvé associé à la protéine TLE qui recrute des histones désacétylases pour induire la formation d'hétérochromatine et la répression des gènes de réponse à Wnt. En présence de Wnt, le récepteur Frizzled se dimérise avec la protéine LRP5/6 ce qui conduit au recrutement des protéines Dvl et Axine au niveau de la membrane. Les kinases CKI et GSK3 sont recrutées par la protéine Axine pour phosphoryler LRP5/6 et ne sont donc pas disponibles pour marquer la β -caténine. Celle-ci s'accumule et entre dans le noyau pour se fixer au facteur de transcription TCF qui ne peut alors plus interagir avec TLE et va donc permettre la synthèse des gènes de réponse à la voie Wnt.

En présence de la protéine Wnt :

La fixation de la glycoprotéine Wnt sur son récepteur Frizzled (Fz) va induire sa dimérisation avec le récepteur LRP6 (pour Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 6) ou LRP5. Fz est un récepteur qui possède 7 domaines transmembranaires, sa région N-terminale extracellulaire est le site de reconnaissance de Wnt alors que sa partie C-terminale intracellulaire permet l'interaction avec les protéines de signalisation (He, 2004; Tamai et al., 2004; Wehrli et al., 2000). LRP6 est un récepteur qui ne contient qu'un seul domaine transmembranaire et une partie C-terminale intracellulaire qui possède 5 motifs répétés de type PPPSPXS (Zeng et al., 2005). Lors de la dimérisation de Fz et LRP6, La protéine Dishevelled (Dvl) est recrutée ainsi que l'Axine associée à GSK3 et CK1. GSK3 phosphoryle la première sérine de chaque motif puis CK1 la seconde. Notons que les kinases interviennent ici dans l'ordre inverse de la situation en absence de Wnt. La substitution de la première sérine de ces motifs ou la délétion des motifs rend la stimulation par Wnt complètement

inefficace (Brennan et al., 2004). De plus la proximité entre Fz et LRP6 est suffisante pour induire le même effet que la signalisation par Wnt même en son absence (Cong, 2004; Holmen et al., 2005; Liu et al., 2005). Le recrutement du complexe Axine au niveau de la membrane plasmique va permettre d'éviter la dégradation de la protéine bCAT mais aussi la dégradation d'Axine (Tolwinski et al., 2003). la protéine bCAT libre pourra entrer dans le noyau de la cellule et interagira avec TCF ce qui induira l'activation de la transcription des gènes cibles, dont celui de la cycline D (He, 2004).

Wnt active aussi d'autres voies de signalisation qui conduisent notamment à la répression de la quantité d'APC cellulaire, permettant une prolifération plus importante des cellules souches des cryptes de l'épithélium gastrique (MacDonald et al., 2009).

La cellule possède donc des CDKs qui permettent la progression dans le cycle cellulaire lorsqu'elles sont activées par les cyclines. De plus elle est capable de réagir à des stimuli mitogènes extracellulaires via des récepteurs spécifiques qui vont activer des voies de signalisation. Cependant pour le maintien de l'homéostasie des tissus adultes, il est absolument indispensable à l'organisme de posséder des mécanismes de contrôle de cette prolifération à plusieurs niveaux.

D. Régulation négative du cycle cellulaire

L'homéostasie des tissus adultes est caractérisée par un pool de cellules souches qui demeurent à l'état quiescent, celles-ci donnent parfois naissance à une cellule fille nommée cellule progéniteur qui aura la capacité de se diviser rapidement. Pour maintenir cet état quiescent, les cellules vont recourir à des inhibiteurs de CDKs.

Les cellules épithéliales quant à elles, prolifèrent uniquement lorsqu'elles sont stimulées par des facteurs de croissance mitogènes. Cependant la croissance des cellules épithéliales est un phénomène local. Afin de stopper cette croissance et éviter d'envahir les tissus avoisinants, les cellules responsables du signal mitogène, ainsi que celles qui en sont cibles, vont sécréter des facteurs anti-mitogènes.

Cependant, toute cellule qui prolifère doit éviter de transmettre une information erronée aux cellules filles, pour cela, la cellule est dotée de mécanismes de sauvegarde qui lui permettent d'interrompre le cycle cellulaire. Ceux-ci peuvent se déclencher suite à une

mauvaise réplication de l'ADN en phase S pour laisser intervenir le système de réparation des erreurs, mais aussi suite à des dommages à l'ADN induits, par exemple par des rayonnements ultraviolets ou des agents alkylants. La cellule peut aussi interrompre la mitose si la ségrégation des chromosomes ne s'est pas déroulée correctement. En cas de dommage irréversible ou de signal spécifique, la cellule est capable de se « suicider » en empruntant la voie de l'apoptose.

Tous ces mécanismes agissent de concert pour éviter l'apparition de dommages, mais surtout leur transmission qui pourrait générer une instabilité chromosomique et génomique pouvant conduire à une prolifération incontrôlée des cellules donnant naissance à un cancer.

i. Les inhibiteurs de CDKs

Deux familles de protéines inhibitrices régulent l'activité des CDKs (CKI). La famille INK4 qui comprend les membres INK4A, INK4B, INK4C et INK4D et la famille Cip/Kip composée des protéines p21, p27 et p57. Ces protéines inhibent l'activité des complexes CDKs/cyclines en s'y fixant et auront pour rôle de limiter la croissance cellulaire. Ceci permet d'éviter le développement de tumeurs.

Les deux familles de CKIs

Les protéines INK4A, B et C modulent le renouvellement des cellules souches et des progéniteurs (CSP) pulmonaires, hématopoïétiques, pancréatiques et ceux du cerveau (Janzen et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2006; Molofsky et al., 2006; Pei et al., 2007; Rosu-Myles et al., 2007; Yu, 2005; Yuan et al., 2004).

Les protéines p21 et p27 inhibent la prolifération des CSP hématopoïétiques et intestinaux (Cheng, 2000; Choudhury et al., 2006; Fasano et al., 2007; Kippin, 2005; Pechnick et al., 2008; Walkley et al., 2005). Parallèlement, les souris qui expriment une protéine p27 mutante, incapable de se lier aux complexes CDKs-cyclines, présentent une population de CSPs bien plus importante que les souris témoins et développent de nombreuses tumeurs (Besson et al., 2007).

Contrôle de l'expression des CKIs

La voie TGF β (pour Transforming Growth Factor β) est impliquée dans l'inhibition de la croissance cellulaire. Pour cela, elle induit l'expression de certains CKI (INK4A et B, p21 et 27) qui sont nécessaires pour limiter la croissance des CSPs lors du phénomène de régénération après blessure (Carlson et al., 2008). Ensembles, ces résultats montrent bien que la présence des CKIs est nécessaire pour éviter le développement de tumeurs, bien que leur absence puisse être bénéfique pour la prolifération des CSPs afin de régénérer une blessure.

La voie Notch a un effet antagoniste de la voie TGF β car elle inhibe l'expression des CKIs, et permet de ce fait la croissance et la différenciation des CSP adultes (Ehebauer et al., 2006). Cette voie inhibe directement la voie TGF β en empêchant la protéine SMAD3 phosphorylée (qui transmet la signalisation de la voie TGF β) de se lier à leurs promoteurs. (Carlson et al., 2008; Carlson and White, 2012).

ii. La voie TGF β

La voie de signalisation TGF β contrôle de nombreux processus cellulaires dont notamment la prolifération, la différenciation, l'apoptose. Les protéines TGF β sont actives sous forme de dimères stabilisés par des interactions hydrophobes et trois ponts disulfures inter sous-unités (Massague, 2000).

Les protéines TGF β sont reconnues par des récepteurs membranaires de type sérine/thréonine kinases qui forment des hétérodimères lors de la fixation du ligand. La stœchiométrie du récepteur est de deux molécules de récepteur de type I et deux molécules de récepteur de type II. Cela permet au récepteur de type II de phosphoryler celui de type I qui propage alors le signal à l'intérieur de la cellule en phosphorylant des protéines de la famille Smad. Il existe sept récepteurs de type I et 5 récepteurs de type II (Manning, 2002). Les protéines Smad, au nombre de huit sont divisées en trois catégories :

1. Les protéines Smad régulées par les récepteurs (R-Smad) qui sont phosphorylées par les récepteurs de type I dont font partie Smad1, 2, 3, 5 et 8.
2. La protéine Smad4 qui est un co-régulateur des protéines Smad (Co-Smad)

3. Les protéines Smad inhibitrices 6 et 7 (I-Smad) qui inhibent la signalisation de la voie TGF β en compétant avec les R-Smad pour les récepteurs de type I ou les Co-Smad ou bien encore en conduisant à la dégradation des récepteurs.

La phosphorylation des R-Smad entraîne leur homotrimérisation leur permettant de former un complexe avec la protéine Co-Smad et leur adressage au noyau. Leur localisation nucléaire va permettre d'activer la transcription des gènes cibles (Dijke et al., 2000; Massague, 2000; Patterson and Padgett, 2000). Afin de faciliter l'activation des R-Smads par les récepteurs de type I, Smad 2 et 3 sont séquestrés au niveau de la membrane plasmique par une protéine nommée SARA (pour Smad Anchor for Receptor Activation)(Tsukazaki et al., 1998).

Smad4 et les R-Smad (à l'exception de Smad2) nucléaires se fixent à l'ADN au niveau d'un élément de type SBE (pour Smad Binding Element de séquence minimale AGAC) (Dennler et al., 1998; Yingling et al., 1997; Zawel et al., 1998). Les protéines Smads sont aussi capables de lier les séquences d'ADN riches en G/C (Ishida, 2000). L'incapacité de Smad2 à se fixer aux éléments SBE est due à une faible affinité (comparé aux autres R-Smads) qui provient de l'insertion de 30 acides aminés dans la boucle de reconnaissance (Yagi, 1999). Ceci n'est vrai que pour le variant d'épissage de Smad2 le plus exprimé car il existe un variant bien moins exprimé qui ne possède pas ces 30 acides aminés et qui lie correctement les SBE.

Les protéines Smads coopèrent avec des facteurs de transcription pour induire la transcription ou la réprimer au niveau de 500 gènes cibles dans les lignées cellulaires Mv1Lu ou HepG2. L'expression de l'inhibiteur de CDK Ink4b est un des principaux constituants de la réponse cytotatique au TGF β . Pour cela, les Smads coopèrent avec Sp1 afin d'activer la transcription du répresseur de CDKs (Feng et al., 2000; Seoane et al., 2001). Le mécanisme de réponse peut aussi être indirect, par exemple les Smads coopèrent avec le facteur de transcription E2F et p107 pour inhiber l'expression du facteur c-Myc qui n'est alors plus capable de réprimer l'expression d'inhibiteur des CDKs tel Ink4b (Chen et al., 2002).

iii. Les points de contrôle du cycle cellulaire ou « Checkpoints »

L'activité des CDKs est régulée par des points de contrôle qui empêchent une cellule de transmettre une information génétique erronée.

Les lésions qui peuvent survenir au niveau de l'ADN sont variées. Par exemple, les cassures double-brin (DSB, pour DNA double strand break) sont une menace pour la stabilité du génome. Elles peuvent interférer avec la réplication de l'ADN et la division cellulaire et peuvent être générées :

- par des radiations ionisantes (IR)
- par des composés chimiques (comme les inhibiteurs de topo-isomérases).
- par des mécanismes internes à la cellule comme la recombinaison VDJ lors de la maturation des anticorps ainsi que la maturation des cellules germinales (Nussenzweig and Nussenzweig, 2010; Sasaki et al., 2010).
- suite à une exposition à des espèces réactives d'oxygène (ROS pour Reactive Oxygene Species)
- suite à la limitation de nucléotides disponibles pendant la synthèse d'ADN (Bester et al., 2011; Tsantoulis et al., 2007).

La cellule possède des censeurs qui lui permettent d'établir une réponse aux dommages dus à l'ADN (DDR pour DNA Damage Response) afin de conserver son intégrité génomique (Jackson and Bartek, 2009). La DDR combine un ensemble de processus qui permettent d'analyser les points de contrôle du cycle cellulaire, la transcription, la machinerie de réparation des lésions mais aussi le devenir de la cellule (apoptose ou sénescence) en cas de dommages non réparables (figure 21). Les deux principaux mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN sont la recombinaison d'extrémités non homologues (NHEJ pour Non-Homologous End-Joining) qui a lieu lors de réparation de cassure au cours du cycle cellulaire et la réparation par homologie (HDR pour Homology Directed Repair) uniquement possible en S/G2 lorsqu'une chromatide sœur peut servir de modèle (Chapman et al., 2012).

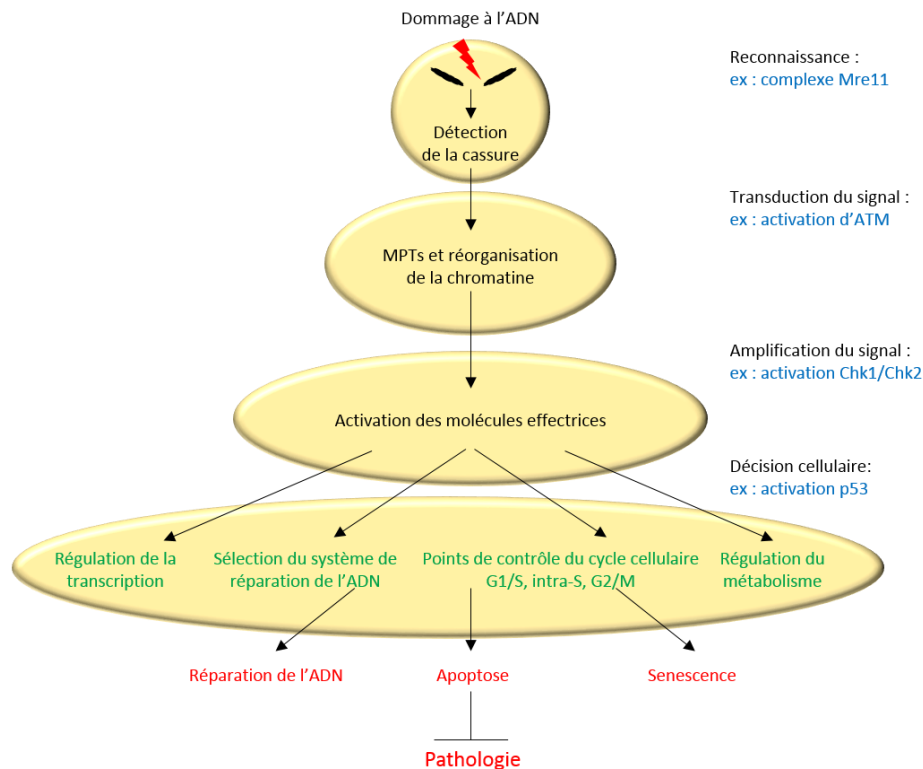


Figure 21 : La réponse des dommages à l'ADN de type cassure double brin (DSB).

Les cellules possèdent des complexes protéiques, tel le complexe Mre11 reconnaît les DSBs. Cela conduit à l'activation de la kinase ATM qui va induire des modifications post traductionnelles sur de nombreuses cibles ainsi qu'un remodelage local de la chromatine. Les protéines cibles vont amplifier le signal (Chk2/Chk1) pour activer les points de contrôle, la réparation de l'ADN, via une régulation de la transcription et qui va conduire également à des modifications du métabolisme cellulaire. Il en résultera la réparation des lésions si possible et, dans le cas contraire la cellule entrera en sénescence ou en apoptose en fonction du contexte cellulaire. Un des principaux acteurs de cette décision est la protéine p53 aussi nommée « gardien du génome ». L'ensemble de ces réponses a pour principal objectif de maintenir à tout prix la stabilité génomique afin d'éviter de transmettre une information génétique erronée à de futures générations de cellules (Stracker 2013).

La réponse aux dommages à l'ADN

Le complexe MRN et la protéine ATM

Un des principaux acteurs de la DDR est la kinase ATM (pour Ataxia-telangiectasia Mutated). Cette pathologie neurodégénérative induit une perte de la coordination des membres ainsi qu'une dilatation des petits vaisseaux causant une immunodéficience prédisposant aux infections. L'inactivation de la kinase ATM empêche la réparation des DSBs et prédispose à certains types de cancers suite à l'augmentation de l'instabilité génomique et de défauts de l'apoptose (McKinnon, 2012; Stracker and Petrini, 2011). La protéine kinase ATM est activée par le complexe MRN formé des protéines Mre11-Rad50-Nbs1 qui est capable de se lier aux cassures (Stracker and Petrini, 2011). L'activation d'ATM implique une autophosphorylation de la protéine sur plusieurs résidus sérine (S367, S1893, S1981 et

S2996). Ces phosphorylations permettent à la kinase de passer d'un état inactif dimérique à deux monomères actifs (Bakkenist and Kastan, 2003; Kozlov et al., 2006). En absence d'activation par le complexe MRN, l'activation non désirée d'ATM est contrôlée par les protéines phosphatases 2A et 5 (PP2A et PP5) et la phosphatase WIP1 (pour Wild type p53-induced phosphatase) qui inhibent l'autophosphorylation d'ATM (Ali et al., 2004; Goodarzi et al., 2008).

La protéine TIP60

La seconde modification post-traductionnelle nécessaire à l'activation d'ATM est l'acétylation de la lysine 3016 par la protéine acétyl-transférase TIP60 (Sun et al., 2005). L'activité de TIP60 est fortement dépendante du facteur de transcription ATF2 et de l'interaction avec les histones H3 triméthylés sur la lysine 9 (H3K9me3) (Bhoumik et al., 2005).

Les H3K9me3 sont une marque de chromatine compactée et sont recouverts par la protéine HP1 (pour Heterochromatin Protein 1) en absence de DSB. La présence de DSB induit un détachement de la protéine HP1 qui permet l'interaction avec TIP60. La localisation de TIP60 au niveau des H3K9me3 dépend du complexe MRN (Sun et al., 2009).

ATF2 interagit avec TIP60 et contrôle son activité et son niveau d'expression avant que les DSBs n'apparaissent. En présence de dommage, ATF2 se dissocie de TIP60 qui va activer ATM (Bhoumik et al., 2008).

Le point de contrôle de la transition G1/S

Les cellules qui possèdent des lésions sur leur ADN ne doivent pas entrer en phase S afin d'éviter la réplication d'erreurs. Le point de contrôle de la transition G1/S dépend de l'activité de la protéine p53 qui est un substrat d'ATM. La phosphorylation du résidu S15 de p53 par ATM suite à des dommages à l'ADN permet de stabiliser p53 (Chao et al., 2006). Dans les cellules déficientes en ATM, p53 est dégradée ce qui conduit à une prolifération, alors que les cellules devraient stagner en G1. (Banin, 1998; Canman, 1998; Siliciano et al., 1997). Les souris déficientes pour les protéines ATM ou p53 subissent des réarrangements chromosomiques importants dans les lymphocytes et sont sujettes au développement de nombreux lymphomes (Deriano et al., 2011; Zhu et al., 2002). De ce fait, la protéine p53 a

été classée comme suppresseur de tumeurs. On la nomme aussi « gardien du génome » (Massagué, 2004). Des souris qui expriment une forme de la protéine p53 non acétylable présentent des défauts au niveau du checkpoint G1/S mais aussi des problèmes d'apoptose et de sénescence en réponse au dommages à l'ADN, mais elles ne développent pas de tumeurs rapidement (Liu et al., 2014). De plus, les CKIs tels p21 sont surexprimés lors de l'activation du point de contrôle pour inhiber l'activité des CDKs (Bartek et al., 2004).

Le point de contrôle durant la phase S

Le point de contrôle en cours de phase S est régulé par les kinases Chk1 et Chk2 (pour Checkpoint kinase 1 et 2) qui phosphorylent la protéine phosphatase CDC25A. Cette phosphatase active la CDK2 en déphosphorylant des résidus proches de son site actif. La phosphorylation de CDC25A par Chk1 et 2 inhibe son activité phosphatase résultant en une CDK2 inactive et au blocage des origines de réplication (Falck et al., 2002).

Le complexe MRN en conjonction avec la kinase ATM va activer plusieurs cibles cellulaires. ATF2 et SMC1 (un composant de la cohésine) sont les cibles majoritaires d'ATM lors de ce point de contrôle (Bhoumik et al., 2005; Difilippantonio et al., 2007; Kitagawa, 2004; Stracker and Petrini, 2011). Ces deux protéines sont phosphorylées par ATM, ATF2 est phosphorylée sur les résidus S490 et S498 et permet le recrutement des Chk1 et 2 aux *foci* de réparation qui contiennent l'histone γ H2AX. (Bhoumik et al., 2005).

Le mécanisme exact et l'implication de ce point de contrôle dans les pathologies humaines ne sont pas connus car des défauts du point de contrôle de la phase S ne génèrent pas de pathologie sévère chez les animaux modèles (Difilippantonio et al., 2007; Foster et al., 2012; Kitagawa, 2004).

Le point de contrôle de la transition G2/M

L'apparition de DSBs, suite par exemple à des radiations ionisantes au cours de la phase G2, va activer le point de contrôle de la phase G2/M. Ce point de contrôle est directement lié aux mécanismes de réparation par recombinaison homologue (HR).

Le complexe MRN reconnaît la DSB et recrute ATM qui va activer le mécanisme de résection des extrémités d'ADN permettant la réparation par HR. Les nucléases DNA2 et EXO1 fonctionnent en conjonction avec CtIP qui est activé par phosphorylation via ATM.

Elles permettent de générer deux fragments d'ADN simple brin qui sont recouverts par la protéine RPA. La protéine kinase ATR (ATM and Rad3 related) et son partenaire ATRIP (pour ATR interacting protein) sont recrutés au niveau des ADNs simples brins protégés par RPA, tout comme RAD17 et la topo-isomérase TopBP1 via le complexe 9-1-1.

RAD17 et TopBP1 vont activer la recombinaison homologue alors qu'ATR/ATRIP, qui est maintenant active, va bloquer l'entrée en mitose. Pour cela ATR phosphoryle Chk1 qui induit la dégradation de la phosphatase CDC25A qui ne peut plus activer la CDK1. Le cycle cellulaire est alors stoppé pour permettre la réparation (Ciccia and Elledge, 2010; Iliakis et al., 2003) (figure 22).

Après réparation, le cycle cellulaire peut reprendre son cours, l'activité de la CDK1 est restaurée par un processus qui dépend de l'activation de PLK1 par la kinase AURORA A et son partenaire BORA (Macûrek et al., 2008; van Vugt et al., 2005; 2004).

Le contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique

L'assemblage du fuseau mitotique est un évènement important et la cellule doit s'assurer que chaque cellule fille recevra une chromatide. La protéine Mad2 est capable de se lier aux kinétochores, mais uniquement lorsque ceux-ci ne sont pas associés au fuseau mitotique. La protéine Mad2 libre n'est pas active, cependant, si au moins une chromatide d'un seul chromosome ne se fixe pas au fuseau mitotique, la protéine Mad2 qui sera fixée au kinétochore va inhiber APC/C (Anaphase promoting complex/cyclosome, voir figure 14). Alors, la sécurine ainsi que la cycline B ne seront pas dégradées ce qui va empêcher les chromatides sœurs de se détacher l'une de l'autre jusqu'à ce que tous les chromosomes soient correctement attachés (Homer, 2005).

Lors de la mitose il ne semble pas y avoir de mécanisme de checkpoint en réponse aux dommages. Cependant en absence de dommages, la kinase AURORA B phosphoryle ATM sur la sérine 1403 ce qui lui permet d'activer la protéine BUB1. Le rôle de cette voie n'est pas élucidé, mais ce mécanisme n'est pas observé en présence de dommages (Stracker, 2013).

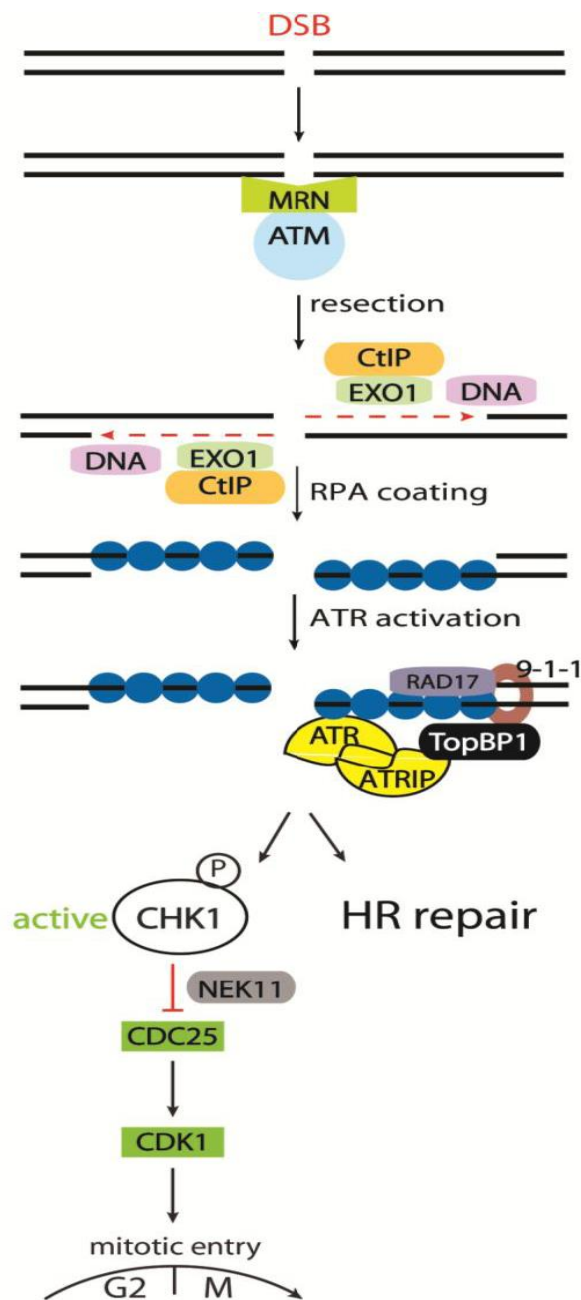


Figure 22 : Le point de contrôle d'entrée en mitose.

Les cellules, qui subissent des dommages à l'ADN induisant des cassures double brin (DSB), ne doivent pas entrer en mitose pour éviter une instabilité génomique. Le complexe MRN est un censeur des DSB et permet d'y recruter la kinase ATM. Le mécanisme de resection des cassures est alors activé : La protéine CtIP est phosphorylée par ATM ce qui lui permet d'agir pour la génération d'extrémités simple brin en conjonction avec les nucléases EXO1 et DNA2. L'ADN simple brin est rapidement recouvert par la protéine RPA qui recrute divers partenaires protéiques. RAD17 et TopBP1 permettent d'activer la recombinaison homologue à l'aide du complexe 9-1-1 alors que la kinase ATR et son partenaire ATRIP vont phosphoryler la protéine CHK1. Ceci conduit à l'arrêt du cycle cellulaire. Le mécanisme sous-jacent met en jeu la protéine phosphatase CDC25 qui déphosphoryle CDK1 et l'active. Lorsque la protéine CHK1 est phosphorylée, CDC25 est dégradée et ne peut donc plus activer la CDK1. La dégradation de CDC25 par CHK1 est dépendante de la protéine NEK11 (Ciccia and Elledge, 2010).

3. Disfonctionnements de la régulation du cycle cellulaire : les cancers

La dérégulation du cycle cellulaire est un phénomène commun pour le développement de cancers mais pas le seul nécessaire. Les cellules cancéreuses présentent souvent une prolifération incontrôlée (perte de la nécessité d'activation de la prolifération mais aussi défaut d'apoptose), une instabilité génomique (un grand nombre de mutations au niveau de l'ADN ainsi que des aberrations chromosomiques dues à des recombinaisons) mais aussi une instabilité chromosomique (un nombre de chromosomes anormal conduisant à une aneuploïdie). L'acquisition de ces problèmes est graduelle et leur accumulation est exponentielle ; les cellules qui présentent de plus en plus de ces caractéristiques progressent vers un état tumoral.

Le cycle cellulaire des mammifères est contrôlé par certaines CDKs dont l'activité est modulée par des activateurs et des inhibiteurs et les changements d'expression de ceux-ci sont une étape de la progression tumorale. Ces changements peuvent être dus à une variation d'activité ou d'expression de facteurs de transcriptions, de modification de la chromatine, de modifications post-traductionnelles. La perte des points de contrôle peut aussi conduire à une augmentation de l'activité des CDKs mitotiques. Cependant, les tumeurs dérivées de lignées cellulaires spécifiques peuvent requérir la présence d'une CDK non nécessaire en l'absence de phénotype tumoral. Ainsi, la CDK4 qui n'est pas nécessaire au développement des glandes mammaires est indispensable au développement de tumeurs dérivées des cellules de ces glandes (Malumbres 2009). De plus certaines voies de signalisation permettent de répondre à des signaux extracellulaires pour délivrer aux cellules un signal cytotatique. La mutation ou la perte d'activité de telles voies de signalisation conduit également à une prolifération incontrôlée, c'est le cas par exemple de mutations dans la voie TGF β -smad (Massagué 2000).

Partie 3 : La sélection d'anticorps recombinants

Les anticorps sont des outils indispensables pour analyser spécifiquement des protéines particulières. Ils sont utilisés pour leur spécificité et leur capacité à reconnaître un antigène ainsi que pour leur haute affinité. Les anticorps portent ce nom car ils permettent la reconnaissance de corps étrangers par le système immunitaire. Ils sont sécrétés en cas de réponse immunitaire de type T_H2 par les lymphocytes B différenciés en plasmocytes.

1. Structure et format des anticorps

A. La structure des Immunoglobulines G

Les immunoglobulines (Ig) forment une famille de protéines classiquement appelées « anticorps ». Le nom de cette famille provient des structures globulaires formées par le repliement des chaînes protéiques stabilisées par des ponts disulfures (Williams & Barclay, 1988). Il existe des immunoglobulines de type A, D, E, G ou M qui se différencient par leurs chaînes lourdes de type α , δ , ϵ , γ ou μ , respectivement obtenues après la commutation isotypique réalisée par les lymphocytes B. Nous parlerons uniquement des IgGs qui sont parmi les plus utilisées dans le milieu de la recherche, du diagnostic mais aussi de la médecine car elles représentent 80% des Igs circulantes dans le sang et sont donc celles majoritairement récupérées lors d'immunisation d'animaux de laboratoires.

Il existe quatre types d'IgG (IgG1-4) définies par quatre types de chaînes lourdes. Chaque chaîne lourde possède 3 domaines constants (C_{H1-3}) et un domaine variable (V_H) alors que chaque chaîne légère n'est constituée que d'un domaine constant (C_L) et un domaine variable (V_L). Les IgG possèdent deux chaînes lourdes et deux chaînes variables organisées en « Y » (figure 23). Les domaines variables forment le fragment variable de l'anticorps (Fv), et chaque domaine variable contient 3 boucles hypervariables (CDR pour Complementary Determining Region) de 5-15 acides aminés qui forment le site de reconnaissance de l'antigène (Schroeder & Cavacini, 2010). La diversité des boucles hypervariables est accrue par le phénomène de recombinaison VDJ (VJ pour les chaînes légères) ainsi que par le phénomène d'hyper-mutation somatique (Janeway et al., 2001).

En thérapie les anticorps utilisés risquent de créer des réactions immunitaires non désirées chez certains patients. Il s'agit des réactions où le patient réagit contre l'anticorps. Pour éviter cela, les anticorps thérapeutiques produits chez les animaux de laboratoires sont « humanisés » c'est-à-dire que l'on remplace la majorité des séquences constantes par des séquences humaines. Une autre possibilité explorée est d'utiliser des formats d'anticorps qui ne sont que des fragments plus petits qui génèrent donc moins de réactions chez les patients.

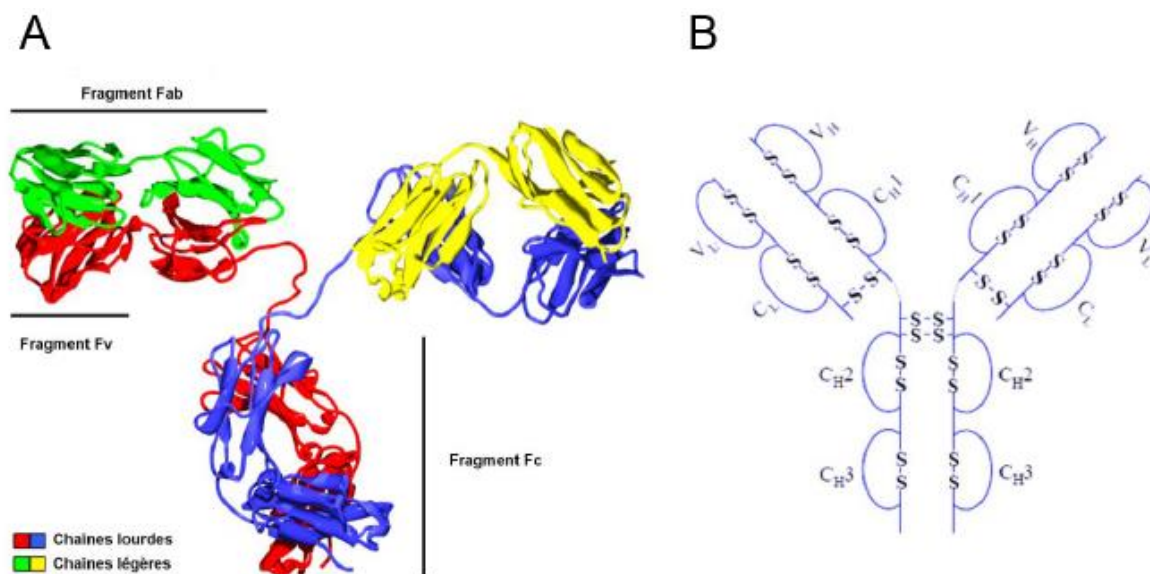


Figure 23 : La structure tridimensionnelle et l'organisation d'une immunoglobuline G (IgG).

(A) Une IgG2 possède deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. Chacune des chaînes lourdes possède 3 domaines constants et un domaine variable alors que les chaînes légères possèdent chacune un domaine constant et un domaine variable. Le fragment Fv comprend le site de reconnaissance de l'antigène, il est constitué des domaines variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère (V_H et V_L). Le domaine V_H et le premier domaine constant de la chaîne lourde (C_{H1}) sont liés à la chaîne légère par un pont disulfure entre les deux domaines constants, l'ensemble de ces quatre domaines forme le Fab (pour Fragment Antigen-Binding). Le fragment cristallisable (Fc) permet la reconnaissance de l'IgG par le système immunitaire. (Harris et al, 1997, entrée PDB : 1IGT). (B) La représentation schématique d'une IgG permet de mettre en évidence les différents ponts disulfures intra- et inter- chaînes qui permettent à l'anticorps d'adopter sa structure en « Y » avec des domaines globulaires.

B. Le format scFv

Plusieurs formats de fragments d'anticorps peuvent être obtenus par digestion à l'aide de diverses protéases. La digestion d'une IgG par la papaine donne naissance à deux fragments de type Fab (pour Fragment Antigen Binding) ainsi qu'un fragment Fc (Fragment Crystallizable) ne contenant que des fragments de chaîne lourde. La digestion d'une IgG par la pepsine donne un fragment nommé Fab'2 qui contient les deux Fab liés par les ponts

disulfures entre les chaînes lourdes. Ces Fab'2 ont l'avantage de conserver la même capacité de reconnaissance à l'antigène que les anticorps complets. Le Fc est quant à lui dégradé en petits fragments. Il existe d'autres formats d'anticorps obtenus par voie recombinante, c'est-à-dire que les séquences d'intérêt sont fusionnées par des séquences de liaison ou « linker ». Parmi ceux-ci, nous pouvons citer les « minibodies », les « dia- tria- tetra-bodies » mais aussi les scFvs (Carter 2006).

Les fragments variables d'anticorps simple chaîne (scFv pour Single Chain Fragment Variable) sont les plus simples parmi les molécules d'anticorps recombinants. Ils sont constitués uniquement du fragment variable de la chaîne lourde (V_H) et du fragment variable de la chaîne légère (V_L) d'un anticorps, reliés par un petit « linker » flexible (figure 24). Chaque scFv ne possède donc qu'un seul site de liaison à l'antigène. Même s'il possède une affinité identique que l'anticorps dont il dérive (une IgG possède deux sites de liaison à l'antigène), il se liera à son antigène avec une plus faible avidité. Les scFvs possèdent l'avantage de pouvoir être produits à grande échelle et à moindre coût du fait de leur petite taille. Le revers de la médaille de cet avantage de taille pour la recherche est leur élimination rapide de la circulation sanguine par l'organisme. Les multimères de scFvs semblent être plus prometteurs pour la thérapie (Monnier 2013).

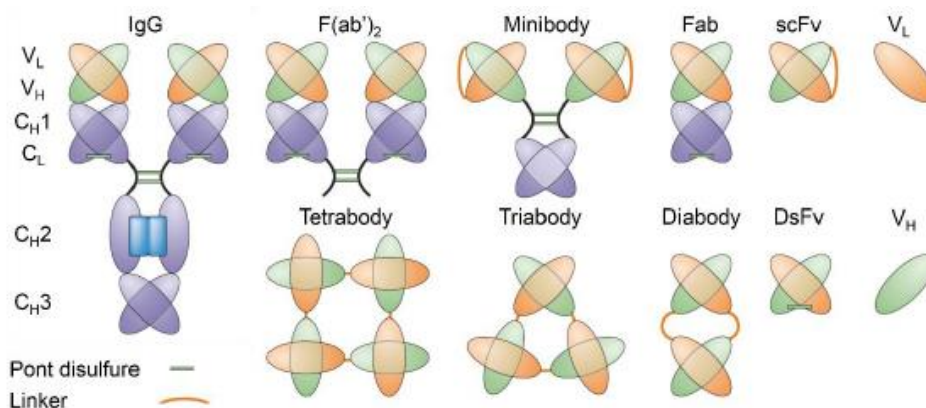


Figure 24 : Représentation schématique des différents formats d'anticorps.

En ingénierie moléculaire, de nombreux formats d'anticorps ont été imaginés et créés. Le format F(ab')₂ peut être obtenu par simple digestion enzymatique à la pepsine alors que les autres formats sont des constructions génétiquement modifiées. Le format scFv (pour single chain Fragment variable) est particulièrement intéressant car les scFv ne sont constitués que du domaine variable d'une chaîne lourde et légère d'une immunoglobuline, reliés par une courte séquence d'acides aminés flexible, permettant le repliement fonctionnel de la molécule (Adapté de Carter et. al, 2006 par Freund G.)

2. La méthode de sélection d'antigènes présentés par des phages

L'évolution des méthodes de biologie moléculaire a permis la construction de banques d'anticorps recombinants. Ces banques combinatoires permettent l'expression des différents clones. De plus, le lien physique entre la protéine exposée à la surface du phage et son ADN codé par le génome phagique permet d'accéder directement aux séquences d'ADN. Cette notion est appelée le lien entre le phénotype et le génotype. Une technique parmi celles les plus couramment utilisées, est la méthode de la présentation à la surface de phages filamenteux dite méthode du « phage display ». La banque utilisée permet l'expression de scFv (phénotype) à la surface de phages M13 qui possèdent un acide nucléique codant pour le scFv exprimé (génotype) nous permettant de ne pas rompre le lien phénotype-génotype ce qui constitue la puissance de cette technique.

A. Le phage M13

Présentation du phage filamenteux M13

Le bactériophage M13 (phage M13) se présente sous la forme d'un cylindre de 6,5 nm de diamètre et d'une longueur qui est fonction de l'acide nucléique encapsidé (Makowski 1994). C'est un phage filamenteux qui infecte les souches d'*Escherichia coli* possédant un pili. Ceux-ci sont codés par le facteur de conjugaison F' qui est un plasmide indépendant du chromosome bactérien.

Le phage M13 possède un génome sous forme d'ADN simple brin circulaire contenu dans une capsidie protéique constituée de cinq protéines différentes. Une extrémité de la capsidie contient cinq exemplaires des protéines pVII et pIX alors que l'autre extrémité renferme cinq molécules de pIII et pVI. Le corps de la capsidie est formé de plusieurs milliers de copies de la protéine pVIII (2500-3000 copies) et renferme l'ADN (figure 25a)(Kehoe et kay 2005). Les protéines pII, pV et pX sont impliquées dans l'accomplissement du cycle de réplication du phage M13.

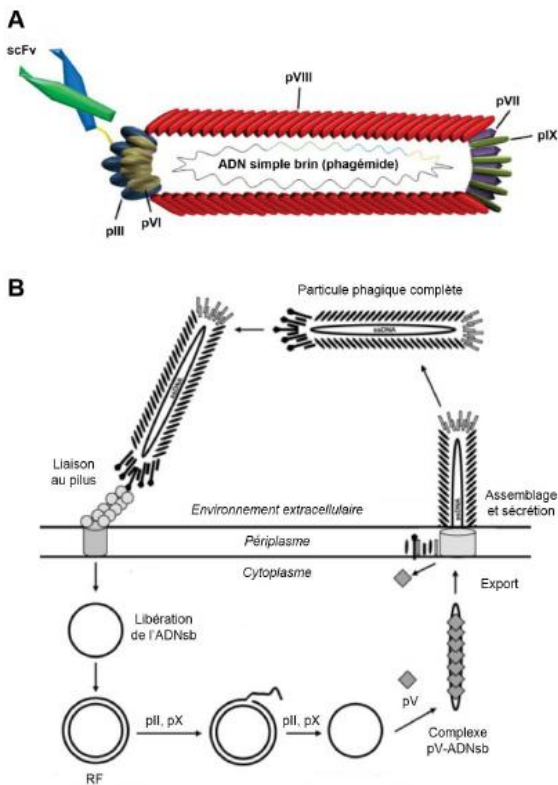


Figure 25 : La structure et le cycle de vie du bactériophage M13.

(A) Le bactériophage M13 présente 5 copies des protéines de capside pIII, pVI, pVIII, et pIX et plusieurs milliers de copies de la protéine pVIII en fonction de la taille de l'acide nucléique incorporé. La particule phagique représentée ici possède une de ses protéines pIII fusionnée à un scFv comme c'est le cas lors des sélections par la méthode du phage display. L'acide nucléique du phage M13 est simple brin et circulaire (Kierny et al, 2012). (B) Le cycle de vie du phage M13 implique la reconnaissance de la bactérie au niveau des pili par la protéine pIII. L'acide nucléique est alors internalisé et répliqué par la machinerie bactérienne. Les protéines pII et pX permettent l'amplification de l'ADN phagique et l'expression des protéines de capside. La protéine pV permet la maturation de l'ADN simple brin néosynthétisé et son encapsidation au niveau de la membrane interne de la bactérie (Kehoe et Kay, 2005).

Cycle de réplication du phage filamenteux M13

1. Les protéines pIII du phage reconnaissent l'extrémité du pilus de la bactérie ce qui va permettre aux protéines de capside de s'intégrer à la membrane bactérienne conduisant à l'internalisation de l'ADN phagique (Bratkovic 2009).
2. Les enzymes bactériennes synthétisent le brin complémentaire permettant le super-enroulement du génome phagique. On parle alors de forme répliquative (RF pour Replicative Form) car il va permettre l'amplification des particules phagiques.
3. Le brin complémentaire sert à synthétiser les ARNm des protéines phagiques pII et pX qui vont permettre d'amplifier le brin initial par le mécanisme du cercle roulant plus connu sous le nom de « rolling circle ».
4. Cela conduit à l'expression massive des protéines du phage ainsi qu'à de nombreuses copies de son génome qui sont toutes liées.
5. La protéine pV permet l'encapsidation et la segmentation des copies de génome phagique au niveau de la membrane interne de la bactérie grâce à un signal d'encapsidation et de clivage situé sur l'ADN simple brin du phage.

6. Les nouvelles particules phagiques assemblées peuvent alors traverser le périplasma, la membrane externe et la paroi de la bactérie pour se retrouver dans le milieu et infecter de nouvelles bactéries.

Ce processus n'est pas lytique, ainsi une bactérie infectée continuera à produire des particules phagiques telle une « usine à bactériophages » et continuera à se diviser à un rythme deux fois plus lent qu'une bactérie non infectée (figure 25b) (Kehoé et Kay 2005).

De plus, chaque bactérie ne peut être infectée que par un seul phage M13 car suite à l'infection les protéines du pili ne sont plus exprimées.

B. La sélection par la méthode du « phage display »

La technique du phage display repose sur plusieurs concepts qui permettent communément de maintenir le lien phénotype – génotype pendant les sélections :

1. Les scFvs sélectionnés sont exprimés en fusion avec la protéine pIII du phage M13
2. Chaque bactérie n'est infectée que par un seul phage
3. Le génome du phage peut être remplacé par un plasmide spécifique

i. L'expression des scFvs à la surface des phages

Pour être exprimés à la surface des phages, les scFvs sont fusionnés avec une des protéines de capsid. Plusieurs protéines sont des candidates à cette fusion, la protéine pVIII par exemple ainsi que la protéine pIII. La protéine pVIII est présente plusieurs milliers de fois (environ 2500) par phage. L'expression de scFvs fusionnés à la pVIII conduit à une grande avidité, hors il est plus intéressant de sélectionner des scFvs pour leur affinité (Kretzschmar & Geiser, 1995). La protéine pIII est donc un meilleur candidat car présente uniquement à 5 exemplaires par particule phagique (Hoogenboom et al., 1991). Il est donc possible de remplacer les séquences codant cette protéine du phage M13 par celle d'une chimère scFv-pIII dans le génome du phage. Cependant cela conduira à l'expression de phages qui possèdent cinq pIII fusionnées au scFv exprimé par le phage, ce qui conduit à i) des problèmes d'infection, ii) une augmentation de l'avidité qui peut être déterminante lorsqu'on recherche les molécules les plus affines (Hoogenboom et al., 2005).

Afin de pallier à ces problèmes d'avidité et de stabilité, les protéines pIII fusionnées aux scFvs de la banque peuvent être exprimées par un système de phagémide. Un phagémide est un plasmide qui contient un signal d'encapsidation, une origine de réplication phagique en plus de l'origine de réplication bactérienne et le gène de résistance à un antibiotique pour permettre la sélection, impliquant que le phagémide est répliqué et maintenu chez *E. coli*. Exprimer la pIII en fusion aux scFv dans un phagémide permettra de maintenir le lien phénotype-génotype car la séquence qui code pour le scFv sera encapsidée dans les phages qui portent la fusion pIII-scFv. Cependant le phagémide ne possède pas les gènes indispensables à la réplication du phage et il est donc nécessaire d'infecter les bactéries avec un phage auxiliaire dit « helper » qui apporte les gènes codant pour les protéines nécessaires à l'accomplissement du cycle du phage et à la production et l'encapsidation de particules phagiques. Le phage « helper » apporte aussi une copie de la protéine pIII associée avec un site de clivage à la trypsine. Les phages produits possèdent statistiquement une protéine pIII en fusion avec le scFv ainsi que 4 protéines pIII originaires du phage helper. Le site de clivage à la trypsine est nécessaire pour se débarrasser des phages qui auraient obtenu 5 protéines pIII originaires du phage « helper ». De plus l'ADN du phage « helper » n'est pas encapsidé, mais le phagémide l'est. On crée ainsi des phages qui (Mead & Kemper, 1988) :

1. Expriment 4 copies de la protéine pIII sensibles à la trypsine
2. Une protéine pIII en fusion avec le scFv
3. Portant un phagémide en place et lieu de son génome qui code pour le scFv porté

Cependant plusieurs paramètres sont à contrôler :

1. Le phage auxiliaire doit porter un gène de résistance à un antibiotique différent afin de pouvoir sélectionner les bactéries infectées
2. L'infection des bactéries par les phages qui portent la fusion scFv-pIII et le phagémide comme acide nucléique ne doit pas conduire à l'expression de cette fusion avant l'infection par le phage auxiliaire car la pIII est suffisante pour inhiber toute infection future par des phages filamenteux. Pour éviter ce désagrément la fusion scFv-pIII est exprimée sous la dépendance d'un promoteur T7 possédant un site de fixation au répresseur lacI de l'opéron lactose. De plus les souches bactériennes utilisées possèdent dans leur génome le gène mutant lacI^q qui réprime fortement les

promoteurs dotés d'un site de fixation à *lacI*. Il suffit donc de cultiver les bactéries dans un milieu riche en glucose pour inhiber l'expression de la fusion scFv-pIII et ainsi permettre l'infection par le phage « helper » (Hoogenboom et al., 2005 ; Hoogenboom et al., 1991).

ii. La sélection des scFvs d'intérêt

La première sélection par présentation sur phages a été réalisée en 1985 (Smith, 1985). Les phages qui expriment à leur surface un fragment d'anticorps sont sélectionnés par affinité pour la cible.

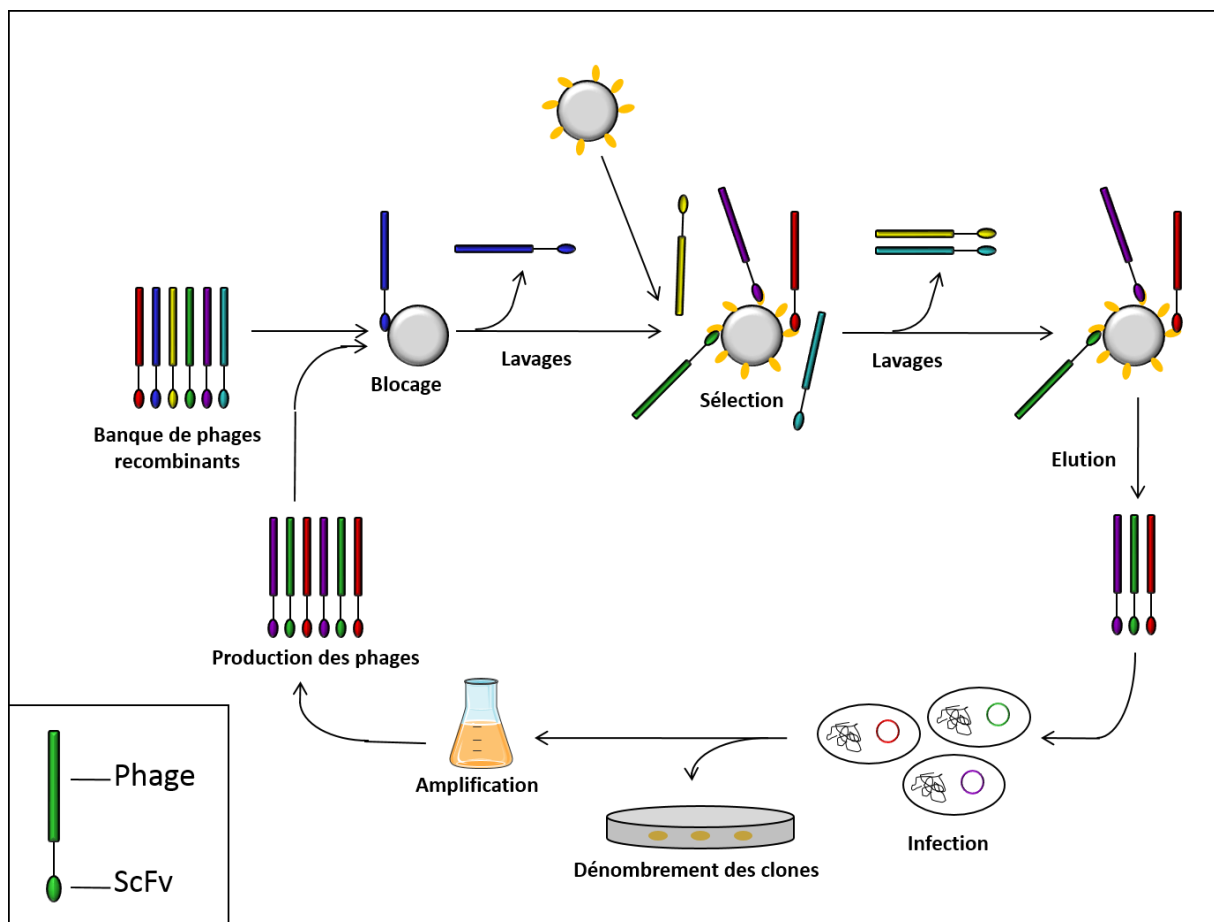


Figure 26 : Les cycles de sélection de scFv par la stratégie du « phage display ».

La banque de scFvs portée par les phages constitue une banque de phages recombinants qui est incubée avec des billes de Ni-NTA qui seront utilisées pour la sélection afin d'éliminer les phages recombinants qui peuvent s'y fixer. L'ensemble des phages recombinants restants est incubé avec des billes de Ni-NTA portant la protéine cible. Les phages-scFv non spécifiques sont lavés et ceux retenus par les protéines cibles sont élués et directement utilisés pour infecter des bactéries. Les clones sont dénombrés et amplifiés. Ils sont alors infectés par un phage auxiliaire afin de produire de nouvelles particules phagiques recombinantes et effectuer un nouveau cycle de sélection. C'est le système de sélection que j'ai mis au point lors de ce travail de thèse pour sélectionner des scFvs spécifiques de la protéine ATF7 et la protéine SUMO1.

L'antigène est généralement un peptide ou une protéine purifiée que l'on immobilise sur plaque ou sur billes. La banque de phages-scFvs est incubée en présence de l'antigène. Après plusieurs lavages, les phages fixés sont élués et amplifiés. Les phages produits sont alors purifiés et l'ensemble des étapes réalisées constituent un cycle de sélection (figure 26). Au terme d'un cycle de sélection la population de phages-scFv a été enrichie en phages portant des scFv d'intérêt. Au bout de trois cycles, on considère que le « pool » de phages conservé porte majoritairement les scFv d'intérêt. On peut donc par cette méthode sélectionner moins d'une dizaine de scFv présents dans des banques de plus de 10^8 variants (Marks 1992).

OBJECTIFS DE LA THESE

Les travaux de cette thèse sont articulés sur la thématique de travail de l'équipe. Celle-ci s'est intéressée depuis plusieurs années au décryptage du mécanisme d'activation de la transcription du facteur de transcription ATF7. Les précédents travaux ont montré l'implication de nombreuses modifications post-traductionnelles de ce facteur ainsi que du variant ATF7-4. Cependant, de nombreux résidus ont été décrits comme modifiés par phosphorylation lors d'études de phosphoprotéomique (Dephore 2004). Certaines de ces modifications correspondent à celles décrites pour le proche parent d'ATF7, ATF2 dont les fonctions de ces modifications ont été partiellement mises à nu.

Une partie de ce travail a été consacrée à l'élaboration d'outils permettant l'étude de certaines de ces modifications. Un premier projet visait à sélectionner des scFvs capables de discriminer entre plusieurs formes modifiées de la protéine ATF7. Pour cela j'ai sélectionné des scFvs par la méthode du phage display dirigés contre la forme non phosphorylée d'ATF7, d'autres spécifiques de la forme phosphorylée sur la T53 mais pas la T51. Le plus gros challenge de ce travail fût de sélectionner des scFvs capables de reconnaître la forme sumoylée de la protéine ATF7. Effectivement, il n'existe pas de bons anticorps capables de reconnaître une protéine sumoylée, car la majorité des anticorps dirigés contre la protéine SUMO présentent un fort bruit de fond et sont majoritairement de nature polyclonale. Pour parvenir à obtenir des outils reconnaissant la protéine ATF7 sumoylée, j'ai décidé d'élaborer un système qui permet de générer des scFv bispécifiques dirigés d'une part contre la protéine ATF7 et contre la protéine SUMO1 d'autre part.

L'autre partie de ce travail a été l'étude de la phosphorylation de la protéine ATF7 au niveau de la thréonine 112. Nous avons pu mettre en évidence une phosphorylation de la T112 au moment de la mitose dépendante d'une kinase impliquée dans le cycle cellulaire, la CDK1. Ce travail nous a conduit à des études du cycle cellulaire et de la croissance des cellules en présence de la protéine ATF7. Nous avons également démontré que cette phosphorylation implique une voie de signalisation différente de la voie utilisée pour la phosphorylation de la T112 lors de stress cellulaires. Nous avons poursuivi ces études à l'aide de lignées cellulaires stables élaborées au laboratoire afin de d'étudier des différences de

phénotype ; de croissance cellulaire, de migration cellulaire, ou de résistance au stress. En sachant que le variant d'épissage alternatif ATF7-4 inhibe l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7, j'ai établi des lignées dotées de plasmides auto-réplicatifs qui expriment ce variant ATF7-4 afin de mesurer son influence sur la croissance des cellules. Les modifications post-traductionnelles sont multiples et leurs caractérisations n'ont pas été entièrement élucidées. Elles modifient la fonctionnalité de nombreuses protéines. Ainsi, j'ai brièvement investigué la relation entre la phosphorylation des résidus sérine S108 et S111 et la T112. De plus, il a été montré que la protéine ATF7 ainsi que son homologue ATF2 sont phosphorylées au niveau de la T34 d'ATF7 (T52 d'ATF2). Chez la protéine ATF2, cette modification contrôle la localisation subcellulaire de la protéine, mais son rôle est inconnu pour la protéine ATF7.

RESULTATS

Partie 1 : Création d'outils d'étude des modifications post-traductionnelles d'ATF7

L'étude des modifications post-traductionnelles des protéines est délicate et nécessite des outils adaptés. La disponibilité d'anticorps spécifiques de la forme modifiée d'une protéine est un atout considérable pour l'étude de celle-ci mais présente des limites.

Premièrement, de tels anticorps ne sont pas toujours disponibles. Effectivement, l'obtention un réactif immun monoclonal spécifique d'une modification post-traductionnelle nécessite de posséder l'antigène à un important degré de pureté. Cela peut s'avérer facile lorsqu'il s'agit d'un court peptide synthétique phosphorylé. Ceci devient beaucoup plus compliqué lorsque la modification ciblée est d'origine protéique comme une sumoylation.

Deuxièmement, les anticorps présentent des limites difficiles à contourner qui sont inhérentes à leur structure et à leur organisation. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les anticorps sont de grandes protéines formées de quatre chaînes reliées par des ponts disulfures. Des ponts disulfures intra-chaînes sont aussi nécessaires au maintien de la structure tridimensionnelle de la molécule. Cette taille importante et la présence obligatoire de ces ponts disulfures sont des freins à l'expression de telles molécules à grande échelle et de manière peu coûteuse dans un système bactérien. De plus, les anticorps ne peuvent pas être exprimés à l'intérieur des cellules pour y adopter une conformation stable et active car les ponts disulfures ne peuvent pas être établis correctement dans les conditions réductrices du cytoplasme.

Je me suis donc tourné vers le développement de scFvs pour l'étude des modifications post-traductionnelles de la protéine ATF7 pour plusieurs raisons :

1. La banque de scFvs utilisée dans ce travail a été générée à partir d'un scFv particulier ne possédant aucun pont disulfure dans sa charpente. Ces scFvs ont donc la particularité de pouvoir être exprimés en milieu réducteur (tel le cytoplasme de cellules ou le milieu intracellulaire bactérien) et y adopter une conformation stable et active.
2. Il est peu probable d'arriver à développer des MAbs capables de reconnaître la protéine ATF7 sumoylée. Les scFvs permettent de développer des outils capables de reconnaître la protéine sumoylée grâce au design de scFv bispécifiques.

La première partie de ce travail a été de produire et de purifier les antigènes ATF7 et SUMO1 afin de sélectionner par phage display, les scFvs dirigés contre ces deux protéines, puis dans un second temps de produire la protéine ATF7 sumoylée pour tester les scFvs bispécifiques *in vitro*.

1. La sélection de scFvs contre les protéines ATF7 et SUMO.

A. Purification des protéines cibles

Pour effectuer plusieurs sélections par la méthode du phage display, les protéines recombinantes ATF7, [ATF7 (1-82) ou ATF7 (1-148)] en fusion avec une étiquette 6HIS N-terminal ont été exprimées chez E.Coli et purifiées sur Co-NTA. Les meilleures conditions de purification pour ces deux protéines sont présentées dans le tableau 2. La protéine SUMO-1 utilisée pour les sélections est d'origine commerciale et provient d'un kit de sumoylation (Vaxron sumoylation kit).

Tableau 2 : Conditions de purification des protéines utilisées pour les sélections par phage display

Protéine	Induction	Température	Sonication	Purification	Rendement (protéine pure)
His-ATF7-1 1-82	Auto-induction	25°C	15x (30s ON 30s OFF)	Batch Co-NTA 2h 4°C	40mg/L
His-ATF7-1 1-148	Auto-induction	22°C	30x (4s ON 1s OFF)	Batch Co-NTA 2h 4°C	7mg/L

B. La sélection de scFvs

Les protéines ATF7 purifiées ont été utilisées pour des sélections par la méthode du phage display en semi-solution, c'est-à-dire avec des protéines cibles fixées sur des billes de Ni-NTA agarose, ou en adsorbant les antigènes sur une microplaque. Une première série de sélections par phage display en semi-solution a été réalisée contre le domaine 1-82 de la protéine ATF7-1 (figure 27).

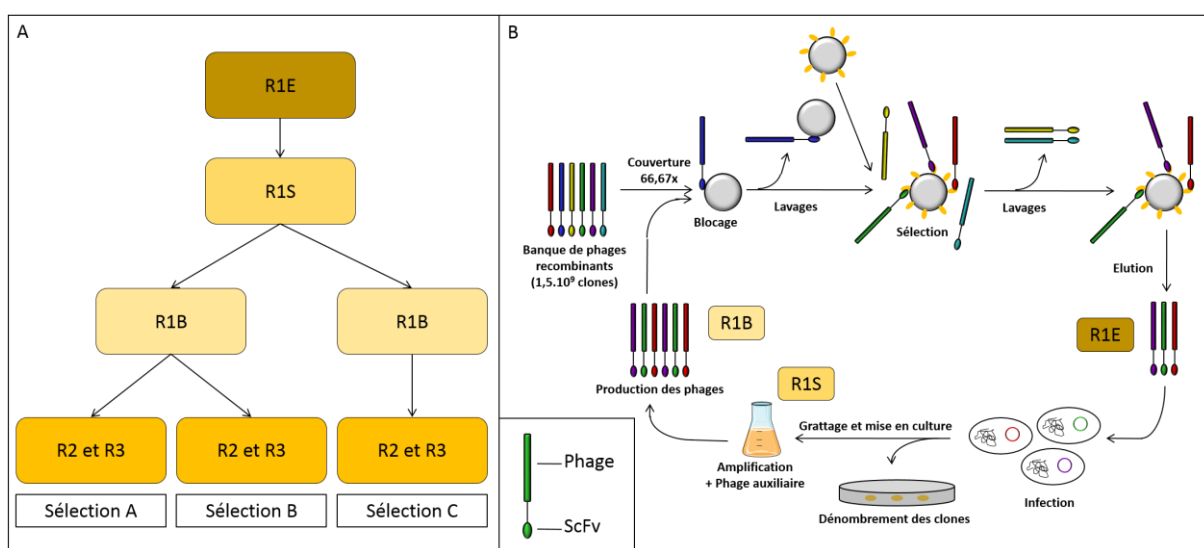


Figure 27 : Présentation de la stratégie de « phage display » utilisée

A. La première sélection a été effectuée contre le domaine 1-82 de la protéine ATF7-1. Afin de s'assurer de la reproductibilité de la technique, plusieurs sélections ont été réalisées en parallèle. Au niveau expérimental, un cycle de sélection peut être divisé en 3 étapes critiques qui sont les points auxquelles les manipulations peuvent être arrêtées (**B.**) :

1. Le premier point est le moment où les phages sont élués, j'ai nommé ce stade (R1E, pour phages élués au premier cycle de sélection).
2. Le second point est lorsque les bactéries infectées sont grattées pour être mises en culture (R1S).
3. Le dernier point constitue le moment où les phages produits ont été purifiés et sont prêts à être utilisés pour un nouveau cycle de sélection (R1B).

Ainsi, après l'étape R1S j'ai réalisé deux mises en culture parallèles et produit deux pools de phages (R1B) indépendants. L'une des deux sous banque de phages-scFvs issue du premier cycle de sélection a permis de réaliser 2 sélections indépendantes (**sélections A et B**), alors que le deuxième pool de phage R1B a servi à réaliser la troisième sélection (**sélection C**).

Le domaine 1-82 de la protéine ATF7-1 phosphorylé de manière aspécifique par la protéine kinase A, a également été utilisé comme antigène ainsi que le domaine 1-148 de la protéine ATF7-1 et la protéine SUMO1. Le nombre de phages élué après chaque cycle de sélection pour chacune des protéines cibles ainsi que les modes de présentation des

différentes sélections et la quantité de phages produite à la fin de chaque cycle sont présentés dans le tableau suivant (tableau 3). Nous pouvons noter que le nombre de phages élués à chaque cycle de sélection varie selon la cible mais aussi au cours de chaque cycle (figure 28).

-	Nom de la sélection (protéine cible)	ATF7 1-82 Sélection A	ATF7 1-82 Sélection B	ATF7 1-82 Sélection C	ATF7 1-82 Phosphorylé	ATF7 1-148	SUMO1	-
R1E	Nombre de phages élués à l'issu du cycle 1	3,00E+07			4,80E+05	1,20E+05	2,70E+03	Cycle 1
R1S	Densité optique (600nm) des bactéries grattées	2,72			2	3	0,001	
R1B	Phages produits par µL	1,81E+11		1,04E+11	3,05E+09	3,22E+09	3,51E+09	
R2E	Nombre de phages élués à l'issu du cycle 2	3,00E+05	2,35E+06	9,50E+04	2,97E+05	1,22E+06	1,31E+06	Cycle 2
R2S	Densité optique (600nm) des bactéries grattées	3,54	36	36	10,9	14	12	
R2B	Phages produits par µL	1,60E+11	3,46E+11	1,81E+11	6,00E+07	3,40E+08	4,00E+08	
R3E	Nombre de phages élués à l'issu du cycle 3	1,74E+05	4,22E+06	6,75E+06	1,05E+08	1,17E+08	1,04E+06	Cycle 3
R3S	Densité optique (600nm) des bactéries grattées	36	40,35	40,16	33	33	24	
R3B	Phages produits par µL	3,61E+11	2,70E+11	2,05E+11	5,53E+09	3,72E+09	3,04E+09	
-	Mode de présentation de l'antigène	Billes Ni-NTA agarose	Billes Ni-NTA agarose	Billes Ni-NTA agarose	Billes Ni-NTA agarose	Billes Ni-NTA agarose	Micro-plaque	-

Tableau 3 : Résultats de l'ensemble des sélections

Ce tableau présente les différentes sélections réalisées par la méthode du phage display, ainsi que le mode de présentation de l'antigène (antigène présenté sur microplaque ou fixé à des billes Ni-NTA agarose). Le domaine 1-82 de la protéine ATF7-1 a été phosphorylé par la protéine kinase A qui phosphoryle les résidus sérines et thréonines accessibles. Les nombres en rouge présentent le nombre de phage total élué après chaque cycle de sélection. En noir, la densité optique à 600nm des bactéries infectées par ces dits phages étalées sur boîte de LB agar supplémenté d'ampicilline (100µg/mL) et de glucose (1% w/v) après une nuit d'incubation à 37°C et reprises dans 1mL de LB. Des dilutions ont été réalisées pour mesurer la densité optique tout en restant dans la zone linéaire. Cette donnée est capitale car la culture réalisée ensuite doit être à faible densité optique pour permettre l'infection par les phages auxiliaires. En vert, la concentration en phages par microlitre des nouvelles particules phagiques produites qui serviront à réaliser le cycle de sélection suivant.

Nombre de phages élués après chaque cycle de sélection

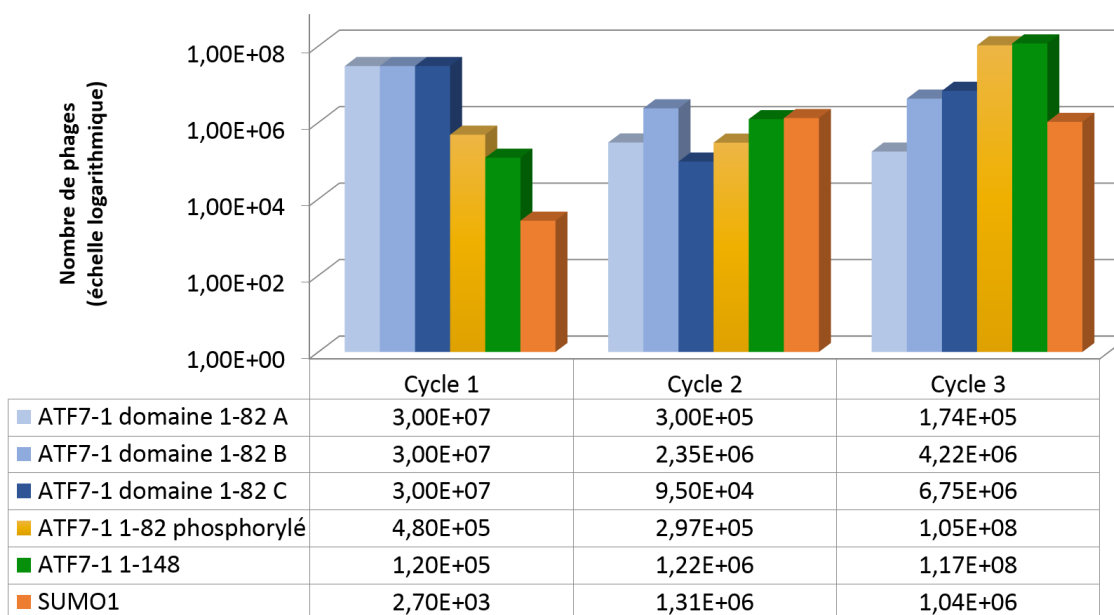


Figure 28 : Profil du nombre de phage élués à chaque cycle de sélection pour chacune des sélections

La quantité de phages élués après chaque cycle de sélection est très importante car elle donne un aperçu de la diversité théorique maximale du nombre de clones sélectionnés lors du cycle de sélection correspondant. Les cycles de sélection ont été réalisés à stringence croissante, lors du premier cycle, 10 μ g de protéines sont utilisées comme antigène alors que seulement 1 μ g pour les cycles 2 et 3. Le premier cycle est réalisé à faible stringence car nous souhaitons lors de cette étape récupérer un maximum de phages qui portent des scFvs qui possèdent l'activité souhaité, même si ce ne sont pas les meilleurs. La conséquence logique de ce mode de sélection serait d'observer une diminution du nombre de phages élués au cycle 2 en réponse à la diminution de protéine cible puis une augmentation de ce nombre lors du troisième cycle. Ce n'est pas exactement ce que nous observons dans la pratique pour l'ensemble de ces sélections. Les sélections effectuées contre le domaine 1-82 de la protéine ATF7-1 phosphorylée (jaune) ou non (3 variations de bleu) présentent ce profil attendu. Cependant les sélections contre les protéines SUMO et le domaine 1-148 de la protéine ATF7-1 présentent un nombre de phages élués croissant.

La capacité de liaison des scFvs-phages sélectionnés peut être évaluée par la technique du phage-ELISA (figure 29).

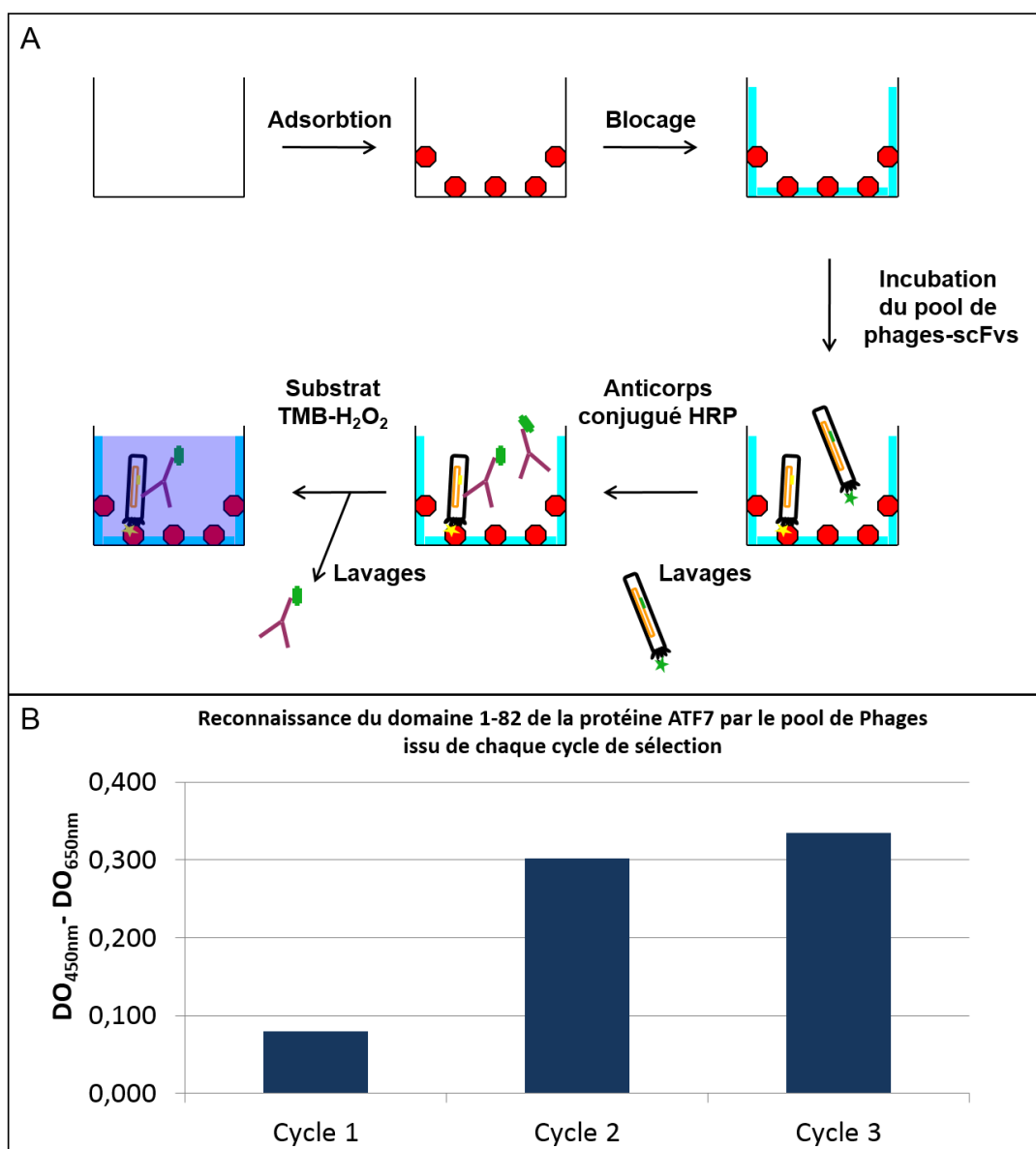


Figure 29 : Analyse de la qualité globale du pool de phages-scFvs

L'activité de reconnaissance des scFvs portés par les phages issus de chaque cycle de sélection peut être mesurée par la technique du phage-ELISA. A. Cette technique est similaire à l'ELISA classique, sauf que l'anticorps primaire classiquement utilisé pour reconnaître la cible est remplacée par le pool de phages-scFv et l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de radis est dirigé contre la protéine pVIII du phage M13. B. Ainsi nous pouvons observer le gain d'activité après les différents cycles pour le pool de phages-scFv d'une sélection contre le domaine 1-82 de la protéine ATF7-1. On remarque pour cette sélection que le gain d'activité n'est pas flagrant entre les cycles 2 et 3 de sélection contrairement à ce que l'on pourrait espérer, de ce fait, les scFvs issus des cycles 2 et 3 de sélection ont été analysés.

C. Le criblage des clones sélectionnés

Le criblage des scFvs obtenus à l'issue des cycles 2 et 3 est réalisé par ELISA monoclonal après sous clonage de la globalité des fragments d'anticorps dans un vecteur d'expression bactérien. Celui-ci permet d'exprimer les scFvs en fusion avec une étiquette myc pour la détection. Les scFvs sont exprimés en plaque de 96 puits, puis testés directement par ELISA (figure 30 et figure 31).

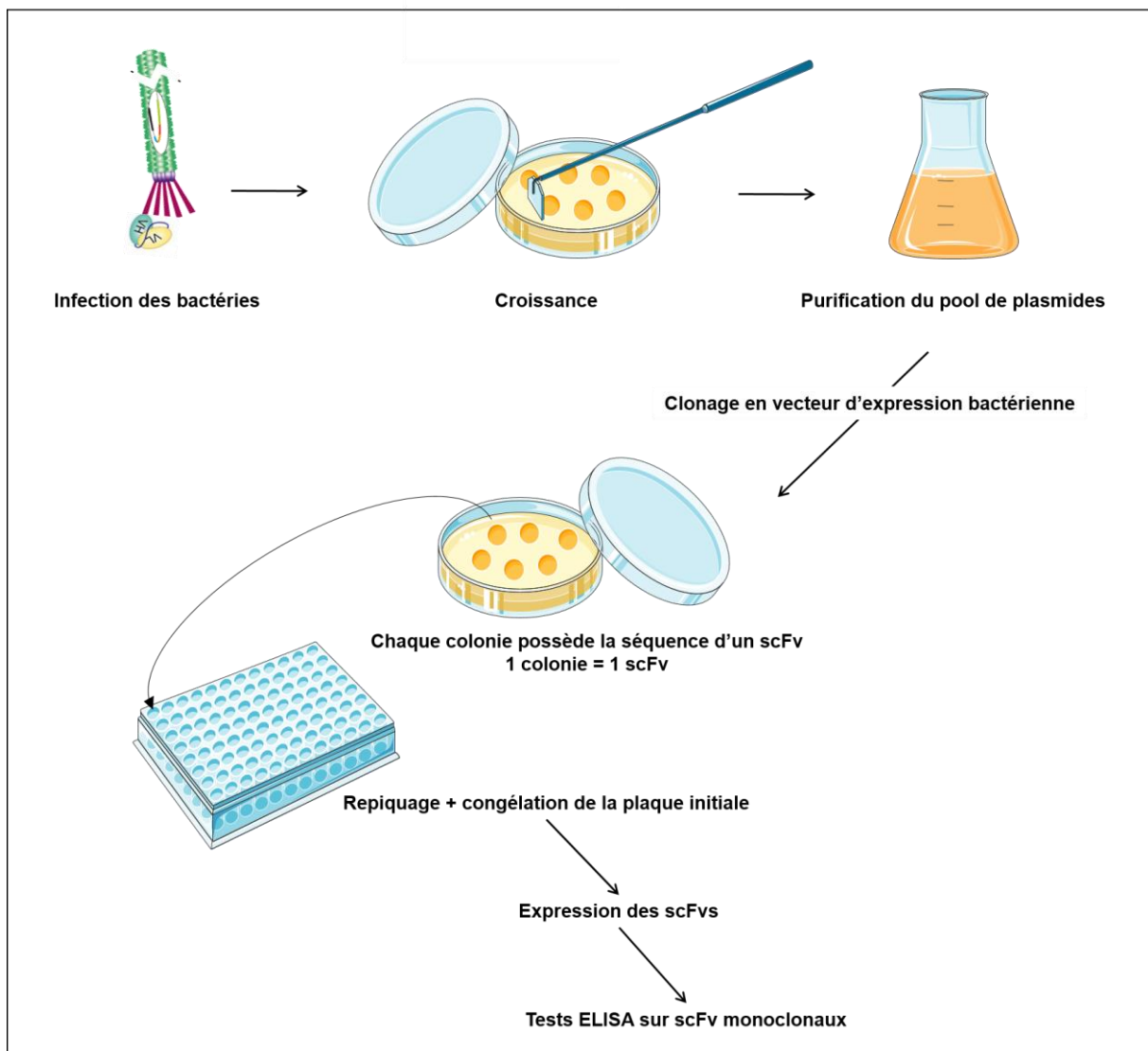


Figure 30 Analyse individuelle des scFvs issus des sélections

Les scFvs sélectionnés sont clonés dans un vecteur d'expression bactérien et chaque clone exprimé dans des plaques 96 puits. Après lyse des bactéries, les surnageants contenant les scFvs sont directement utilisés pour réaliser des ELISA contre les cibles respectives. 2000 scFv sélectionnés ont été testés par ELISA.

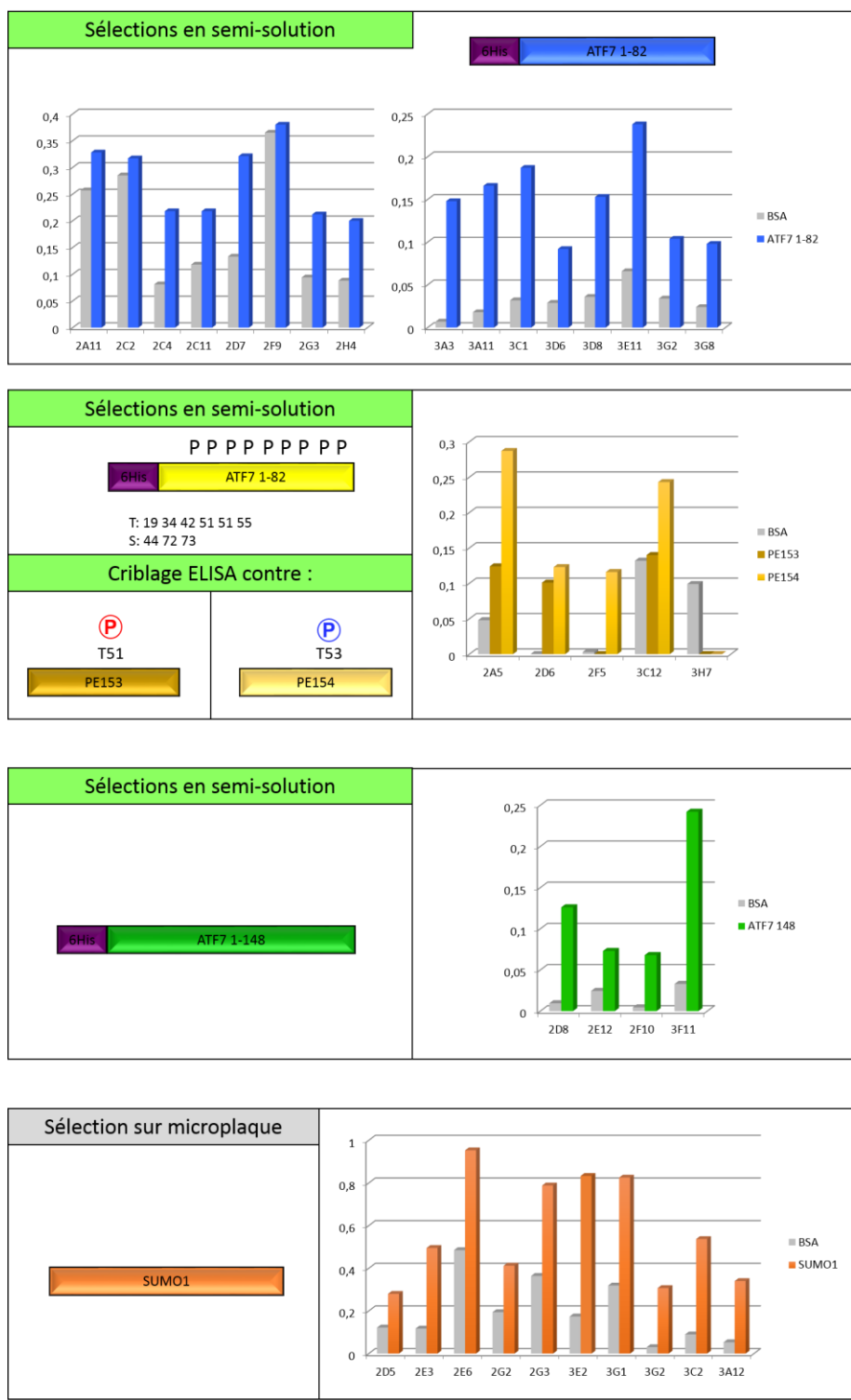


Figure 31 : Analyse individuelle des scFvs issus des sélections – résultats

Chaque scFv est testé par ELISA pour sa capacité à reconnaître la cible souhaitée mais aussi la BSA utilisée comme agent saturant lors des sélections. Sont présentés ici un exemple de scFvs testés issus du deuxième cycle de sélection et du troisième cycle de sélection. Les sélections par ELISA ont été réalisées contre les protéines utilisées comme cible pour le phage display, excepté pour ceux sélectionnés contre la protéine ATF7 1-82 phosphorylée par la PKA. Dans ce dernier cas les cribles ont été réalisés par un peptide d'ATF7 phosphorylé au niveau de la T51 et un autre au niveau de la T53.

Ces sélections ont permis d'obtenir 9 scFvs dirigés contre la protéine SUMO1, 9 contre le domaine 1-82 d'ATF7 et 3 dirigées contre le domaine 1-148 de la protéine ATF7. 5 scFvs ont été sélectionnés à l'aide de la protéine ATF7 phosphorylée par la PKA (tableau 4). Certains scFvs présentent des particularités :

1. Le scFv 2E3 possède une mutation dans une région hors des CDR au niveau de la chaîne VH ou une sérine est mutée en glycine.
2. Le scFv 3G1 possède une mutation d'une sérine en phénylalanine dans la région située entre les CDR2L et CDR3L.
3. Le scFv 3H7 reconnaît la BSA.
4. Le scFv 3F11 possède une mutation dans le CDR1L d'une asparagine en acide aspartique.
5. Le scFv 2F5 est spécifique de la forme d'ATF7 phosphorylée sur la T53.
6. Les scFvs 2H4, 3E2 et 3D6 possèdent la même séquence au niveau du CDR3H que le scFv depuis lequel la banque dérive (scFv 13R4). Ceci est d'autant plus intéressant qu'un des scFv est spécifique de la protéine SUMO1 alors que les deux autres sont spécifiques de la protéine ATF7-1 et le scFv 13R4 spécifique de la β galactosidase. Ceci indique clairement que la modification d'une seule CDR peut changer radicalement la spécificité d'un scFv.

Tableau 4 : Présentations de certains scFvs issus de la banque utilisée.

Ce tableau résume les principaux scFvs obtenus à l'issue de ces sélections. Sont présentées les séquences peptidiques des CDR3H et L de ces scFvs car c'est uniquement ces séquences qui ont été mutées dans la banque. Les doublons de scFv ont été éliminés, mais il y en avait dans toutes les sélections.

scFv	Cible	CDR3H	CDR3L	scFv	Cible	CDR3H	CDR3L
2C4	ATF7 1-82	EDLDF	HQYNSTTFT	2D5	SUMO1	GVGLDVFE	QHYDSSPQT
3A11	ATF7 1-82	VGRGCRSGCFDY	HACHTITMV	2E3	SUMO1	GVKGIWRFD	QQYGN SPLT
3D6	ATF7 1-82	SSITIFGGGMDV	QEYRISLS	2E6	SUMO1	GKNRIRRNFDY	QQSDTSPQT
2H4	ATF7 1-82	SSITIFGGGMDV	RQYNSTIPCP	2G2	SUMO1	RGGRWRGDY	QHSTTYPST
2D7	ATF7 1-82	GETVADLGV	ETGASNTLI	2G3	SUMO1	VRRPSESSRNFDL	RQYDNNRYT
2C2	ATF7 1-82	AREPWIRVDFDY	QACDSTIKR	3E2	SUMO1	SSITIFGGGMDV	RQYYSSPHT
2F9	ATF7 1-82	GRSGSQDY	QQYDGYTNT	3G1	SUMO1	SSITIFGGRFVY	QQSYNTHPK
2A11	ATF7 1-82	GRQGWTFAD	HSSNSNSTILV	3G2	SUMO1	SSITIFGGGHY	QQLYTTPFT
2G3	ATF7 1-82	CVIGIFV	NYSTYH	3A12	SUMO1	GYSGY	QSSDNISKYFL
2A5	ATF7 1-82 P	AWSERRGLDN	QRYGYSPLYT	D12	BSA	VRGVGSFDY	QTTDSNHFI
2D6	ATF7 1-82 P	GGGGDGFEY	QLYTTKPLN	F5	Gankyrine	GGWVLDH	RSYASGTRVV
2F5	ATF7 1-82 P	EYADGAGFHD	QQTDSSEPEG	13R4	β -galactosidase	SSITIFGGGMDV	SSYTTRSTRV
3C12	ATF7 1-82 P	VSGTRFEN	RTTSGTTV				
3H7	ATF7 1-82 P	AVTNVGETNPFY	QAYQTSLN RSE				
2D8	ATF7 1-148	GVGYMEN	QQYDTHPRT				
2E12	ATF7 1-148	GYAGRDNDFD	QSSHGINTL				
3F11	ATF7 1-148	GHSGGSWKSLDN	QNQDSTSHRWL				

2. La construction des séquences qui permettent d'augmenter la valence des scFvs

Afin d'obtenir des réactifs bispécifiques, capables de reconnaître à la fois la protéine ATF7 et la protéine SUMO1, les scFvs ont été fusionnés à des domaines protéiques capables de s'hétérodimériser.

A. Les hélices chargées

Ma première idée fût de cloner mes scFvs sélectionnées en fusion avec des séquences qui permettent l'expression d'hélices fortement chargées. En me basant sur les résultats de Tripet et ses collaborateurs (Tripet et al 1996), j'ai construit des séquences nucléiques par combinaison d'oligonucléotides multiples (à raison de 9 oligonucléotides par hélice). Les séquences codent pour deux types d'hélices, une hélice nommée « hélice K » ou « hélice + » qui possède une majorité de résidus lysines et une « hélice E » ou « hélice - » qui possède de nombreux résidus acides glutamiques. L'hélice K consiste en cinq répétitions de la séquence KVSALKE alors que l'hélice E est constituée de cinq répétitions de la séquence EVSALEK pour une totalité de 35 acides aminés chacune. Ces polypeptides s'organisent en hélices qui interagissent entre-elles par des interactions hydrophobes entre les valines et leucines, et par interaction ionique entre des acides aminés chargés (lysines de l'hélice + et acides glutamiques de l'hélice -), ce qui permet d'éviter la formation d'homodimères suite à la répulsion de charges entre deux hélices du même type (figure 32).

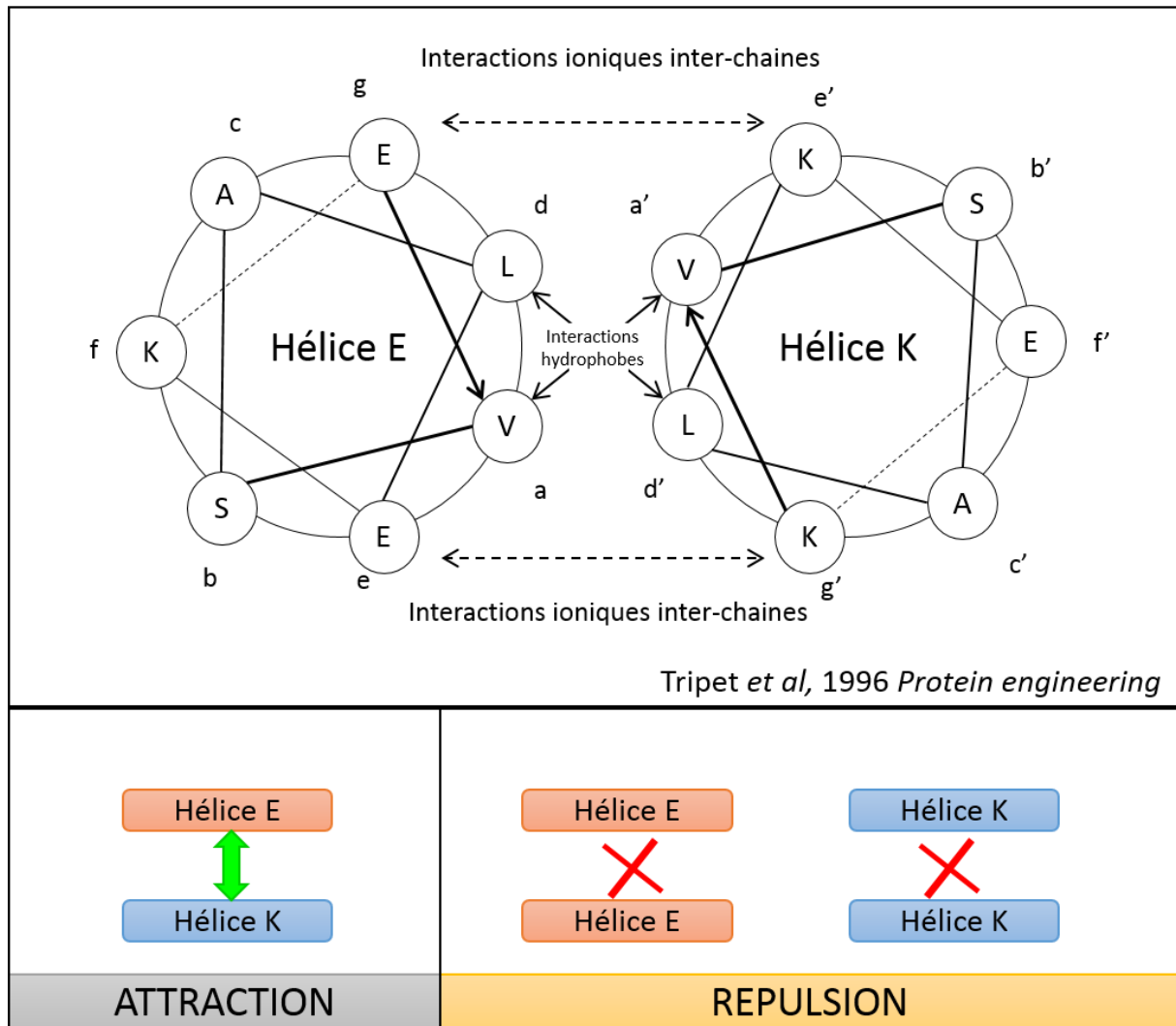


Figure 32 : Les hélices chargées utilisées pour dimériser des scFvs.

L'hélice E de séquence (EVSALEK)₅ interagit avec l'hélice K de séquence (KVSALKE)₅ au moyen d'interactions hydrophobes entre les résidus leucines et valines aux positions d et a (d' et a' pour l'hélice K) ainsi que par des interactions ioniques entre les acides glutamiques (E) et les résidus lysines (K). Ces charges permettent également la répulsion d'hélices du même type ; ainsi une hélice E sera repoussée par une autre hélice E alors qu'elle sera attirée par une hélice K et inversement.

L'ensemble des scFvs sélectionnés ont été fusionnés avec chacune de ces hélices en respectant les règles suivantes : les scFvs fusionnés aux hélices K le sont dans un plasmide de type pET et possèdent une étiquette 6HIS pour la purification. Les scFvs fusionnés aux hélices E sont insérés dans un plasmide de type pCDF doté d'une origine de réplcation et un marqueur de sélection différents et ne possèdent pas d'étiquette 6HIS (Sanchez *et al.*, 1988)(figure 33).

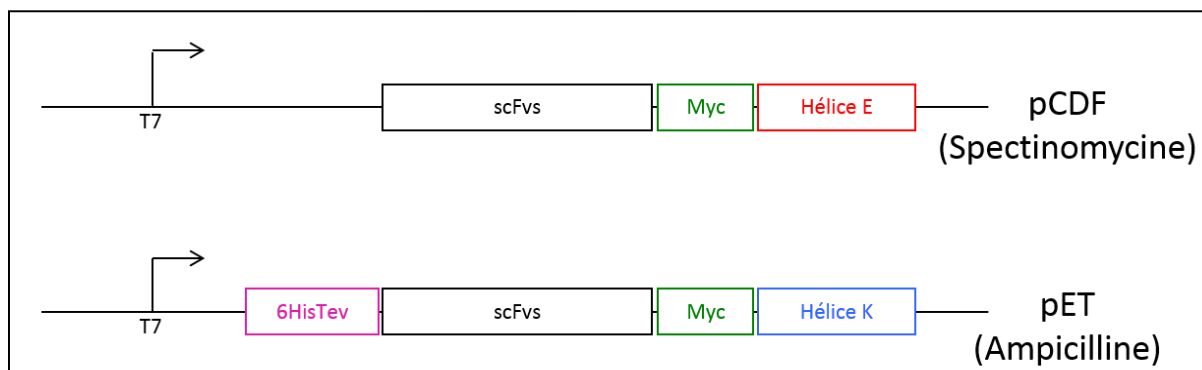


Figure 33 : Les constructions qui permettent l'expression des scFvs en fusion avec les hélices.

L'hélice E est insérée dans un plasmide de type pCDF qui possède une origine de réplication qui est différente du plasmide pET (qui possède une origine de réplication ColE1). Le plasmide qui code pour l'hélice K de type pET possède aussi une double étiquette 6HIS – TEV qui permet sa purification, puis le clivage de l'étiquette à l'aide de la protéase TEV (issue du virus de la gravure du tabac). Les deux plasmides possèdent une origine de réplication différente ce qui leur permet d'être tous deux maintenus par la bactérie, et le fait qu'ils possèdent un gène de résistance à des antibiotiques différents permet de maintenir une pression de sélection qui force les bactéries à conserver les deux. Notons que le plasmide pCDF qui code pour les fusions scFv-hélice E ne possède volontairement pas d'étiquette 6HIS afin que la purification de la protéine de fusion synthétisée ne soit possible que si elle interagit avec l'hélice K, ce qui nous assure un bon repliement de l'hélice et valide l'interaction des deux molécules.

Ces constructions expriment les fusions scFvs-hélices séparément ou communément dans les bactéries. Les souches qui expriment deux constructions expriment un scFv dirigé contre SUMO1 et un dirigé contre la protéine ATF7.

Afin de tester les paramètres physico-chimiques de ces nouvelles constructions et de les comparer aux scFvs seuls, ces protéines de fusions « scFvs-hélices » ont été exprimées dans quatre souches bactériennes différentes : les souches *E. Coli* BL21, BL21 codons + (qui codent pour des ARNt spécifiques de codons rares chez *E.Coli*), Rosetta2 ainsi que la souche « Arctic » (tableau 8).

Nom de la souche	Résistance	Génotype
Arctic	Tétracycline Gentamycine Chloramphénicol	F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [cpn10cpn60 Gentr], pLysS, Cm ^R
Rosetta 2	Chloramphénicol	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) gal dcm pRARE2 (CamR)
BL21	-	F ⁻ ompT hsdSB(rB mB) gal dcm
BL21 (codons+)	Chloramphénicol	F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cm ^R]

Tableau 5 : Les souches bactériennes utilisées pour l'expression des fusions scFvs-hélices

L'expression de ces scFvs-hélices a tout d'abord été évaluée dans la souche BL21 dans différents milieux à différentes températures. Nous avons constaté que la moitié des protéines de fusions produites est insoluble (figure 34A). L'expression des hélices a été testée suite à une induction à l'IPTG dans du milieu LB ou du milieu « Terrific Broth » et en auto-induction. L'expression n'est pas radicalement différente selon la méthode utilisée (figure 34B) que ce soit à 18, 25 ou 37°C. Les souches BL21 codons + et Rosetta2 ont alors été utilisées dans les mêmes conditions mais sans aucune amélioration. Le constat est le même pour toutes les conditions, les fusions scFvs-hélices sont très insolubles dans les bactéries et sont si faiblement produites qu'on ne peut les visualiser que par « western blot ».

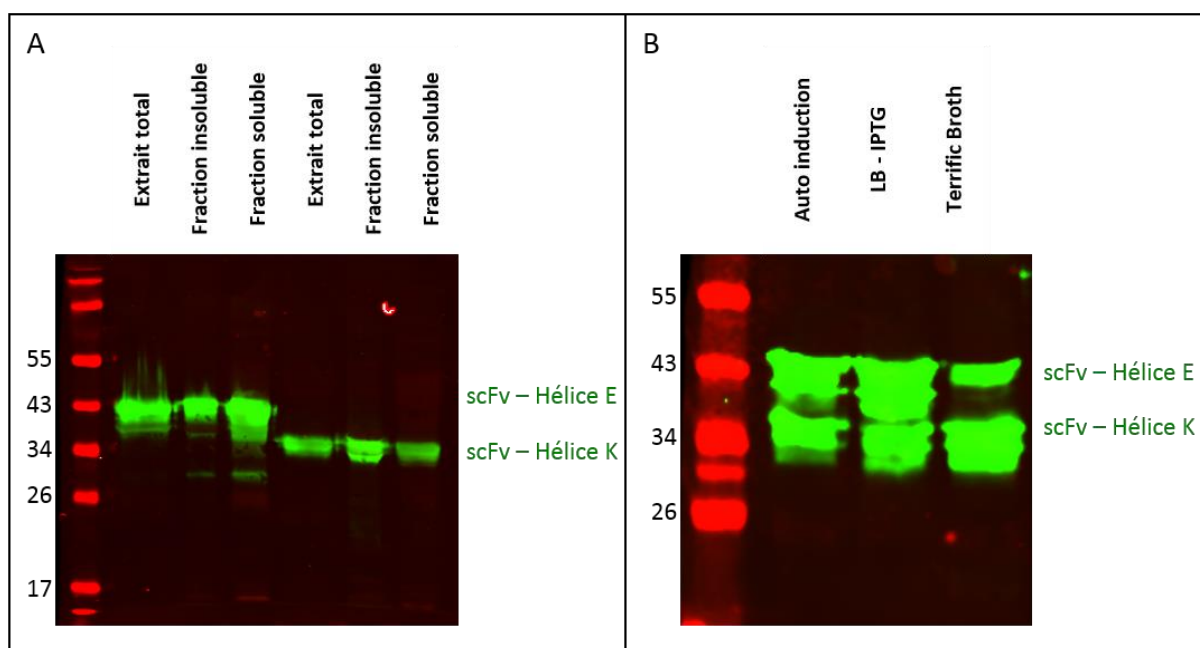


Figure 34 : Analyses par « western blot » de l'expression des fusions scFvs-hélices.

A. L'expression des protéines de fusion scFvs-hélices est réalisée à 25°C par auto induction pendant 36h. Les bactéries sont ensuite lysées par sonication et ultracentrifugées à 36krpm pendant 30 minutes. La fraction soluble (surnageant) est récupérée et le culot qui constitue la fraction insoluble remis en suspension. **B.** Analyse par western blot de l'expression des fusions scFvs-hélice exprimées simultanément par différentes méthodes.

La souche Arctic n'a pas donné de meilleurs résultats car la majorité des protéines produites est insoluble. Ces problèmes d'expression limitent grandement la faisabilité des tests *in vitro*.

Dans un premier temps, je n'ai purifié que les fusions scFv-hélice pour un seul couple de scFvs, le scFv 3A11 dirigé contre le domaine 1-82 de la protéine ATF7 fusionné à l'hélice K et le scFv 2G2 dirigé contre la protéine SUMO1 fusionné à l'hélice E (figure 35). La fusion scFv 2G2 – hélice n'est pas retenue sur les billes de Ni-NTA car elle ne possède pas d'étiquette 6HIS. La fusion scFv 3A11 – hélice K est retenue sur les billes et est éluée lorsqu'on ajoute une concentration de 60mM d'Imidazole. Cependant une nouvelle source de perte de protéines est observable : une grande partie des fusions ne s'attache pas à la colonne malgré la présence d'une étiquette 6HIS.

Lorsqu'on exprime les deux constructions dans la même souche et qu'on les purifie de la même manière, on remarque que la même quantité de fusion sans étiquette 6HIS que celle avec étiquette indiquant que les deux constructions semblent s'associer correctement (figure 35).

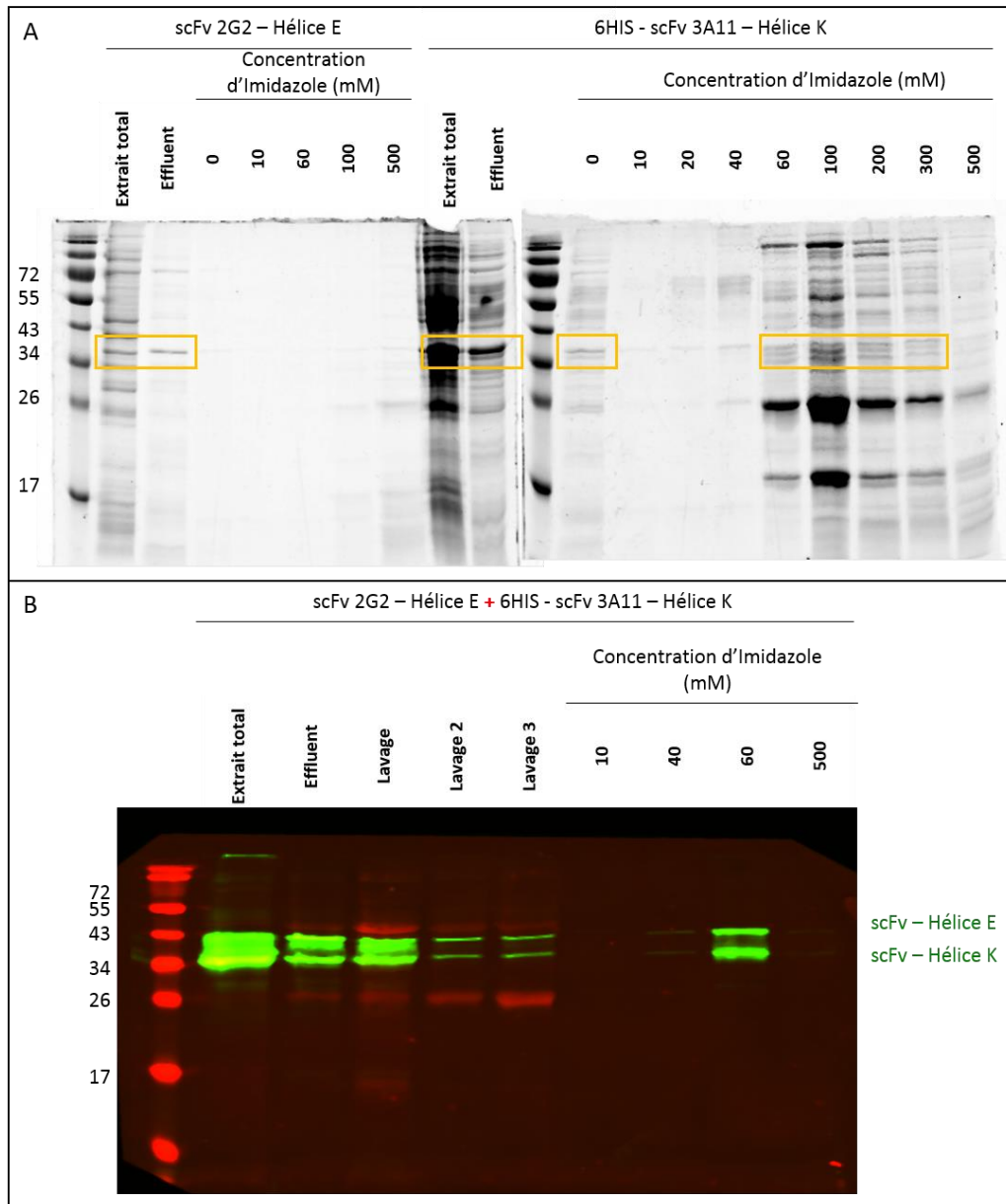


Figure 35 : Purification des scFvs-hélices sur colonne de Ni-NTA agarose.

- A. Purification des fusions scFvs-hélices individuelles. Les protéines solubles ne sont pas retenues sur la colonne car la construction scFv2G2-héliceE ne possède pas d'étiquette 6HIS. La moitié des protéines de fusion 6HIS-scFv3A11-héliceK est retenue sur les billes alors que l'autre moitié se retrouve dans l'effluent. Une partie des protéines est perdue lors des lavages (0mM d'Imidazole) et une fraction est éluée à partir de 60mM d'Imidazole. Les cadres orange pointent les constructions scFvs-hélices.
- B. Purification concomitantes des fusions scFvs-hélices. Les protéines de fusion scFvs-hélices sont produites conjointement dans les bactéries et purifiées par chromatographie d'affinité sur billes Ni-NTA. L'analyse des fractions par « western blot » montre que, les deux constructions sont retrouvées à quantités égales dans l'ensemble des fractions, et la fusion scFv-hélice E est maintenant capable de se fixer à la colonne ou elle est éluée en même temps que la construction scFv-hélice K. Ceci valide bien l'interaction entre les deux constructions et le bon repliement d'au moins une partie des protéines.

J'ai ensuite décidé de tester par ELISA la capacité de ces dimères purifiés à reconnaître les antigènes contre lesquels les scFvs ont été sélectionnés. J'ai également purifié un scFv témoin (scFv 3A11) non fusionné à une hélice (figure 36A). Nous remarquons que les scFv fusionnés aux hélices ne reconnaissent pas leurs antigènes très probablement à cause de la très faible quantité de protéines purifiées.

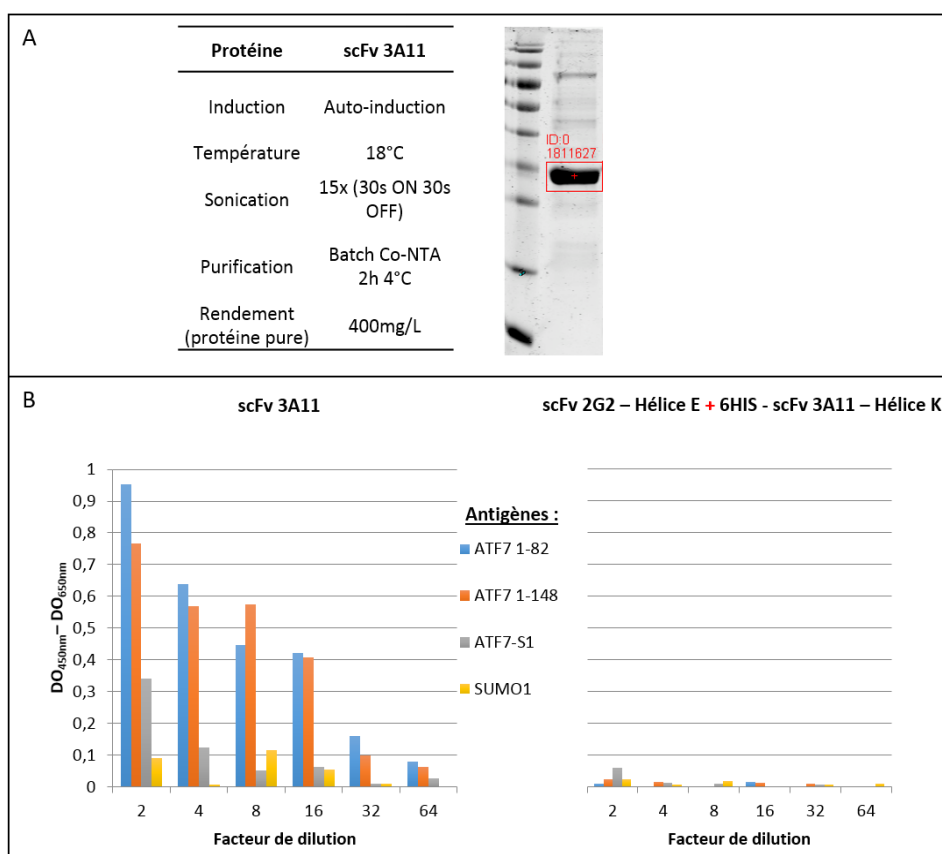


Figure 36 : Analyse fonctionnelle de la capacité de reconnaissance des fusions scFv-hélices par ELISA.

- A. Purification du scFvs-3A11 non fusionné à une hélice. La première étape fût de purifier le scFv 3A11 afin d'avoir un témoin quant à l'activité de reconnaissance de ce scFv. La table donne les conditions utilisées pour la purification du scFv 3A11 non fusionné à une hélice et le gel montre la protéine enrichie après purification sur résine de Co-NTA.
- B. Analyse de la reconnaissance des antigènes par le scFv 3A11 et les scFvs-hélices purifié à l'étape précédente. On remarque que le scFv 3A11 qui sert de contrôle (et qui est celui fusionné à l'hélice K) reconnaît fortement le domaine 1-82 et le domaine 1-148 de la protéine ATF7 et aussi plus faiblement la protéine ATF7 sumoylée nommée ATF7-S1 (voir section sumoylation d'ATF7). Les scFvs fusionnés aux hélices par contre ont perdu toute capacité de reconnaissance quel que soit l'antigène. Cependant on peut observer un très faible signal à faible dilution contre la protéine ATF7 sumoylée indiquant que la perte de reconnaissance est probablement due à la faible quantité de protéines purifiées.

B. Le domaine de tétramérisation de la protéine p53

La protéine p53 forme naturellement un tétramère dans la cellule. Le domaine responsable de l'interaction des monomères peut être muté pour favoriser la formation d'hétéro-tétramères composés de deux homodimères (Brokx *et al.*, 2003). L'organisation tridimensionnelle de ce domaine (figure 37, panels A et B) révèle des acides aminés importants pour l'interaction des deux dimères, la lysine (K₃₅₁) et les acides glutamiques (E₃₄₃ et E₃₄₆). La création de domaines de tétramérisation de p53 mutés au niveau de ces acides aminés permet ainsi de moduler leur stade oligomérique. Ainsi, le mutant K₃₅₁E (appelé KE par la suite) ne forme plus que des dimères, (figure 37C) alors que le mutant E₃₄₃K / E₃₄₆K (appelé EK par la suite) forme des tétramères de faible affinité. La mise en solution de quantités équimolaires de ces deux mutants conduit à l'assemblage en tétramères de haute affinité (Brokx, 2002).

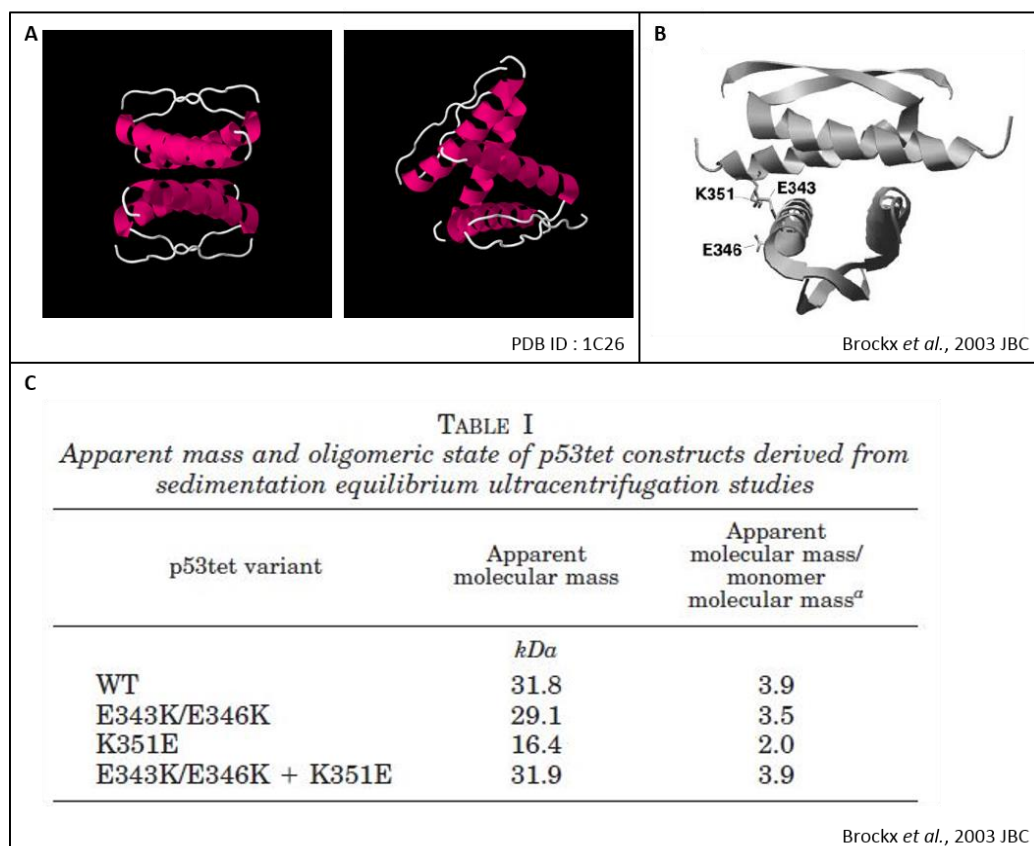


Figure 37 : Le domaine de tétramérisation de la protéine p53 et les mutants

A. Vue tridimensionnelle de quatre molécules du domaine de tétramérisation de p53. **B.** Vue tridimensionnelle de quatre molécules du domaine de tétramérisation de p53 avec mise en évidence des 3 acides aminés qui sont mutés pour générer des hétérotétramères. **C.** Présentation du stade oligomérique du domaine de tétramérisation de la protéine p53 en solution et des mutants indiqués.

Les séquences nucléotidiques de ces domaines de p53 mutants ont été reconstituées pour les fusionner à celles de scFvs et ainsi générer des scFvs bispécifiques tétramériques. Pour cela un scFv anti ATF7 (scFv 2D8) a été fusionné au domaine de p53 KE et un scFv anti SUMO1 (scFv 3G2) fusionné au domaine de p53 EK. L'expression de ces constructions a été analysée par SDS-PAGE (figure 38). Ces constructions sont plus fortement exprimées que les fusions scFv-hélices chargées et ont une meilleure solubilité.

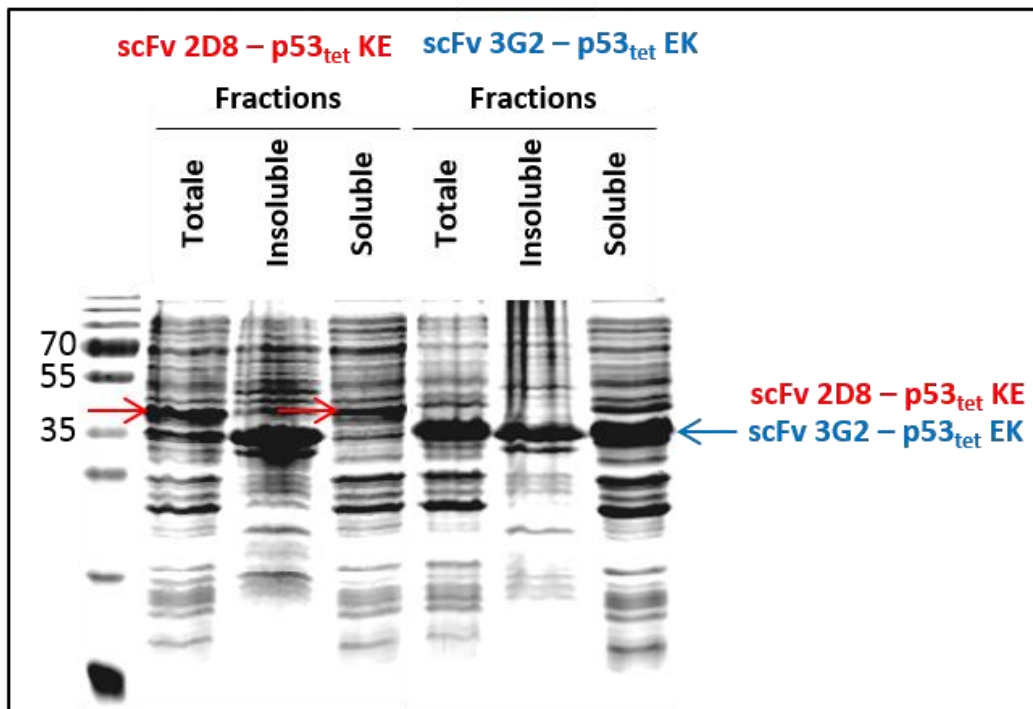


Figure 38 : Expression des scFvs fusionnées aux domaines de tétramérisation de p53 mutés

Analyse par SDS-PAGE (coloré au bleu de Coomassie) de l'expression et de la solubilité des protéines de fusion scFv – domaine de tétramérisation de la protéine p53 ($p53_{tet}$) muté (autoinduction à 18°C pendant 48h). Le scFv 2D8 (anti ATF7) est fusionné au domaine $p53_{tet}$ dont la lysine 351 est mutée en acide glutamique ($K_{351}E$ ou KE en rouge). Le scFv 3G2 (anti SUMO1) est fusionné au domaine $p53_{tet}$ dont les acides glutamiques en positions 343 et 346 sont mutés en résidus lysine ($E_{343}K, E_{346}K$ ou EK en bleu)

La purification de ces constructions en présence d'imidazole dans le tampon de charge (figure 39) montre que les scFvs 2D8 - $p53_{tet}$ KE sont correctement retenus sur la colonne et bien élués, au contraire des scFvs 3G2 - $p53_{tet}$ EK.

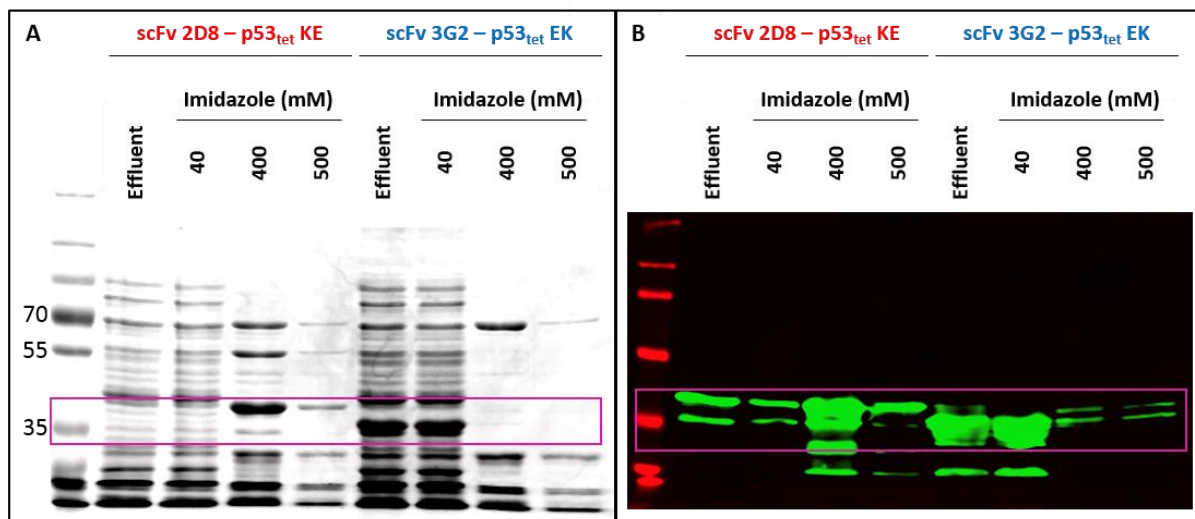


Figure 39 : Purification des scFvs fusionnés aux domaines p53_{tet} mutés.

A. Analyse par SDS-PAGE (coloré au bleu de Coomassie) de la rétention des protéines de fusion scFv-p53_{tet} sur billes de Ni-NTA en présence de 40mM d'Imidazole. **B.** Analyse par « Western Blot » des mêmes fractions à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette Myc.

J'ai alors décidé de purifier ces constructions sur colonnes de Ni-NTA en absence d'imidazole dans le tampon de charge et lors des lavages (figure 40).

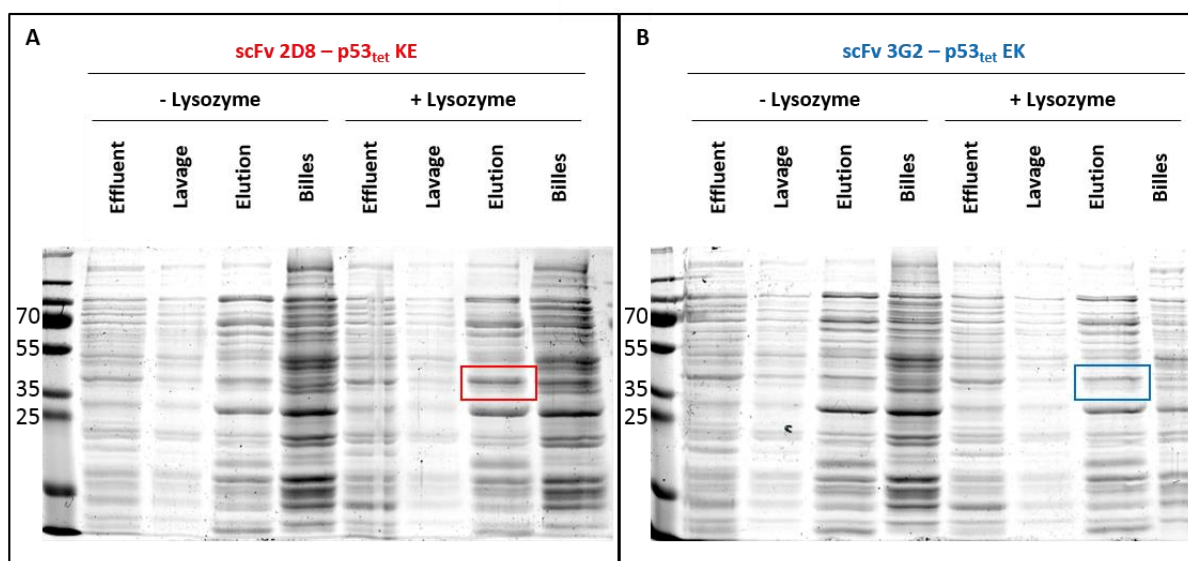


Figure 40 : Purification des scFvs fusionnés aux p53_{tet} mutés en absence d'Imidazole dans le tampon de fixation.

Analyse par SDS-PAGE (coloré au bleu de Coomassie) de la purification des protéines de fusion scFv-p53_{tet}. **A.** la fusion scFv 2D8 – p53_{tet} KE et **B.** correspond à la fusion scFv 3G2 – p53_{tet} EK.

Les protéines éluées, bien que fortement contaminées sont utilisées pour réaliser des tests de reconnaissance par ELISA (figure 41).

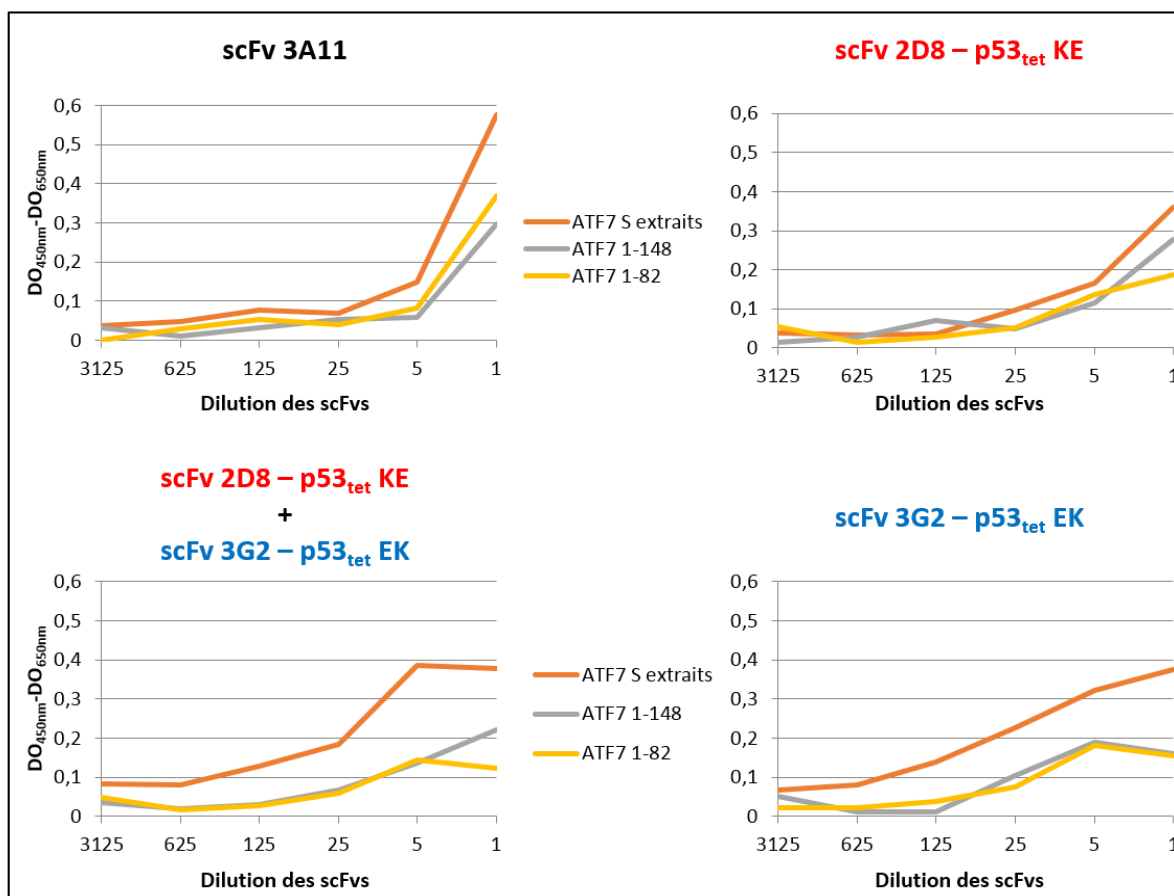


Figure 41 : Reconnaissance des protéines ATF7 et ATF7-SUMO par les scFvs fusionnés aux domaines p53tet.

Mesure par test ELISA de la capacité du scFv 3A11 ou des constructions citées à reconnaître les protéines ATF7 (1-82) purifiée, ATF7 (1-148) ou la protéine ATF7 sumoylée (ATF7 S extraits). Les antigènes sont utilisés en quantité égale tandis que le scFv 3A11 est utilisé à une concentration 6x supérieure aux constructions scFv-p53_{tet}.

Les nouvelles constructions possèdent une activité de reconnaissance (contrairement aux constructions avec hélices chargées). Le scFv anti SUMO (scFv 3G2) fusionné au domaine p53_{tet}EK reconnaît bien plus fortement la protéine ATF7 sumoylée (la production de la protéine ATF7 sumoylée est décrite dans le paragraphe suivant) que la protéine ATF7 seule. Le scFv anti ATF7 (scFv 2D8) fusionné au domaine p53_{tet}KE reconnaît la protéine ATF7 et la protéine ATF7 sumoylée. Le scFv 3A11 non fusionné à un domaine est utilisé comme référence et reconnaît la protéine ATF7 et la protéine ATF7 sumoylée. L'utilisation simultanée des scFv anti SUMO et anti ATF7 fusionnés aux domaines p53_{tet} respectifs permet une reconnaissance de la protéine ATF7 et une reconnaissance bien plus forte de la protéine ATF7 sumoylée. Lorsque nous rapportons à la quantité de scFv utilisés, l'utilisation conjointe des deux constructions permet une reconnaissance de la protéine ATF7 sumoylée 80x plus importante que le scFv 3A11 seul.

Cette expérience valide ainsi la construction de scFv bispécifiques tétramériques capables de reconnaître une protéine et sa modification post-traductionnelle. Cependant, ces résultats doivent être confirmés par des expériences complémentaires.

3. La sumoylation de la protéine ATF7

Dans le but d'obtenir de la protéine ATF7 sumoylée pour tester les scFvs bispécifiques, plusieurs méthodes de sumoylation de la protéine ATF7 ont été testées (figure 42).

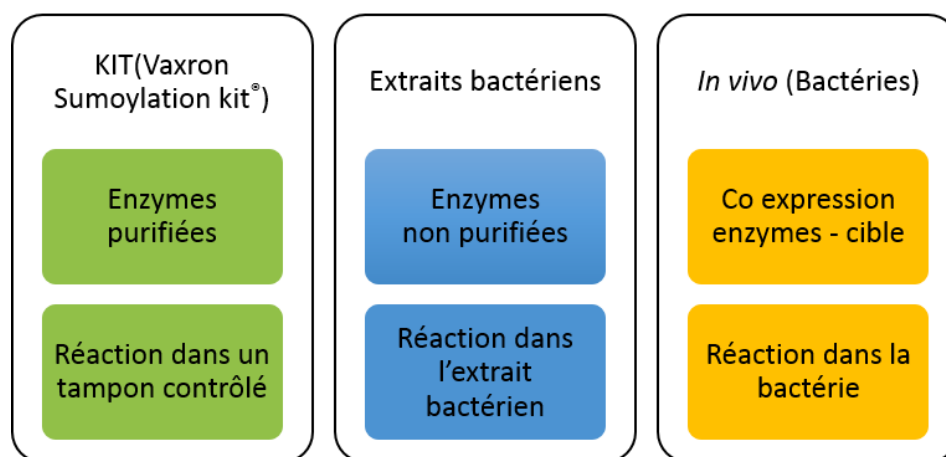


Figure 42 : Stratégies mises en place pour sumoyler la protéine ATF7.

Trois stratégies de sumoylation de la protéine ATF7-1 ont été testées. La première (en vert) consiste en l'utilisation d'un kit contenant les enzymes E1 et E2 ainsi que la protéine SUMO1 (S1) purifiées. La seconde stratégie consiste en l'expression des protéines E1, E2 et S1 dans les bactéries, de préparer un lysat bactérien et utiliser l'extrait total pour effectuer une réaction de sumoylation. La troisième méthode est de co-exprimer dans les bactéries la protéine à sumoyler avec la machinerie de sumoylation.

A. L'utilisation d'un kit de sumoylation

La première méthode consiste en la sumoylation *in vitro* à l'aide des enzymes E1 et E2 de la voie de sumoylation purifiées (Kit Vaxron®) (figure 43). Les enzymes E1 et E2 sont suffisantes pour conduire à la sumoylation de protéines cibles *in vitro*. Cette méthode à l'avantage d'utiliser des conditions maîtrisées et ne met en contact qu'un nombre limité de protéines. Néanmoins, la sumoylation du domaine (1-148) et de la protéine ATF7 entière par cette méthode ayant échouées, j'ai décidé d'ajouter l'enzyme E3 responsable du transfert de SUMO1 sur ATF7 dans la cellule. La protéine GST-RANBP2, délétée des exons F et G dispensables à l'activité de SUMO E3 ligase, a été produite chez E.coli, purifiée et ajoutée au mélange E1/E2. Ni l'ajout d'enzyme E3 à la réaction de sumoylation, ni

l'augmentation des quantités de E1 et E2, ni la modification des paramètres cinétiques n'ont permis de produire de la protéine ATF7 sumoylée *in vitro*.

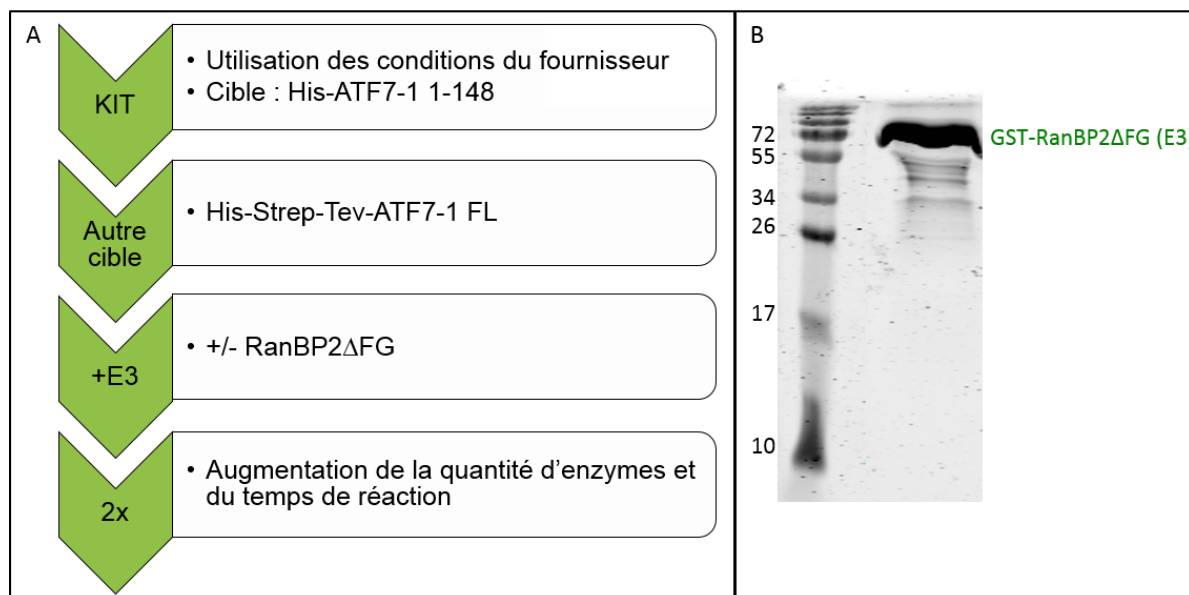


Figure 43 : Tests de sumoylation de la protéine ATF7 à l'aide du kit de sumoylation.

A. Stratégies de sumoylation par le kit Vaxxon®. i. conditions du kit avec la protéine cible 6HIS-ATF7 1-148. ii. Conditions du kit avec la protéine cible ATF7-1 complète. iii. Ajout de l'enzyme E3 aux conditions précédentes. iv. Changement des conditions de la réaction. **B.** Purification de la protéine RanBP2ΔFG (E3 ligase d'ATF7). Rendement total de 175mg/L.

B. Sumoylation à l'aide d'extraits bactériens

Dans le but d'obtenir une machinerie de sumoylation fonctionnelle, nous avons utilisé un plasmide codant pour les protéines SUMO1, E1 et E2 (Uchimura et al., 2004). E1, est un dimère des protéines SAE1/SAE2 chez l'homme et un dimère des protéines Aos1/Uba2 chez la levure. Dans ce système, c'est une protéine de fusion Aos1-Uba2 nommée AU qui est utilisée. Cette protéine conserve la capacité d'activer SUMO1 et de le transférer à l'E2. J'ai donc exprimé ces protéines et utilisé les extraits bactériens totaux pour réaliser des réactions de sumoylation *in vitro* (figure 44) et ai pu détecter l'enzyme E2 associée à SUMO1. Effectivement, l'analyse des extraits par western blot (figure 44D) révèle la protéine SUMO1 libre, ainsi que conjuguée à l'enzyme E2, et une bande très haute correspondant à la fusion SAE1-SAE2 conjuguée à S1. Ceci démontre que S1 est capable d'être prise en charge par la machinerie E1/E2 et d'être conjuguée à l'enzyme E2. J'ai donc incubé ces extraits bactériens avec les protéines ATF7 utilisées précédemment, et avec la protéine GST-ATF7-1 1-148 purifiée (figure 44E). N'ayant pas obtenu d'ATF7 sumoylé, j'ai

ajouté l'E3 RanBP2, le tampon provenant du kit et les enzymes E1 et E2 du kit. Aucune des combinaisons testées n'a fonctionné. J'ai alors testé l'ajout d'extraits cellulaires totaux de cellules HeLa ou Mel501. En aucun cas, la protéine SUMO1 n'est transférée à la protéine ATF7, bien que le transfert fonctionne sur la protéine E2.

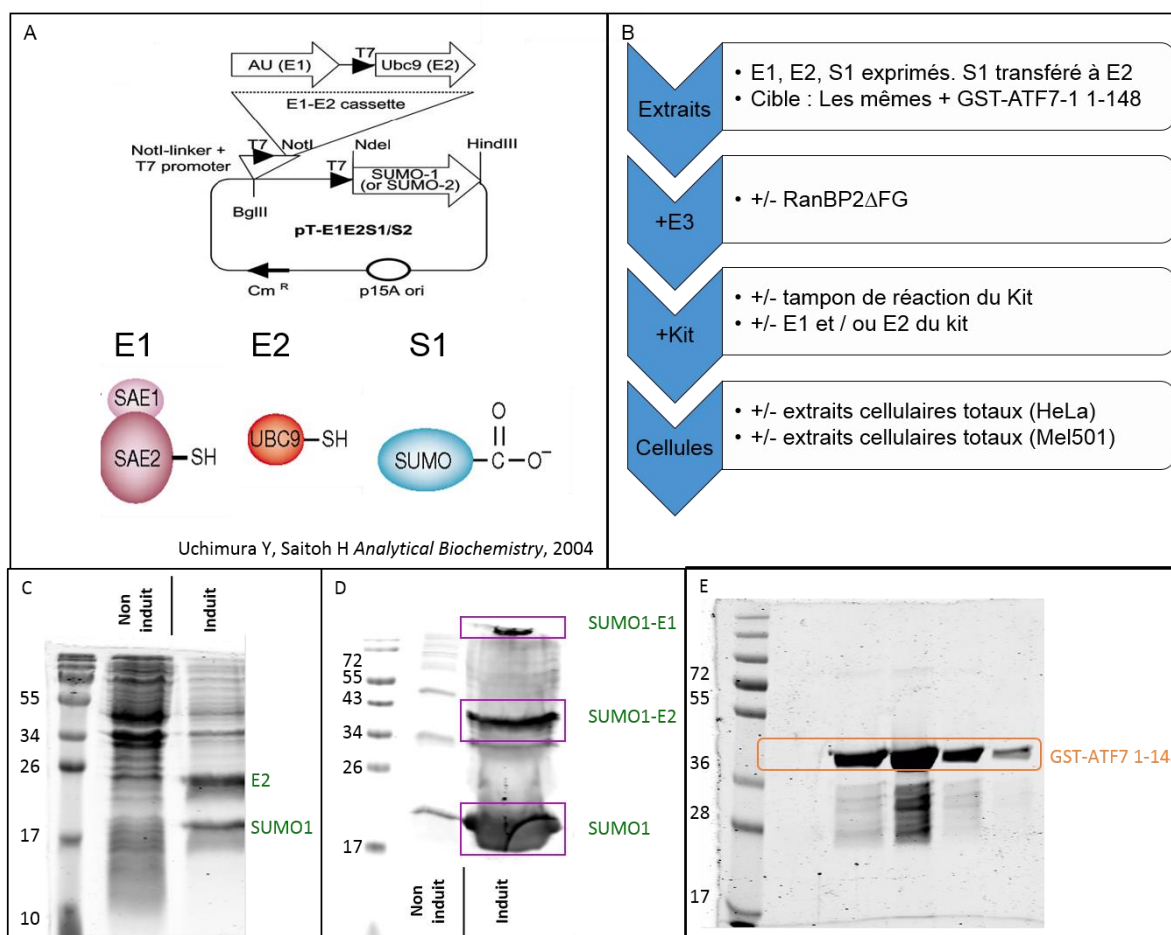


Figure 44 : Tests de sumoylation de la protéine ATF7 avec des extraits bactériens qui surexpriment les enzymes E1, E2 et la protéine S1.

A. Schéma du plasmide pTE1E2S1 et des protéines d'intérêt codées par celui-ci. **B.** Stratégies utilisées pour la sumoylation. **C.** Vérification de l'expression de la machinerie de sumoylation (SDS-PAGE 15% coloré au bleu de Coomassie). **D.** Analyse par Western blot avec un anticorps dirigé contre SUMO1. **E.** Purification de la protéine GST-ATF7 1-148, rendement total de 26mg de protéine par litre de culture.

Le fait de retrouver de la protéine SUMO1 associée à l'E2 démontre que le système fonctionne en partie. J'ai donc purifié la protéine SUMO (qui possède une étiquette HIS, figure 45A) exprimée dans E.coli et utilisé l'ensemble (SUMO libre et SUMO associée à l'E2) pour réaliser des tests de sumoylation *in vitro* (figure 45B). En l'absence de l'E1 et E2 provenant du kit de sumoylation, le système ne fonctionne pas (données non présentées). J'ai alors décidé d'y ajouter les enzymes E1 et E2 du kit de sumoylation et ainsi que le

domaine 1-137 de la protéine contrôle GST-RHA. Cette expérience nous montre une nette association de la protéine SUMO à l'E3 (cadre bleu) ainsi qu'une très faible sumoylation du domaine 1-137 de la protéine GST-RHA (cadre rose).

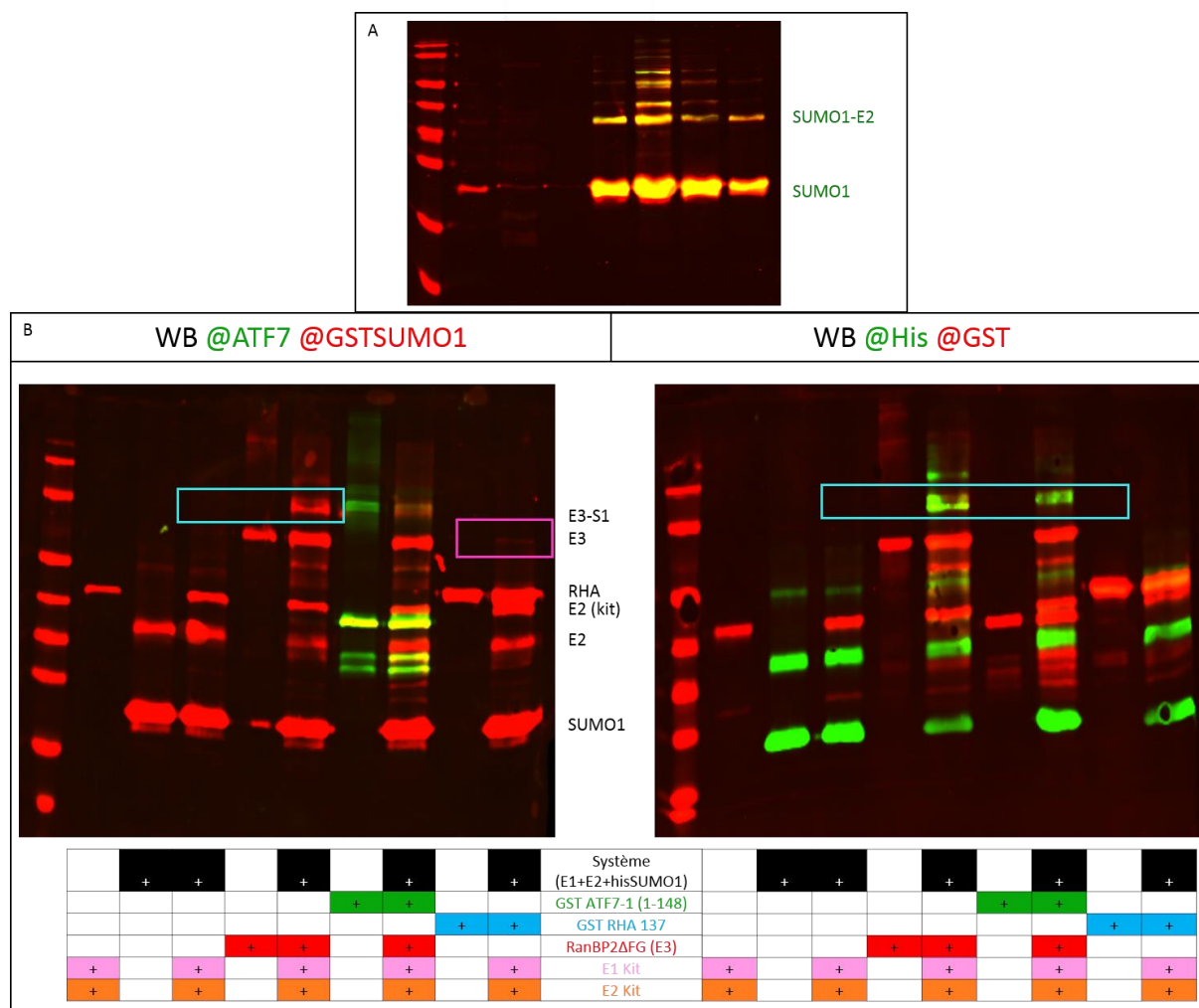


Figure 45 : Combinaison des stratégies 1 et 2 pour établir un système de sumoylation in vitro fonctionnel.

A. Purification de la protéine SUMO1 par incubation des extraits qui surproduisent la machinerie de sumoylation avec des billes de Ni-NTA. Analyse par « western blot » réalisé avec des anticorps dirigés contre la protéine SUMO1 (rouge) et des anticorps dirigés contre l'étiquette 6HIS (vert). **B.** Tests de sumoylation avec les différentes protéines listées dans le tableau. Le système (en noir) correspond au mélange des quatre fractions purifiées en **A**. Le panel de gauche présente l'ensemble des réactions révélées par western blot à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la protéine ATF7 (3D5) et un anticorps polyclonal de lapin qui a été sélectionné contre la protéine GST-SUMO1 (il peut donc reconnaître les deux protéines). Le panel de droite présente les mêmes réactions analysées à l'aide d'anticorps dirigés contre l'étiquette 6HIS (vert) et d'anticorps polyclonaux dirigés contre la GST uniquement (rouge).

C. La sumoylation *in vivo* en système bactérien

La co-production de protéine ATF7-1 complète avec le système de sumoylation n'est pas possible car la protéine ATF7 s'agrège au-delà de 20°C et la réaction de sumoylation

n'a pas lieu efficacement à cette température. Le domaine 1-148 de la protéine ATF7-1 fusionné à la GST a donc été co-exprimé avec les protéines E1E2 et S1 à 30°C, condition optimale pour la production de protéines solubles et la réaction de sumoylation (figure 46).

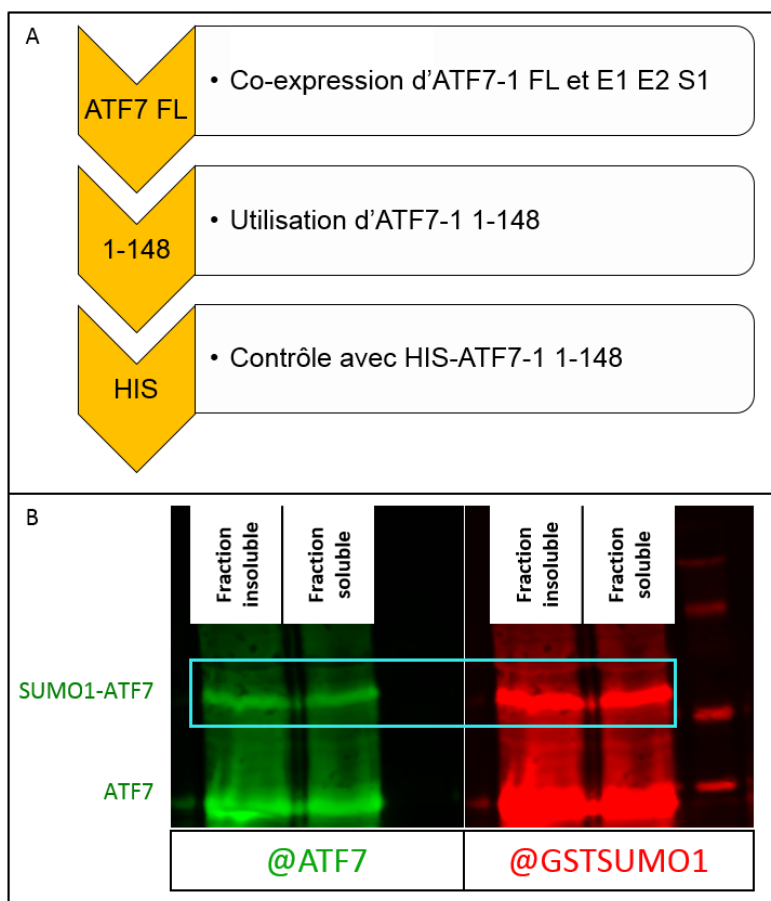


Figure 46 : Co-expression de la protéine ATF7-1 et la machinerie de sumoylation.

A. Stratégies testées pour obtenir la meilleure expression concomitante des protéines E1, E2 et S1 avec la protéine ATF7-1. L'expression est réalisée à 18°C avec la protéine ATF7-FL et à 30°C avec la protéine ATF7 1-148
B. Analyse des fractions insolubles et solubles (par SDS-PAGE 15%) révélés par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre ATF7 (3D5 en vert) et contre GST-SUMO1 (rouge).

Dans ces conditions, la protéine GST-ATF7 est efficacement sumoylée (figure 46B) avec un rendement de 50% environ. Afin de vérifier qu'il s'agit bien d'ATF7 sumoylée et non la GST, l'expérience a été réalisée avec la protéine HIS-ATF7 1-148. Comme le montre la figure 47, la protéine HIS-ATF7-1 1-148 sumoylée bien qu'à hauteur de 20 à 30% de la protéine totale. Cette technique de sumoylation *in vivo* permet donc d'obtenir de la protéine ATF7 sumoylée.

La purification de la protéine recombinante GST-ATF7 sumoylée par His-SUMO1 sera réalisée par deux chromatographies d'affinité différentes ; Ni-NTA et GST-sepharose (figure 47).

7. La purification réalisée à l'aide de billes de Ni-NTA, permet de purifier de la protéine SUMO1 libre (cadre violet) car SUMO1 est étiquetée avec 6 résidus histidine (figure 47A panel de gauche). La quantité de protéine ATF7 sumoylée récupérée ici est vraiment très faible (flèche violette du haut) et on peut aussi observer de la protéine ATF7 non sumoylée (flèche violette du bas). La présence de la protéine ATF7 non sumoylée est probablement due à la reconnaissance des billes de Ni-NTA par le motif en doigt à zinc de la protéine ATF7 d'autant plus que celle-ci est sous la forme de dimères à cause de la GST (qui est une protéine qui s'homodimérise) augmentant ainsi son avidité. 40% de la protéine ATF7 est sumoylée confirmant l'estimation par « western blot » de la figure 46.

8. La purification à l'aide d'une résine de glutathion-Sépharose donne un résultat plus propre (figure 47A panel de droite). Cependant, la quantité de protéine ATF7 sumoylée purifiée est inférieure à la quantité de protéine ATF7 non sumoylée dans ces conditions.

La séparation de la protéine ATF7-SUMO des protéines ATF7 et SUMO1 par 2 chromatographies successives n'a pu être réalisée du fait des faibles rendements. Cependant, la quantité de protéine ATF7 sumoylée est suffisante pour réaliser des tests de reconnaissance par ELISA mais ne permet pas d'effectuer des sélections par phage display qui nécessitent un degré de pureté supérieur.

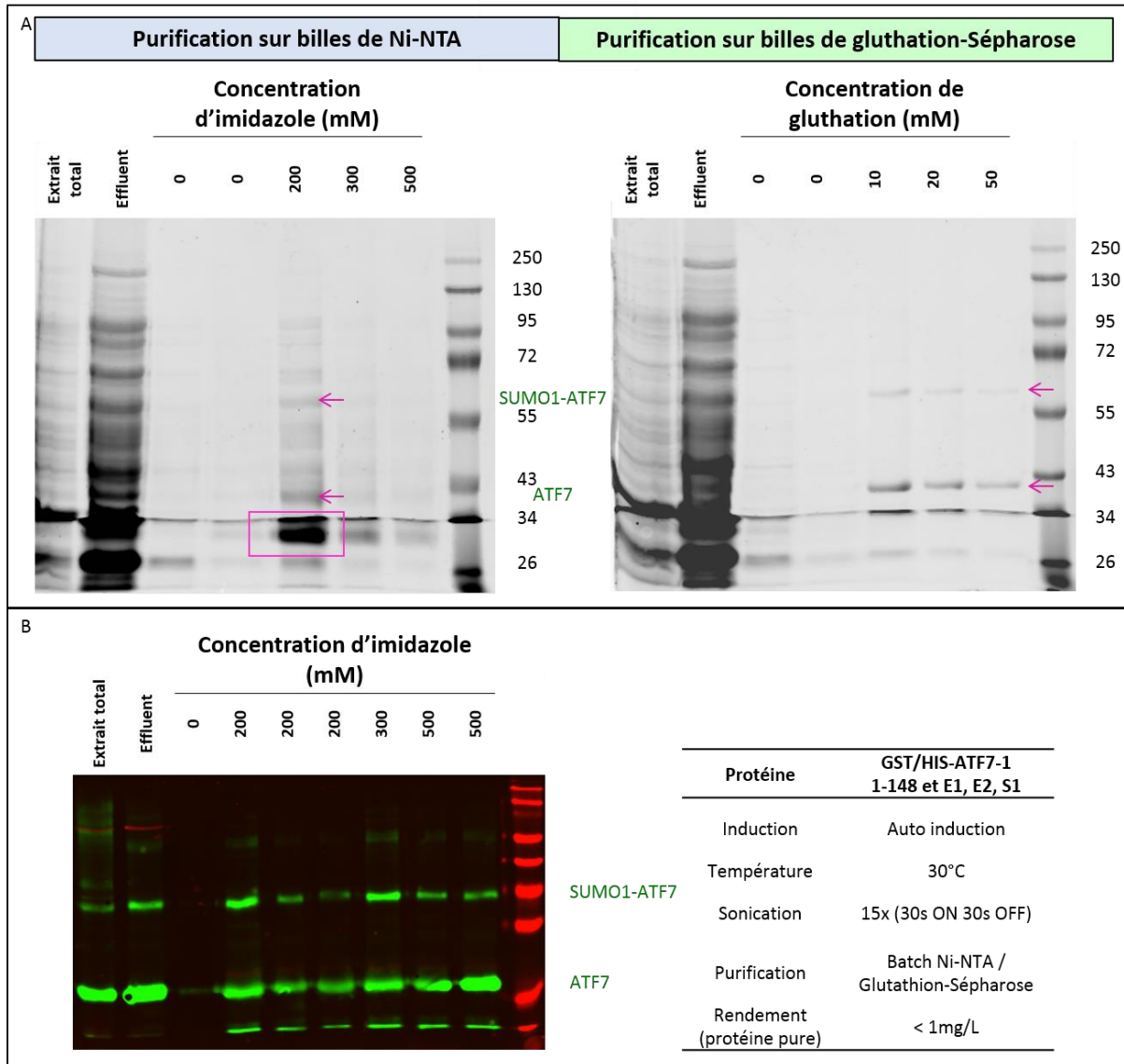


Figure 47 : Purification des protéines sumoylées.

A. Purification de la protéine GST-ATF7 sumoylée à l'aide de l'étiquette HIS située du côté amino terminal de la protéine SUMO1 (**panel de gauche**) ou avec l'étiquette GST d'ATF7 (**panel de droite**). **B.** Purification de la protéine HIS-ATF7-1 sumoylée.

Partie 2 : Etudes des modifications post-traductionnelle de la protéine ATF7

1. La phosphorylation de la T112 au cours de la mitose

Voir publication en annexes.

2. Etude de la croissance cellulaire et des mécanismes de résistance et de migration des cellules

A. La croissance des cellules

i. Surexpression d'ATF7 et croissance des cellules

La phosphorylation spécifique de la Thréonine 112 (T112) lors de la mitose, en absence de stress, a soulevé plusieurs questions, dont la plus élémentaire : La protéine ATF7 joue-t-elle un rôle dans la croissance cellulaire ?

Afin de répondre à cette question, la croissance d'une lignée cellulaire sur-exprimant la protéine ATF7 (HeLa XLP-ATF7) a été comparée avec une lignée témoin (lignée XLP-CARM1) qui possède le même fond génétique mais exprime la protéine méthyl transférase CARM1 (figure 48). Les cellules qui expriment fortement la protéine ATF7 présentent un temps de génération bien plus court d'environ 20h contre 27h pour les XLP-CARM1.

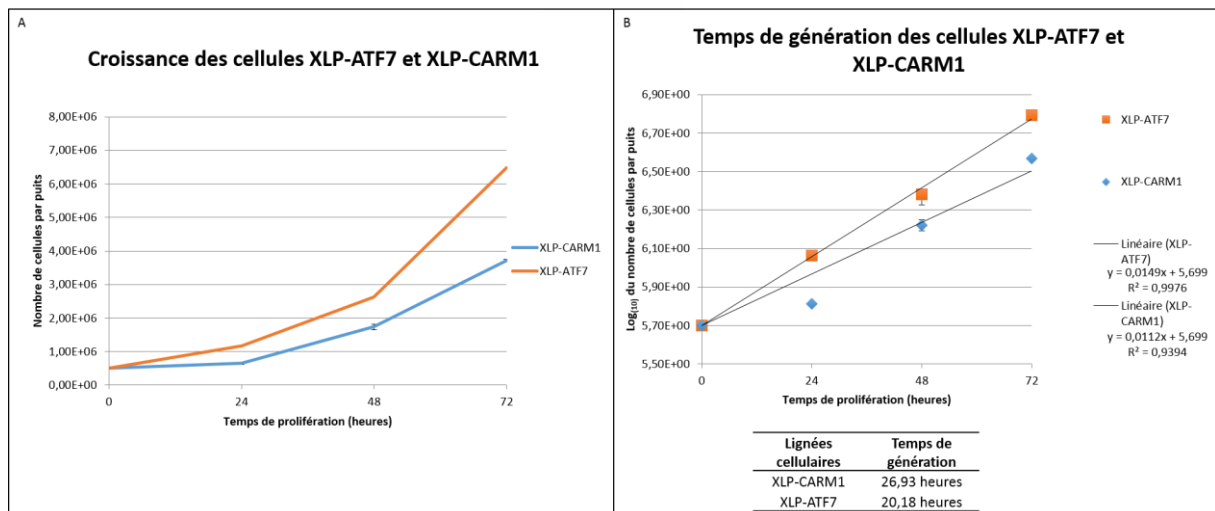


Figure 48 : Croissance des cellules XLP-ATF7

A. Nombre de cellules dans les puits de culture aux temps indiqués pour la lignée cellulaire XLP-ATF7 et la lignée XLP-CARM1. N=3, moyenne +/-SEM. **B.** Représentation semi logarithmique des données avec traçage d'une droite de corrélation linéaire permettant le calcul du temps de doublement des cellules.

Cependant, il faut être prudent lors de l'utilisation de lignées cellulaires stables car le lieu de l'insertion ainsi que le nombre d'inserts peut conduire à des phénotypes inattendus. De plus le contrôle utilisé peut aussi conduire à un biais, car la protéine CARM1 peut ralentir

la croissance cellulaire, même si cela n'a pas encore été décrit. Dans un premier temps j'ai décidé d'analyser le profil du cycle cellulaire de ces deux lignées par FACS.

Précisions sur la méthode de calcul

Attention aux arrondis lors des calculs. Microsoft Office® a tendance à arrondir, ainsi l'équation de la droite affichée sur le graphique est fautive. Pour la droite de régression linéaire de la série XLP-ATF7 par exemple elle vaut en réalité 0,149150918858235... ce qui peut avoir une influence sur des données très proches. Pour éviter cela, on peut utiliser la formule matricielle droitereg de Microsoft Excel® qui nous permet d'extraire la valeur des arguments a et b d'une droite d'équation $y=ax+b$. Cependant cette formule matricielle ne permet que de passer par zéro ou passer « au plus proche » des points mesurés lors de l'expérience pour tracer la droite. Attention car la droite « optimale » peut ne pas passer par notre point d'origine qui correspond à 50 000 cellules. Ce point de départ de l'expérience étant le plus fiable, nous devons forcer le passage de cette droite par celui-ci mais la formule matricielle ne nous permet pas de choisir de passer par 5,7 (5,7 est le logarithme de base de 10 de la valeur 50 000 qui est notre quantité de cellules initiale). Pour calculer cette équation nous devons retrancher 5,7 à toutes les valeurs de y et faire le calcul en forçant le passage de la droite de régression linéaire à passer par zéro. Nous évitons ainsi une légère variation de la pente de la droite qui pourrait induire une variation au niveau du résultat final. Notons aussi que le fait de passer par zéro annule l'argument b d'une droite d'équation $y=ax+b$ ce qui simplifie les calculs. Nous pouvons à présent récupérer l'équation de la droite et réaliser le calcul de la valeur de x_1 et x_2 pour une valeur y_1 et une valeur y_2 choisies et soustraire x_1 à x_2 pour obtenir le temps de génération. En utilisant les équations de droites arrondies nous aurions obtenu les valeurs 20,20h et 26,88h pour les cellules XLP-ATF7 et XLP-CARM1 respectivement.

L'analyse par FACS sur cellules synchronisées avec marquage à l'iodure de propidium permet de mesurer la quantité d'ADN au cours du cycle cellulaire. Nous avons décidé de prélever les cellules à des temps tardifs afin d'observer la seconde division des cellules (il n'est pas conseillé d'analyser les cellules sur un nombre trop important de cycles car elles ont tendance à se désynchroniser à partir du troisième cycle). Cependant nous n'avons pas observé de différences marquantes lors des deux premiers cycles de division des cellules après synchronisation (figure 49).

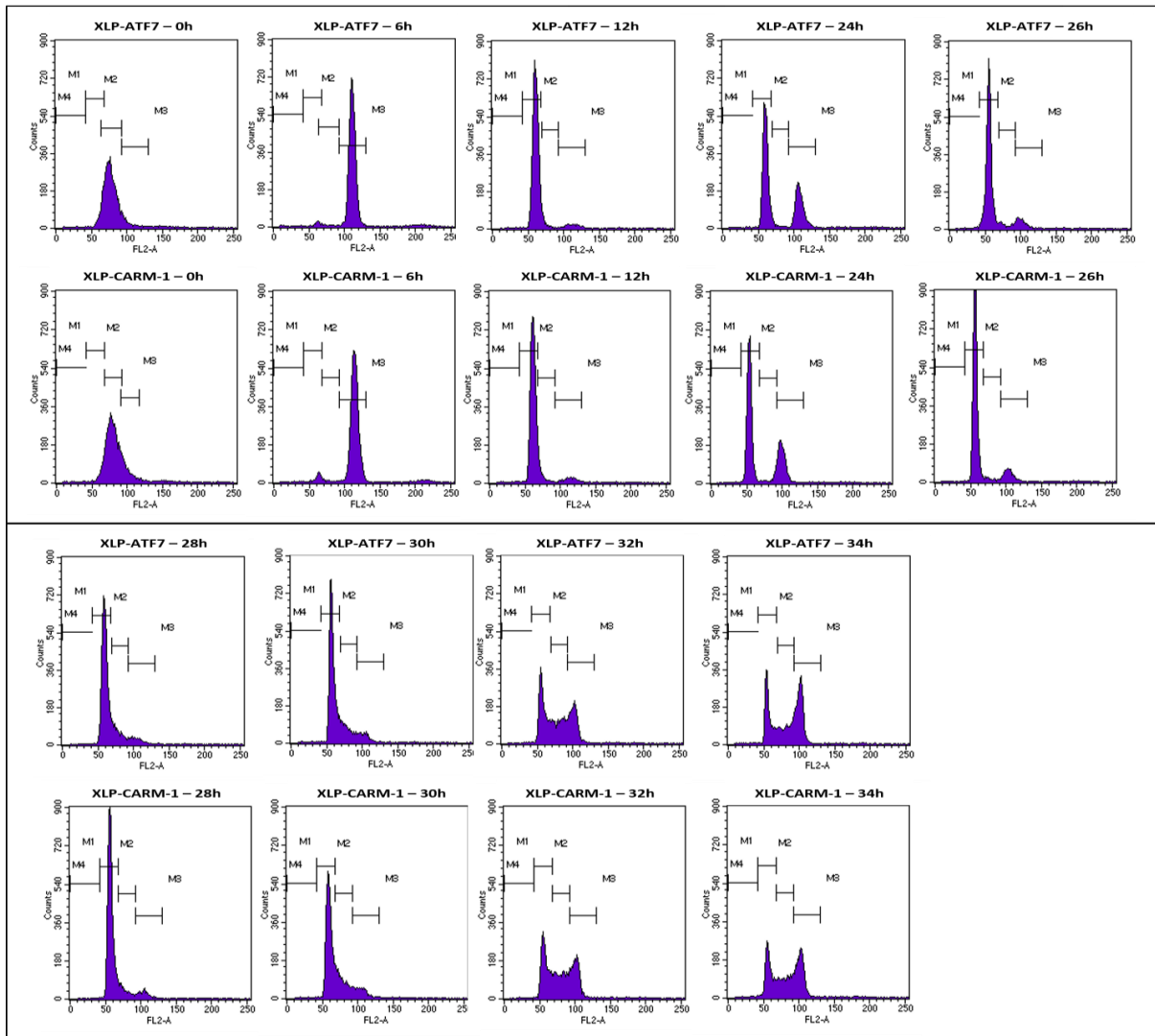


Figure 49 : Comparaison du cycle cellulaire de cellules XLP-ATF7 et XLP-CARM1

Les cellules ont été synchronisées en phase S par un double traitement à la thymidine et analysées par FACS.

Un contrôle indispensable lors de l'utilisation de lignées cellulaires stables est de confirmer l'effet observé sur d'autres clones ou d'autres lignées cellulaires. Pour cela, j'ai réalisé les mêmes expériences sur des lignées cellulaires stables dérivées de cellules Mel501 construites au laboratoire. Plusieurs clones de ces lignées sont disponibles et présentent différents niveaux d'expression d'ATF7 et d'ATF2. Ainsi les cellules qui expriment le plus fortement la protéine ATF7 (Mel ATF7 C2xx) présentent le temps de génération le plus court. Les lignées cellulaires qui surexpriment la protéine ATF2 (proche parent d'ATF7) poussent également plus rapidement que les cellules Mel501 mais moins rapidement que les cellules Mel ATF7 C2xx (figure 50). L'expression relative des protéines ATF dans ces lignées cellulaires a été estimée par analyse du signal par immunofluorescence pour les lignées qui expriment

des protéines de fusion GFP-ATF7 et par western blot pour l'ensemble des 7 lignées. Les cellules doivent être en phase de croissance exponentielle pour obtenir des données précises sur le temps de génération, c'est pour cela que les données à 96h ont été exclues des calculs. Effectivement les cellules Mel ATF7 C2xx ayant atteint une forte confluence se divisent moins rapidement en fin d'expérience et cela fausse le calcul.

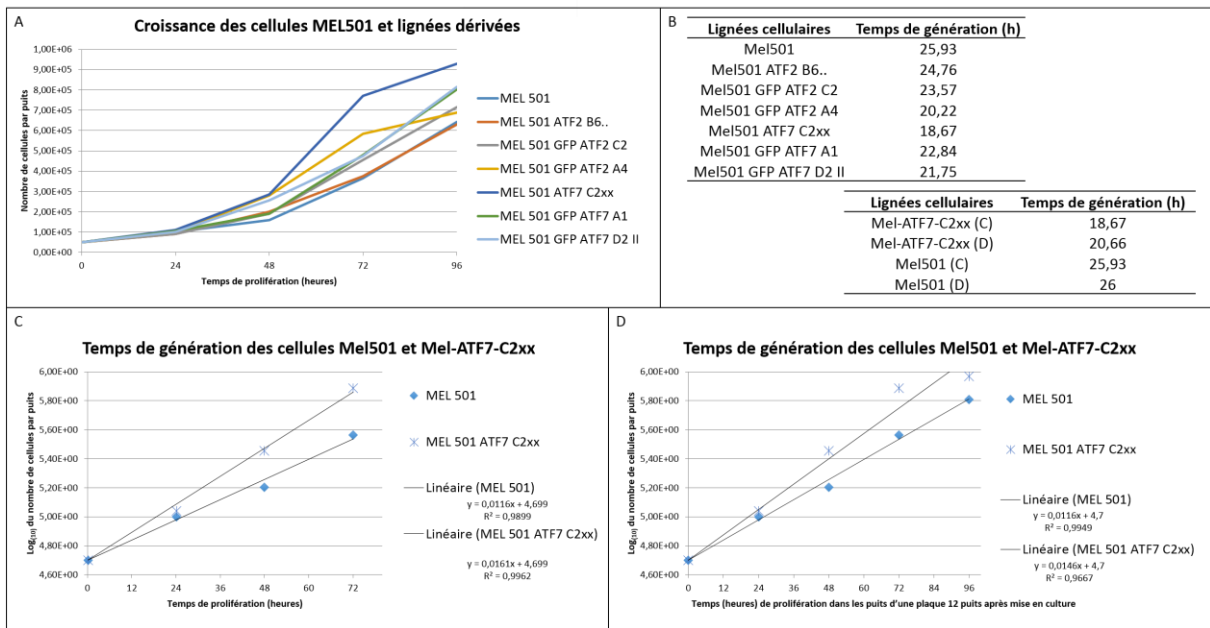


Figure 50 : Croissance des cellules Mel501 et des lignées dérivées

A. Nombre de cellules dans les puits de culture pour différentes lignées cellulaires qui surexpriment les protéines ATF7 et ATF2 dérivées de cellules Mel501. Pour chaque protéine une lignée qui exprime de manière forte, intermédiaire et faible la protéine d'intérêt est utilisée. **B.** Temps de génération de ces lignées calculé suite à l'exclusion de la valeur à 96h (tableau de gauche) car la lignée Mel ATF7 C2xx a atteint la phase stationnaire suite à sa croissance rapide. Comparaison du temps de génération des lignées Mel501 et Mel ATF7 C2xx en tenant compte ou non du point à 96h (tableau de droite). **C.** Représentation semi-logarithmique des données en A. pour les lignées Mel501 et Mel501 C2xx avec exclusion de la valeur à 96h. **D.** Représentation semi-logarithmique des données en A. pour les lignées Mel501 et Mel ATF7 C2xx en tenant compte de la valeur à 96h.

Les deux premiers cycles cellulaires après synchronisation des cellules Mel501 ou Mel ATF7 C2xx par un double block à la thymidine (voir légende des figures 51 et 53) ne présentent pas de différence majeure (figure 53).

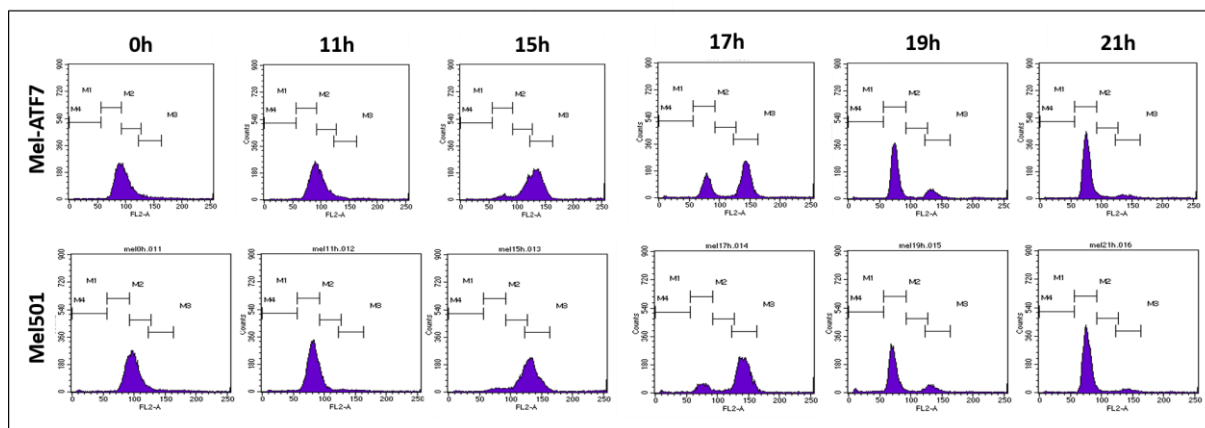


Figure 51 : Comparaison du cycle cellulaire de cellules Mel501 et Mel-ATF7

Les cellules ont été synchronisées en phase S par un double traitement à la thymidine, puis cultivées dans un milieu standard et récoltées aux temps indiqués. Elles ont ensuite été lavées avec une solution de PGE (PBS, 0,1% glucose, 1mM EDTA), fixées à l'éthanol 30 minutes sur glace et réhydratées dans le PGE pendant la nuit à 4°C. Le lendemain les cellules sont traitées à la DNaseI puis à l'Iodure de Propidium (50µg/mL) et analysées par FACS.

Nous pouvons conclure de ces expériences que la surexpression de la protéine ATF7 (et de la protéine ATF2 à plus faible mesure) induit une accélération de la vitesse de croissance des lignées cellulaires HeLa et Mel501. Nous savons également que la T112 est spécifiquement phosphorylée lors de la mitose. Nous n'avons pas pu observer de variations au niveau des deux premiers cycles cellulaires qui suivent une synchronisation des cellules. Une question sous-jacente à ces observations est : le phénotype observé est-il lié à une modification de l'expression des gènes dans ces cellules ? Si oui, quels gènes sont impliqués ? La protéine ATF7 active-t-elle directement la transcription des gènes cibles qui conduisent à cette croissance accélérée ou bien active-t-elle (ou réprime) d'autres molécules par un mécanisme transcription-indépendant ?

ii. Le phénotype de croissance est-il lié à la transcription ?

Utilisation des milieux compensés

L'idée de départ était que des molécules synthétisées par les cellules qui surexpriment la protéine ATF7 (comme des facteurs de croissance par exemple) auraient pu être libérées dans le milieu de culture. Afin de tester cette hypothèse, des cellules Mel501 ont été cultivées en présence de quantités croissantes de milieu de culture ayant servi à la culture de cellules Mel ATF7 C2xx. Plus la quantité de ce milieu ajouté est importante, plus le nombre de cellules comptées après 48h d'incubation augmente (figure 52A). Afin de vérifier

que l'effet observé n'est pas simplement dû à un enrichissement en une molécule produite naturellement par les cellules Mel501, les mêmes expériences ont été réalisées avec du milieu compensé provenant d'une culture primaire de cellules Mel501 (figure 52 panels B, C, D). On remarque nettement que le temps de génération des cellules cultivées en présence du milieu compensé provenant des Mel ATF7 C2xx est plus court comparé aux cellules cultivées en présence du milieu compensé des Mel501.

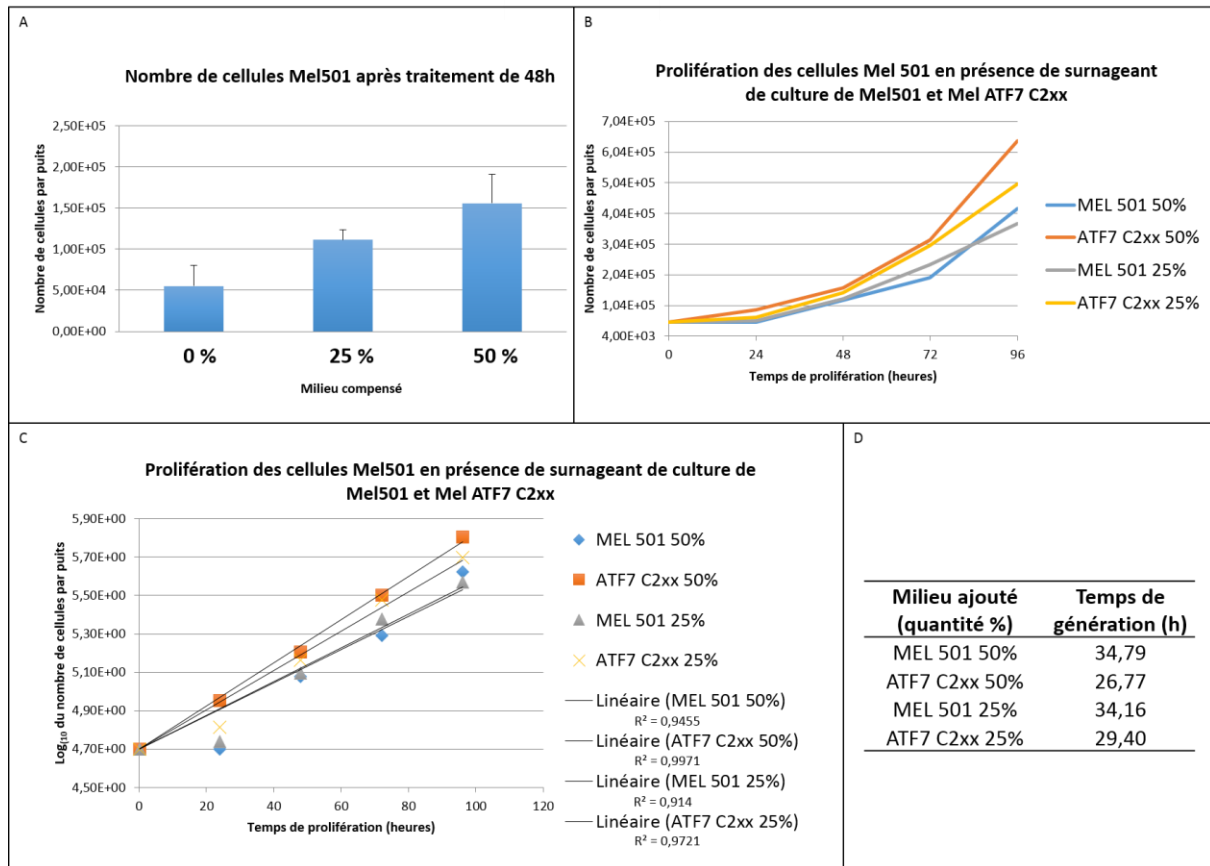


Figure 52 : Croissance des cellules Mel501 en milieu compensé par des surnageants de culture.

A. Croissance des cellules Mel501 en présence de quantités croissantes de milieu de culture provenant d'une culture de cellules Mel ATF7 C2xx. Les résultats présentés sont la moyenne de 7 expériences +/- SEM. **B.** Des expériences de croissance ont été réalisées en présence de 25 ou 50% de surnageant de culture provenant des cellules Mel ATF7 C2xx ou des cellules contrôle Mel501. Nous observons que celles qui reçoivent du surnageant de culture de cellules Mel ATF7 C2xx à plus fortes concentrations prolifèrent le plus rapidement. La quantité de surnageant provenant des Mel501 ne semble pas influencer la croissance des cellules. **C.** La représentation semi logarithmique nous permet à nouveau de calculer le temps de génération des cellules lors de cette expérience. **D.** Les temps de génération calculés dans chacune des conditions. Ceux-ci confirment la présence d'un élément qui accélère la croissance des cellules Mel501 dans le milieu de culture.

Ces expériences de croissance à l'aide de milieux compensés nous ont conforté dans l'idée qu'un élément sécrété dans le milieu de culture confère aux cellules l'aptitude à proliférer plus rapidement.

ATF7-4, un inhibiteur spécifique

La petite isoforme cytoplasmique ATF7-4 a été décrite au laboratoire comme un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription ATF7 et ATF2 (Diring *et. al*, 2010). Le modèle décrit stipule que la protéine ATF7-4 retient dans le cytoplasme la protéine kinase responsable de la phosphorylation de la T53 de la protéine ATF7. Suite à un stress cellulaire, cette protéine kinase, ainsi que la kinase p38 β 2, phosphorylent la protéine ATF7-4 ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome 26S, et la libération de la kinase qui peut phosphoryler ATF7 sur la T53. L'analyse de la séquence de la protéine ATF7-4, et l'alignement des protéines ATF7-4 d'autres espèces, montrent que deux résidus lysines successifs (codés par l'exon 4a spécifique de l'isoforme ATF7-4) pourraient correspondre à un site de poly-ubiquitinylation. J'ai généré trois constructions différentes par mutagenèse dirigée, dans lesquelles ces deux lysines sont mutées en arginine (mutants KR, RK et RR). Dans un premier temps, l'inhibition de la phosphorylation de la protéine ATF7 a été analysée suite à la surexpression de la protéine ATF7-4WT et des 3 mutants KR, RK et RR (figure 53). En présence d'ATF7-4 ou de chacun des 3 mutants exprimés par transfection transitoire mais en absence de traitement aux UVs, la phosphorylation de la protéine ATF7 est faible. Lorsque les cellules sont traitées aux UVs, la protéine ATF7-4 WT est dégradée et l'inhibition de la phosphorylation est levée. Il en est de même pour le mutant KR. Par contre, la phosphorylation de la protéine ATF7 par un traitement aux UVs est inhibée en présence des mutants RK et RR. Ceci sous-entend que ces deux mutants ne sont pas dégradés lorsque les cellules subissent un stress aux UV et piègent toujours la kinase responsable de la phosphorylation de la T53 d'ATF7.

L'effet de ces mutants sur la transcription dépendante de la protéine ATF7 a ensuite été étudié. L'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 sur le gène rapporteur en absence d'UVs est définie comme une activité de 100% afin de pouvoir comparer les différentes expériences (figure 54).

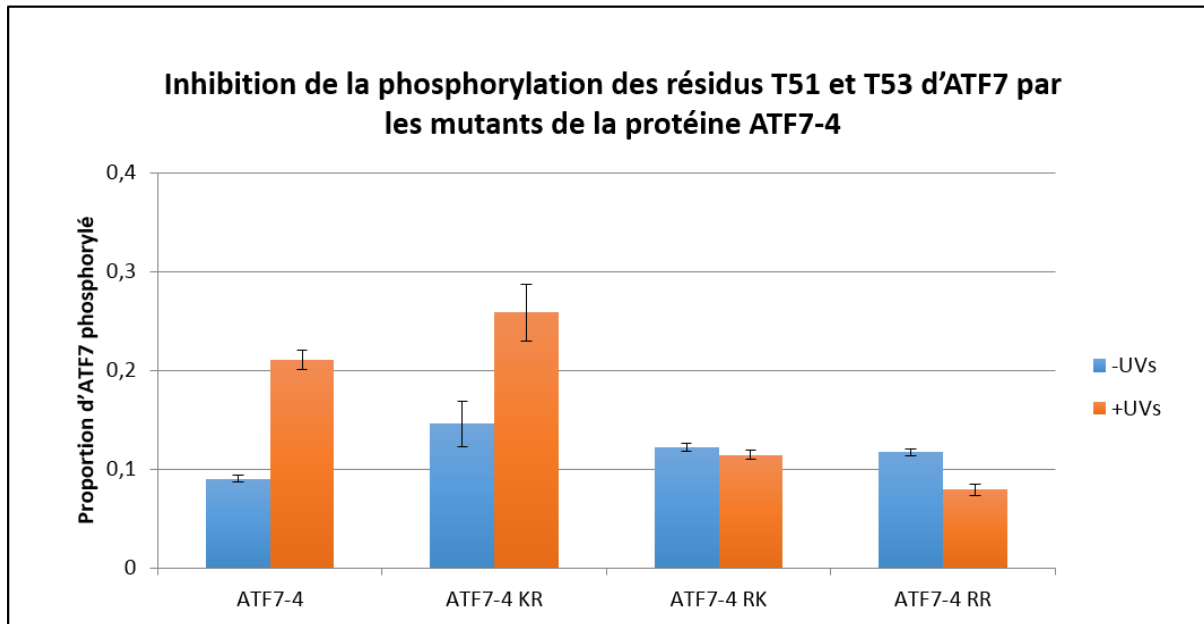


Figure 53 : L'inhibition de la phosphorylation des résidus T51 et T53 d'ATF7 par les mutants de la protéine ATF7-4.

Des cellules Mel501 ont été transfectées transitoirement par des plasmides exprimant soit la protéine ATF7-4 WT soit l'un des 3 mutants KR, RK et RR, et irradiées ou non par les UVs (20J/m²). Les extraits cellulaires totaux ont été analysés par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la forme phosphorylée d'ATF7 (au niveau des résidus T51 et T53) et par un anticorps anti ATF7 reconnaissant la forme non phosphorylée (sérum 97). La quantité de protéines totales déposée a été évaluée à l'aide d'un anticorps qui reconnaît l'actine. N=2.

La présence des résidus T51 et T53 est importante pour l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 sur ce gène rapporteur (Hamard et al., 2005). Comme attendu, leur mutation conduit à une perte de 60% de l'activité transcriptionnelle (figure 54). Le mutant ATF7-4 RR est capable d'inhiber fortement la transcription induite par la protéine ATF7 même suite à un traitement des cellules par rayonnement ultraviolet où moins de 40% d'activité transcriptionnelle résiduelle est observée. La présence du mutant ATF7-4 RR a donc le même effet que la mutation des résidus T51 et 53 de la protéine ATF7 sur son activité transcriptionnelle. En conclusion, le mutant ATF7-4 RR ne pouvant pas être dégradé retient la kinase dans le cytoplasme l'empêchant de phosphoryler la T53 de la protéine ATF7 inhibant ainsi son activité transcriptionnelle validant ainsi le modèle élaboré précédemment au laboratoire qui stipule que la protéine ATF7-4 inhibe le premier évènement de phosphorylation de la protéine ATF7 en réponse au stress.

Notons également que la mutation de la thréonine 112 en alanine permet à la protéine ATF7 de conserver 80% de son activité transcriptionnelle comme cela avait déjà été décrit au laboratoire.

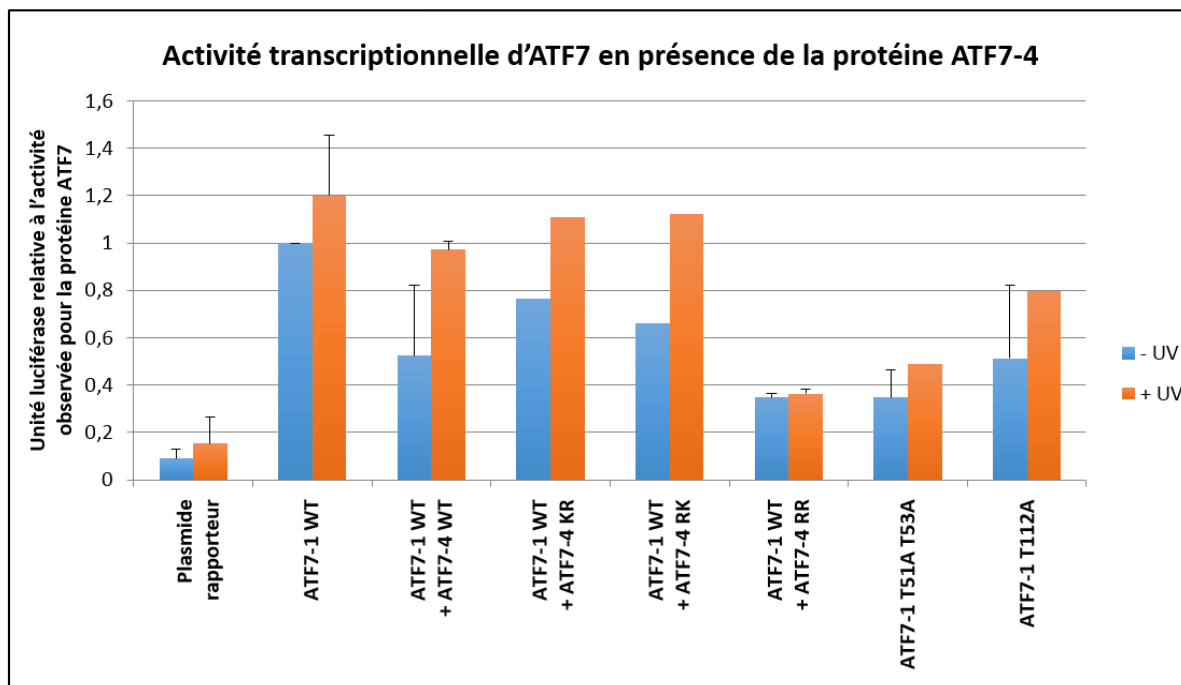


Figure 54 : Inhibition de l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 par la protéine ATF7-4 et les mutants KR, RK et RR.

Mesure de l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 sauvage (WT) ou mutée sur les résidus indiqués en présence ou non de la protéine ATF7-4 ou des mutants KR, RK et RR par mesure de l'activité luciférase exprimée par un plasmide rapporteur. L'expérience a été réalisée en l'absence (bleu) ou présence (orange) d'un traitement aux UVs de 20j/m². N=3, moyennes +/- SEM, sauf pour les mutants ATF7-4 KR et RK où l'expérience n'a pas été reproduite.

Ces expériences démontrent l'effet inhibiteur du mutant ATF7-4 RR sur l'activité transcriptionnelle d'ATF7. Dans le but de déterminer si l'accélération de la croissance des cellules sur-exprimant ATF7 est due à son activité transcriptionnelle, des lignées cellulaires exprimant la protéine ATF7-4 RR ou la protéine ATF7-4 sauvage ont été construites en utilisant un plasmide auto répliquatif non intégratif de type pCEP4 (Invitrogen®, Andersson *et al.*, 1989). La lignée cellulaire dans laquelle ce plasmide ectopique a été intégré est la lignée Mel501. Ces lignées cellulaires ont été utilisées pour effectuer des tests de croissance cellulaire (figure 55). Nous n'observons pas de différence de croissance entre les lignées exprimant ATF7-4 sauvage et ATF7-4 RR ni de variation entre les clones testés. Cependant, nous observons très nettement qu'au sixième jour de croissance, le nombre de cellules dans

les puits des deux clones exprimant la protéine ATF7-4 sauvage est largement réduit bien que les cellules ne sont pas à confluence. Le comptage des cellules mortes montre que les lignées qui expriment la protéine ATF7-4 sauvage présentent un taux de létalité 3,5 fois plus élevé que les cellules exprimant ATF7-4 RR. Cette létalité explique le plus faible nombre de cellules vivantes comptées. La létalité observée pourrait être due à la perte d'un effet anti-apoptotique de la protéine ATF7-4, ceci n'est pas observé pour la protéine ATF7-4 RR qui est plus stable car ne pouvant pas être polyubiquitinylée.

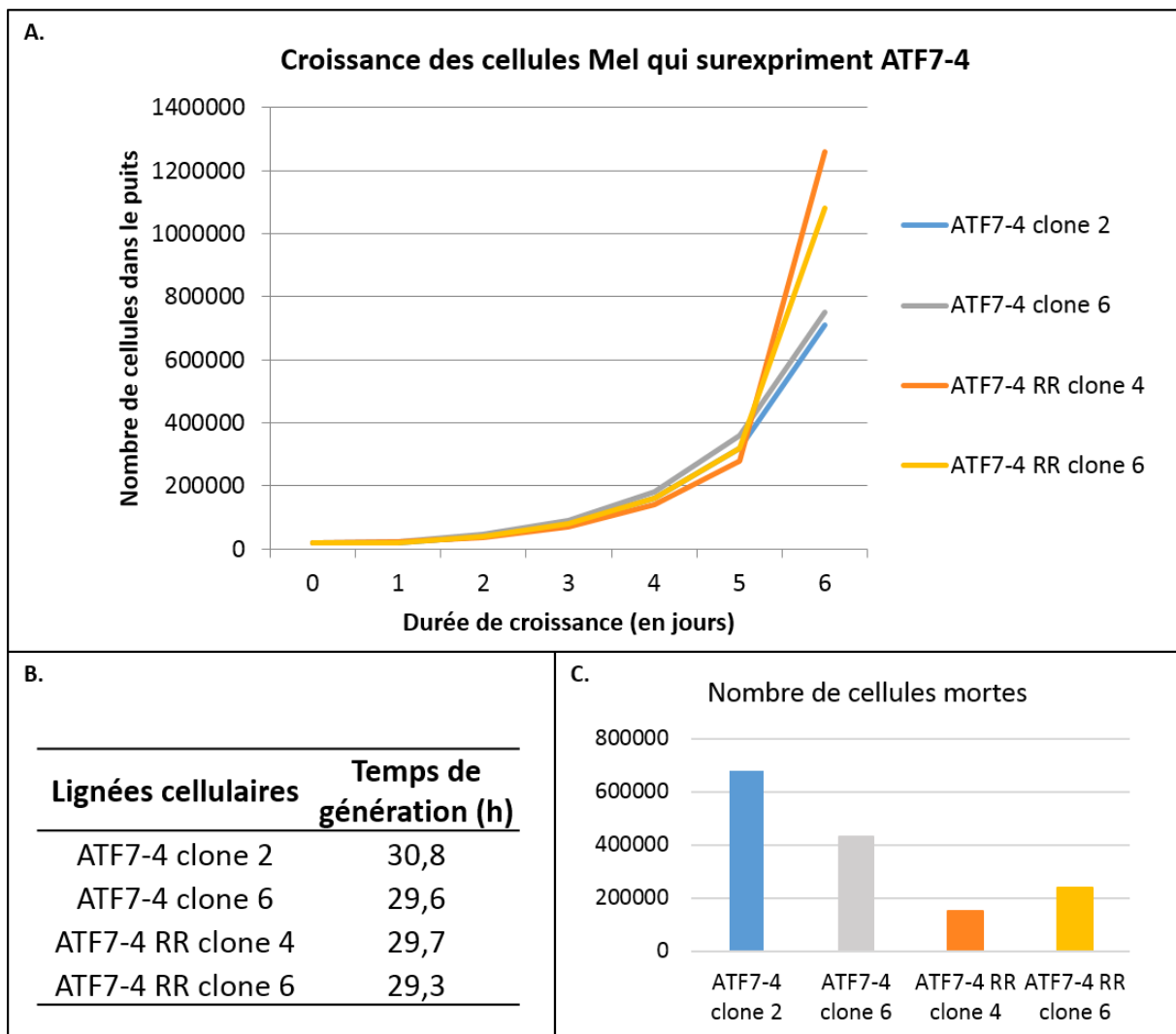


Figure 55 : Croissance des cellules Mel501 en présence de la protéine ATF7-4

A. Croissance des cellules Mel501 en présence de la protéine ATF7-4 ou du mutant RR exprimés par un plasmide auto répliquatif non intégratif (pCEP4). 2 clones parmi ceux générés pour chaque protéine ont été testés. **B.** Temps de génération de ces cellules. **C.** Nombre de cellules mortes dans les puits au sixième jour de culture.

Le temps de génération est bien plus important pour ces lignées (30h en moyenne) en comparaison de celui des Mel501 (26h) et des Mel ATF7 C2xx (20h). Nous pouvons conclure de ces expériences que la protéine ATF7 permet de diminuer le temps de génération des cellules lorsqu'elle est plus fortement exprimée, et que l'inhibition de son activité transcriptionnelle dépendante de sa phosphorylation sur les T53 et T51 augmente significativement ce temps de génération.

Plusieurs questions restent ouvertes. L'effet de croissance semble au moins en partie être lié à un effet dépendant de la transcription, mais est-ce un effet direct ou indirect ? Quelles sont les cibles activées par la protéine ATF7 en cas d'effet indirect ? Quels sont les gènes cibles de ce mécanisme ?

Afin d'obtenir une idée globale des gènes affectés par la surexpression de la protéine ATF7, des expériences de RNA-seq ont été entreprises au laboratoire. Les résultats de ces expériences ont récemment été obtenus mais n'ont pas encore été interprétés.

B. Résistance et migration des cellules

La protéine ATF7 étant un facteur de transcription de réponse au stress, nous nous sommes posé la question de savoir si les lignées qui surexpriment la protéine, en plus de se diviser plus rapidement, présentent une résistance accrue aux différents stress qui induisent la phosphorylation de la protéine ATF7. Des tests de clonogénicité ont été réalisés sur des cellules Mel501 et Mel ATF7 C2xx, cultivées en absence ou présence de sorbitol (300mM) ou stimulées par les UVs (15J/m²) (figure 56). 1000 cellules vivantes étalées sur une surface de 10cm² ne forment que 200 et 300 colonies ce qui signifie que 70-80% des cellules meurent ou deviennent sénescents suite à la manipulation. Un traitement au sorbitol réduit ce nombre de colonies entre 150 (Mel501) et 200 (Mel ATF7 C2xx). Cette différence n'est cependant pas significative car les erreurs types (SEM) sont grandes et se chevauchent, ce qui est confirmé par un test d'égalité des moyennes à variances non identiques qui donne une p valeur largement supérieure à 0,05 (0.4464). Nous pouvons donc conclure que les cellules qui expriment plus fortement la protéine ATF7 ne sont pas plus résistantes à un stress induit par le sorbitol. L'irradiation aux UVs ne permet pas aux cellules isolées de donner naissance à des colonies excepté sur les rebords de la boîte correspondent à la zone

où les cellules sont protégées du rayonnement UV. De ce fait, une gamme de plus faible de doses d'UVs a été testée (figure57).

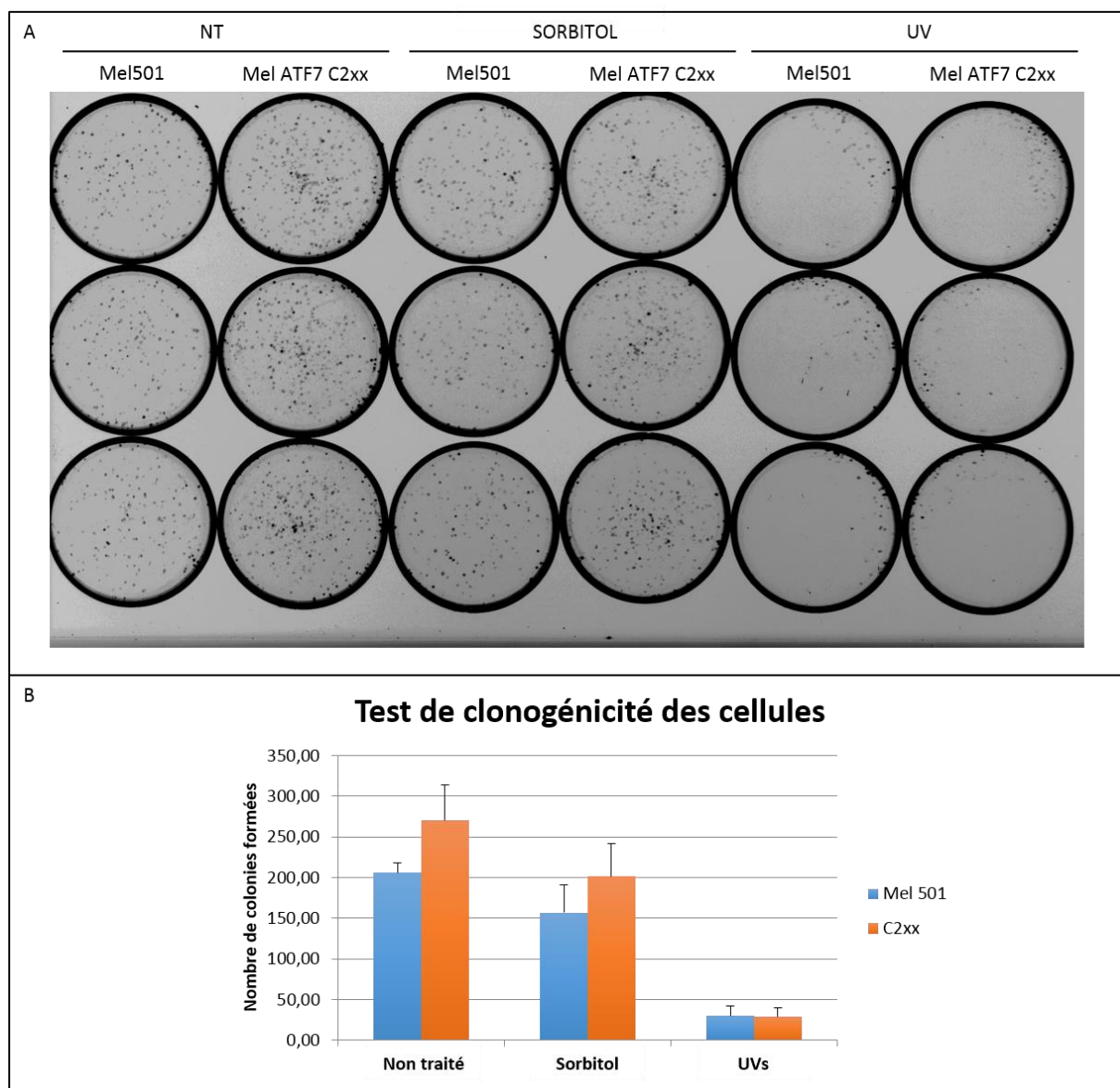


Figure 56 : Tests de clonogénicité des cellules Mel501 et Mel ATF7 C2xx dans différentes conditions

A. Colonies formées par les cellules Mel501 et Mel ATF7 C2xx suite aux différents traitements. **B.** Nombre de colonies comptées dans ces conditions.

L'ensemble des lignées cellulaires testées (ATF2, ATF7-1 et ATF7-2) forment des colonies à une dose d'UVs de 1J/m^2 mais pas au-delà. Aucune différence entre les lignées n'est visible, indiquant que la surexpression de ces protéines ne confère aucune résistance aux UVs. Ces résultats paraissent surprenants étant donné que les protéines ATF7 sont phosphorylées et activées par les UVs. Néanmoins, la dose d'UVs utilisée pour les

expériences de clonogénicité est nettement inférieure à celle utilisée pour détecter la phosphorylation de la protéine ATF7 par « western blot », ces expériences ne permettent peut être pas d'observer un effet bien présent.

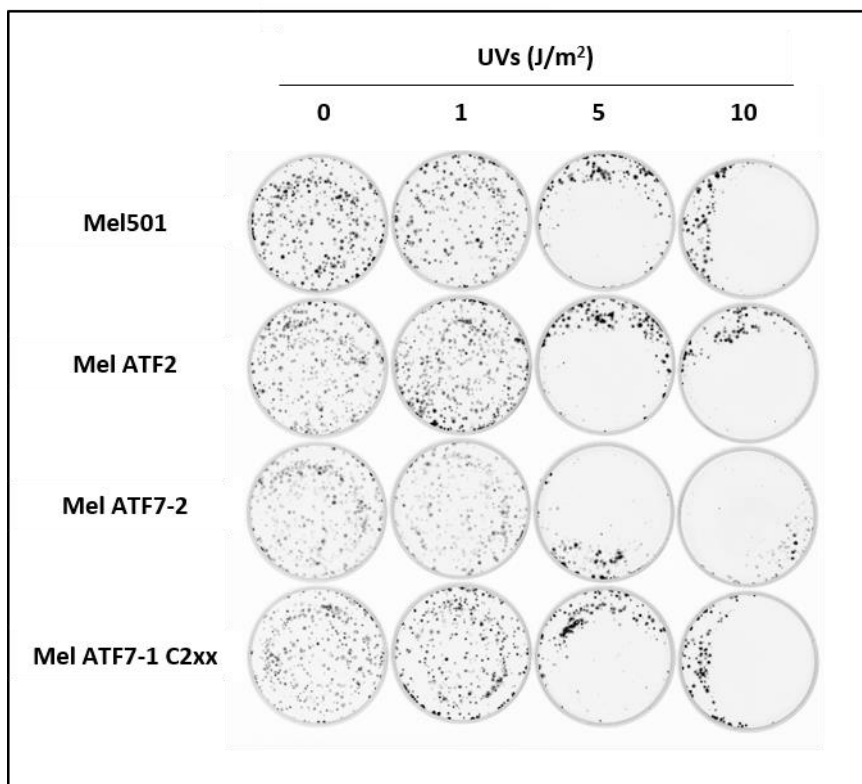


Figure 57 : Tests de clonogénicité des cellules Mel501 et Mel ATF7 C2xx traitées aux UVs

Tests de clonogénicité des différentes lignées cellulaires après traitement à différentes doses d'UVs.

L'ensemble de ces résultats indique que les cellules qui expriment fortement la protéine ATF7 présentent un temps de génération plus court leur permettant d'envahir rapidement une flasque de culture sans pour autant présenter une résistance accrue à différents stress. Cependant, une des caractéristiques des tumeurs agressives est de pouvoir envahir les tissus avoisinants en possédant une mobilité accrue. Le test de cicatrification ou «wound healing » met en évidence cette capacité migratoire des cellules. Pour cela, une « blessure » est induite par grattage d'une ligne de cellules d'une culture à haute confluence. Les cellules sont ensuite incubées et photographiées chaque jour pour analyser la largeur de la cicatrice. Des cellules qui sont capables de se déplacer plus rapidement coloniseront plus rapidement l'espace généré que des cellules statiques. Ce test a été réalisé sur des cellules Mel501, Mel ATF2, Mel ATF7-2 et Mel ATF7-1 C2xx (figures 58-61). Clairement, les cellules

Mel ATF7-1 C2xx recolonisent plus rapidement l'espace généré qui est presque comblé après 48h comparé aux autres lignées qui ne comblent l'espace qu'au bout de 72h. Les cellules qui surexpriment la protéine ATF7-1 semblent donc être plus mobiles. A ce stade, nous pouvons nous demander si la phosphorylation de la protéine ATF7 est importante dans ce phénomène de migration.

Nous savons que la T112 est phosphorylée au cours de la mitose de manière indépendante à tout stress, mais qu'en est-il pour le phénomène de cicatrisation ? Les T51 et T53 sont-elles phosphorylées lors de ce phénomène ? Afin de répondre à ces questions, une nouvelle expérience de cicatrisation a été réalisée sur lame de microscopie et les cellules ont été fixées après différents temps d'incubation, puis immuno-marquées par des anticorps spécifiques des formes phosphorylées. Aucune modification de la phosphorylation sur les T51, T53 et T112 n'a pu être observée au niveau des cellules près de la blessure (figure 62). Nous pouvons conclure que le phénomène de cicatrisation ne met pas en jeu la phosphorylation des résidus T51, T53 et T112 de la protéine ATF7.

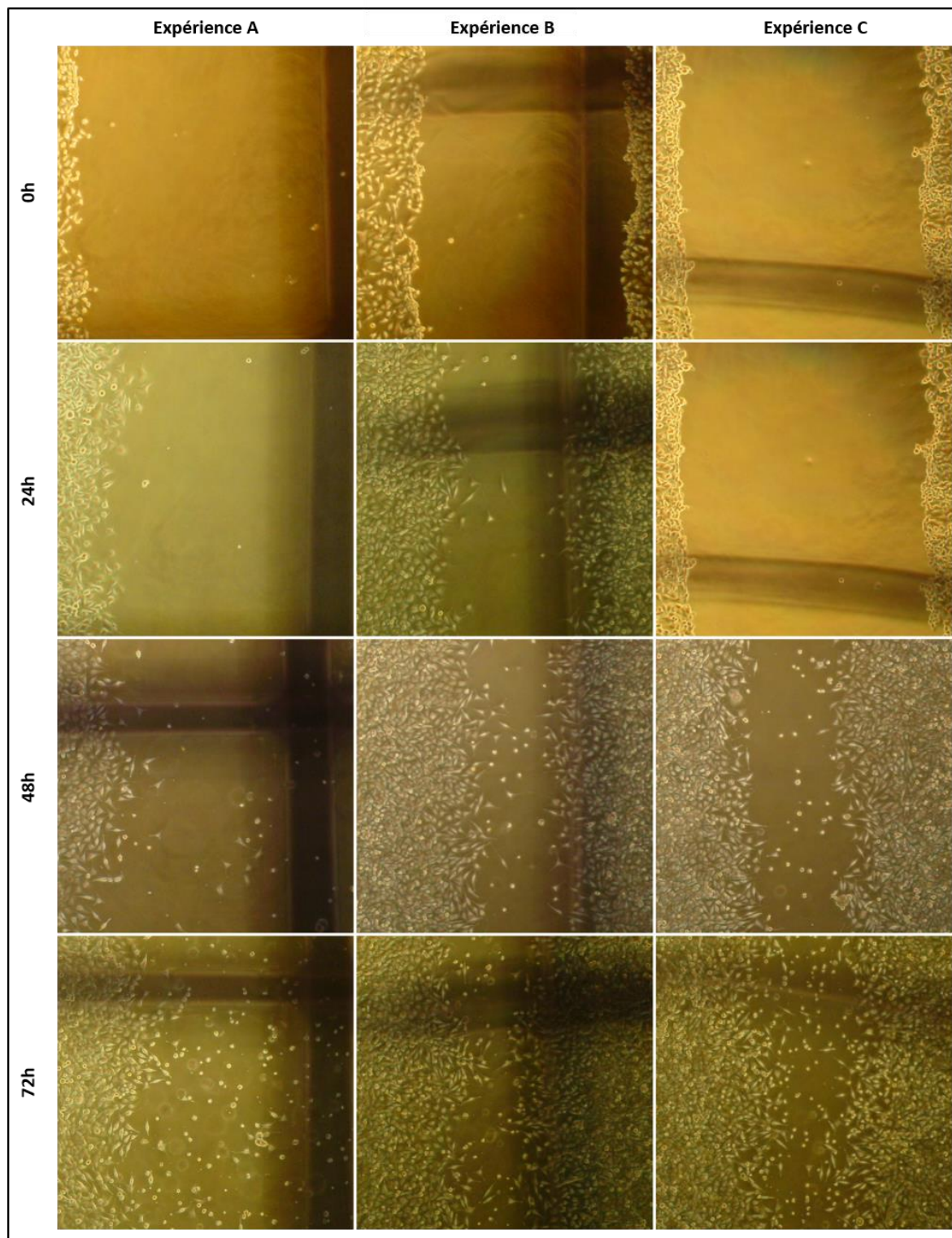


Figure 58 : Tests de cicatrisation des cellules Mel501

Des expériences de cicatrisation ont été réalisées. Pour cela les cellules de la lignée ont été déposées dans les puits d'une plaque 6 puits et mises en culture jusqu'à atteindre une confluence de 90%. A ce stade, les blessures sont induites à l'aide d'un cône de pipette et les cellules rincées (pour éliminer les cellules arrachées). Les puits contenant les cellules ont été observées et photographiées à 0, 24 et 48 et 72h après formation de la blessure. Les expériences ont été réalisées dans 3 puits en parallèle. Chaque colonne correspond à une expérience et chaque ligne au temps indiqué après formation de la blessure.

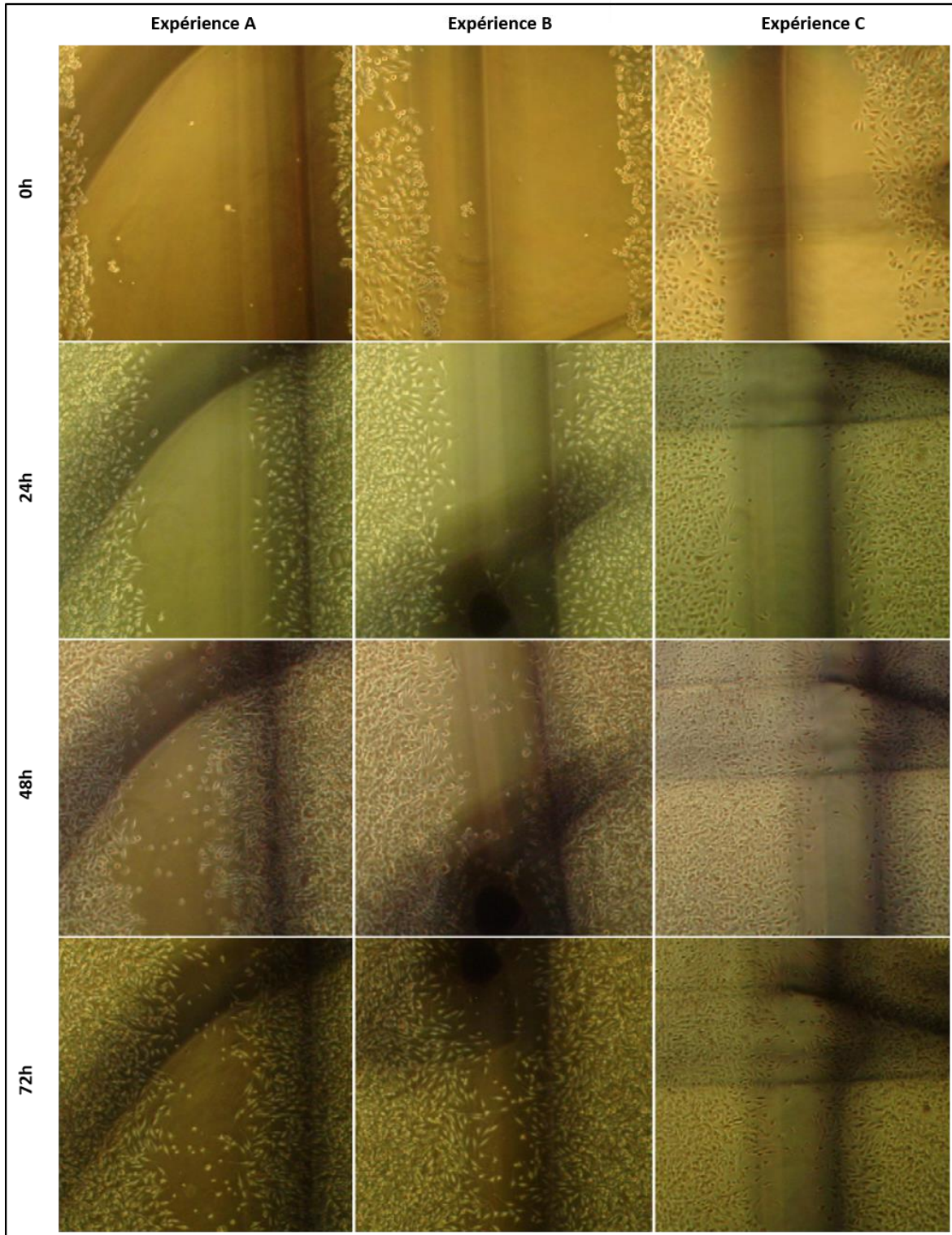


Figure 59 : Tests de cicatrisation des cellules Mel ATF2

Des expériences de cicatrisation ont été réalisées. Pour cela les cellules de la lignée ont été déposées dans les puits d'une plaque 6 puits et mises en culture jusqu'à atteindre une confluence de 90%. A ce stade, les blessures sont induites à l'aide d'un cône de pipette et les cellules rincées (pour éliminer les cellules arrachées). Les puits contenant les cellules ont été observés et photographiés à 0, 24 et 48 et 72h après formation de la blessure. Les expériences ont été réalisées dans 3 puits en parallèle. Chaque colonne correspond à une expérience et chaque ligne au temps indiqué après formation de la blessure.

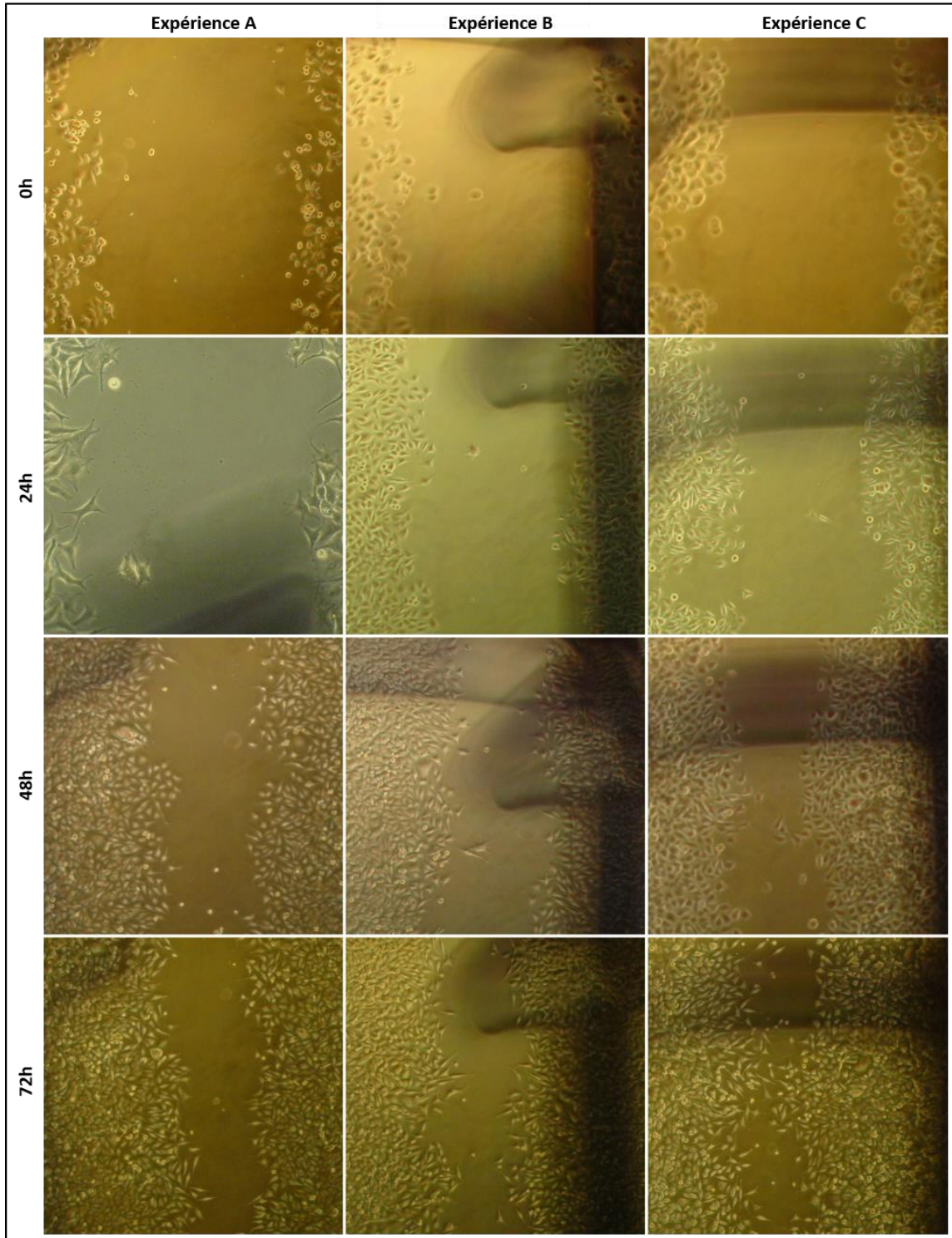


Figure 60 : Tests de cicatrisation des cellules Mel ATF7-2

Des expériences de cicatrisation ont été réalisées. Pour cela les cellules de la lignée ont été déposées dans les puits d'une plaque 6 puits et mises en culture jusqu'à atteindre une confluence de 90%. A ce stade, les blessures sont induites à l'aide d'un cône de pipette et les cellules rincées (pour éliminer les cellules arrachées). Les puits contenant les cellules ont été observées et photographiées à 0, 24 et 48 et 72h après formation de la blessure. Les expériences ont été réalisées dans 3 puits en parallèle. Chaque colonne correspond à une expérience et chaque ligne au temps indiqué après formation de la blessure.

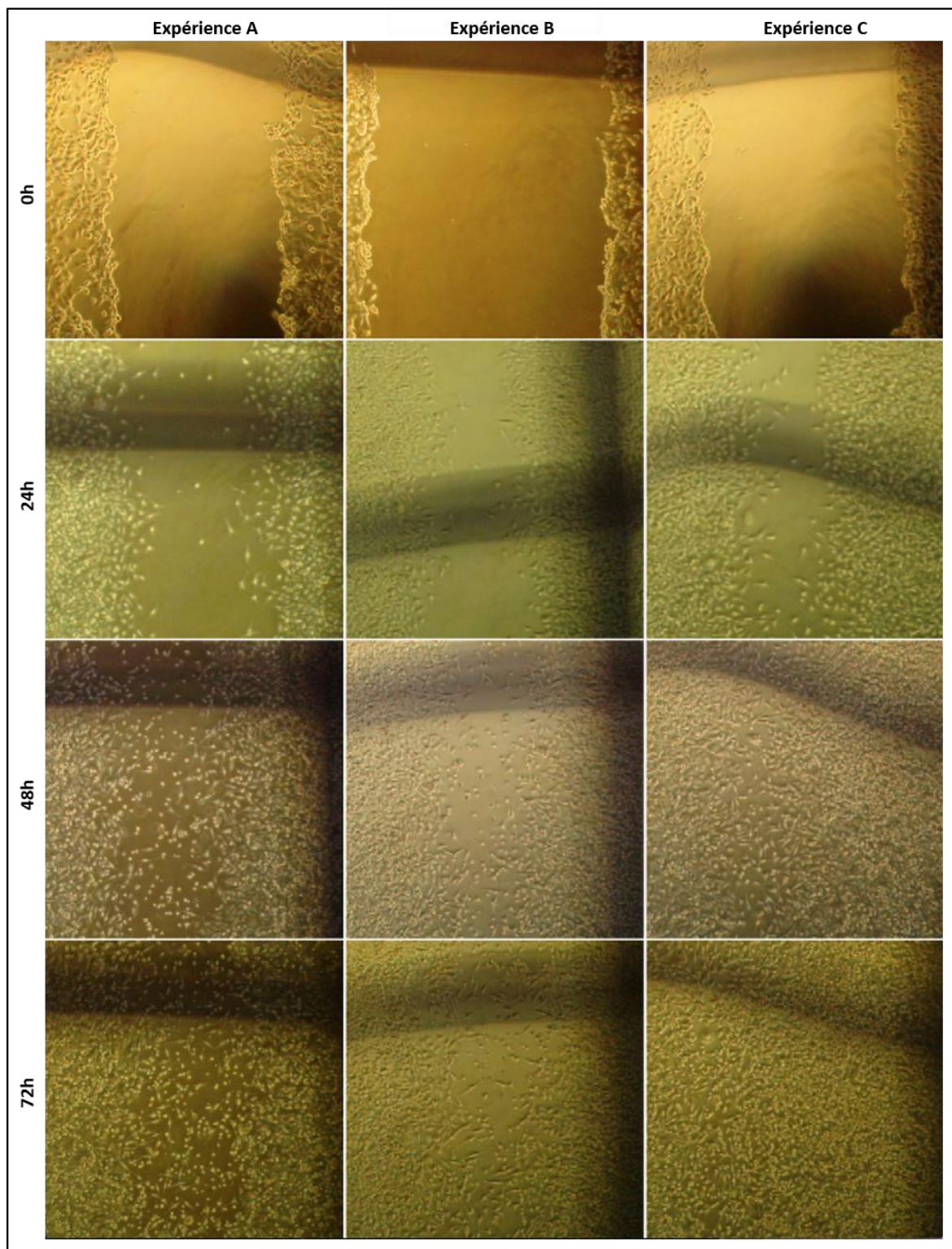


Figure 61 : Tests de cicatrisation des cellules Mel ATF7-1 C2xx

Des expériences de cicatrisation ont été réalisées. Pour cela les cellules de la lignée ont été déposées dans les puits d'une plaque 6 puits et mises en culture jusqu'à atteindre une confluence de 90%. A ce stade, les blessures sont induites à l'aide d'un cône de pipette et les cellules rincées (pour éliminer les cellules arrachées). Les puits contenant les cellules ont été observés et photographiés à 0, 24 et 48 et 72h après formation de la blessure. Les expériences ont été réalisées dans 3 puits en parallèle. Chaque colonne correspond à une expérience et chaque ligne au temps indiqué après formation de la blessure.

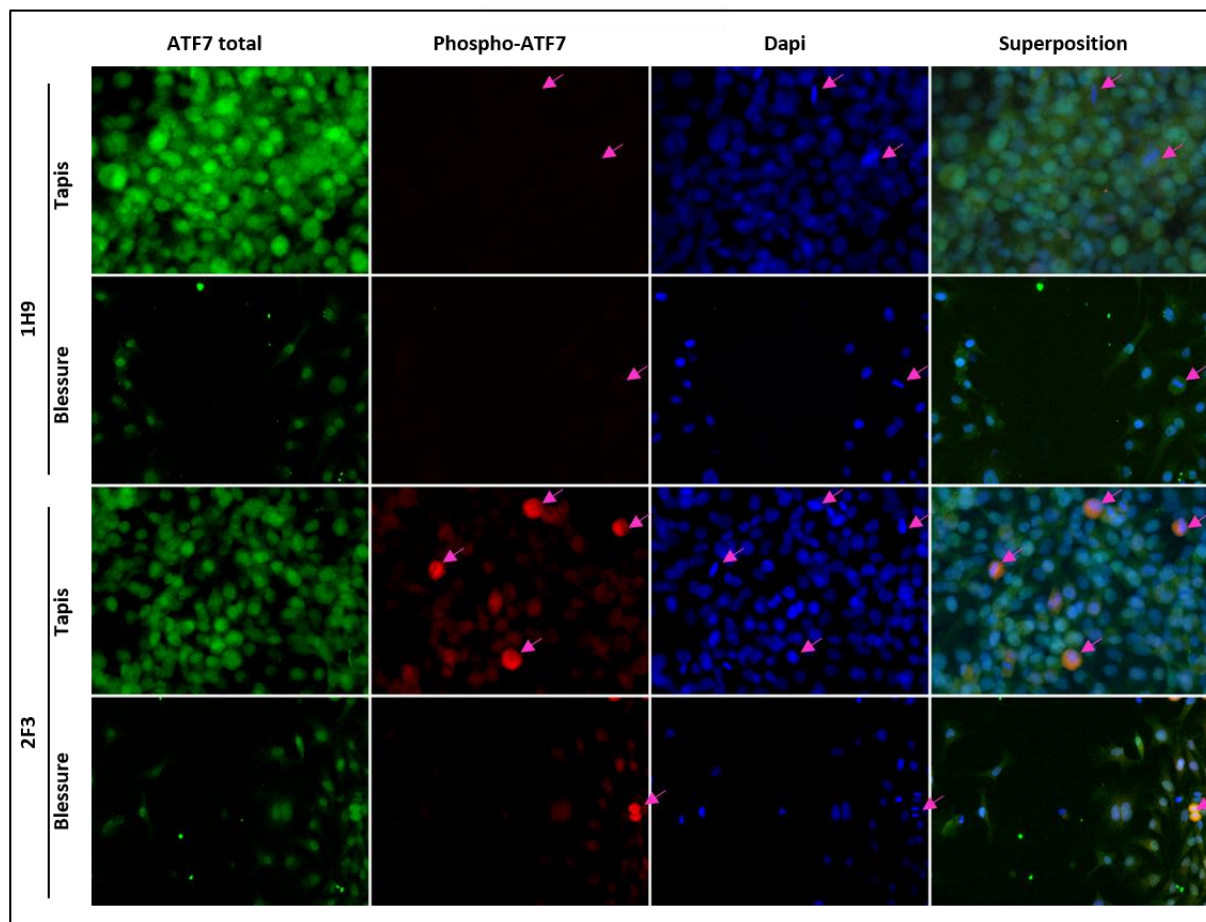


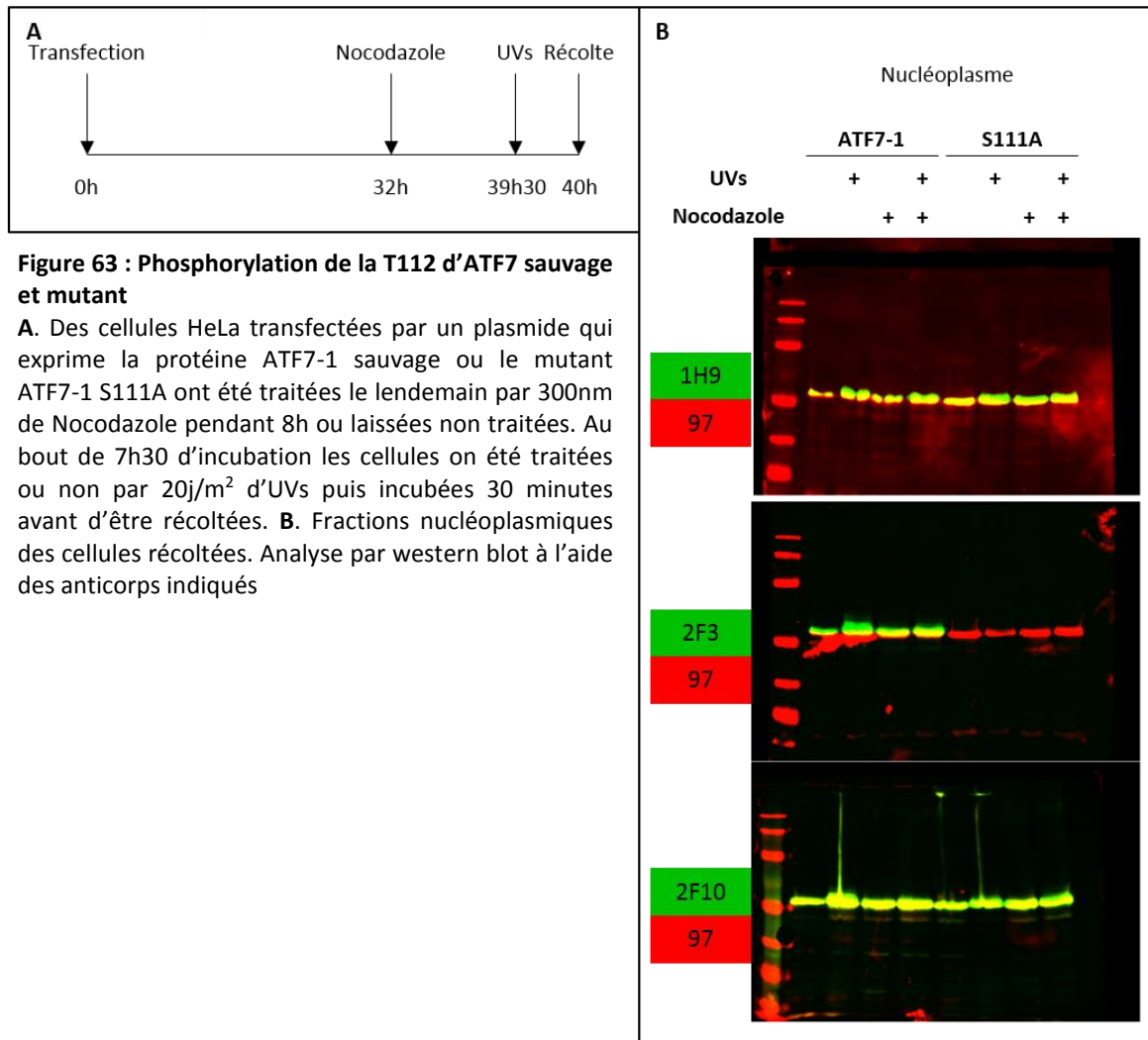
Figure 62 : Phosphorylation d'ATF7 pendant le phénomène de cicatrisation

Des expériences de cicatrisation ont été réalisées sur lames de type Labtek®, afin de pouvoir réaliser des immunofluorescences et d'observer le profil de phosphorylation de la protéine ATF7 au cours de ce phénomène. Pour cela les cellules de la lignée Mel ATF7 C2xx ont été déposées dans les puits de la lame et mises en culture jusqu'à atteindre une confluence de 90%. A ce stade, les blessures sont induites à l'aide d'un cône de pipette et les cellules rincées. Les lames ont été observées à 0, 24 et 48h après formation de la blessure. Lorsque la cicatrisation est avancée les cellules sont fixées et un immunomarquage à l'aide d'anticorps spécifiques des formes phosphorylées (1H9 qui reconnaît la forme phosphorylée sur les T51 et T53 et 2F3 qui reconnaît la forme phosphorylée sur la T112) est réalisé. Nous observons bien le phénomène de phosphorylation de la T112 dans les cellules mitotiques (flèches violettes) mais aucune phosphorylation spécifique au niveau des cicatrices.

3. La phosphorylation de la sérine 111 de la protéine ATF7

Le résidu sérine 111 (S111) d'ATF7 précède directement la T112 que nous savons modifiée par la CDK1 lors de la mitose. Des études de la phosphorylation des protéines par spectrométrie de masse à l'échelle du protéome ont décrit la S111 d'ATF7 phosphorylée pendant la phase M du cycle cellulaire (Olsen et al., 2006). Ne possédant pas d'anticorps dirigés contre la forme phosphorylée de ce résidu, je n'ai pu effectuer que des études indirectes mais qui apportent une précision importante. Des cellules HeLa ont été

transfectées avec un plasmide codant pour la protéine ATF7-1 ou pour la protéine ATF7-1 qui possède la S111 mutée en alanine (S111A). Les cellules ont été irradiées aux UVs, en présence et en absence de nocodazole, permettant l'accumulation de cellules mitotiques. Le profil de phosphorylation des résidus T51 T53 et T112 a été analysé à l'aide d'anticorps spécifiques (figure 63).



La phosphorylation des résidus T51 et T53 n'est pas perturbée par la mutation du résidu S111 contrairement au signal de phosphorylation de la T112 qui disparaît complètement en cas de mutation de la S111 en alanine.

Une hypothèse pragmatique pour expliquer ce résultat serait de penser que l'anticorps dirigé contre la T112 n'est pas capable de reconnaître la protéine ATF7 S111A même si la T112 reste phosphorylée. La seconde serait que dans la cellule, la S111 est partie

intégrante du site de phosphorylation et sa mutation empêche la kinase de phosphoryler la T112.

La première hypothèse peut être vérifiée simplement par des tests de reconnaissance de peptides par ELISA. Les résultats de la reconnaissance des peptides par l'anticorps 2F3 dirigé spécifiquement contre la protéine ATF7 phosphorylée au niveau de la T112 montrent clairement que le peptide non phosphorylé n'est pas reconnu contrairement au peptide phosphorylé sur la T112. Le peptide phosphorylé sur la T112 mais qui possède la S111 mutée en alanine est 50x moins reconnu. Le peptide phosphorylé sur les résidus S111 et T112 n'est que très faiblement reconnu.

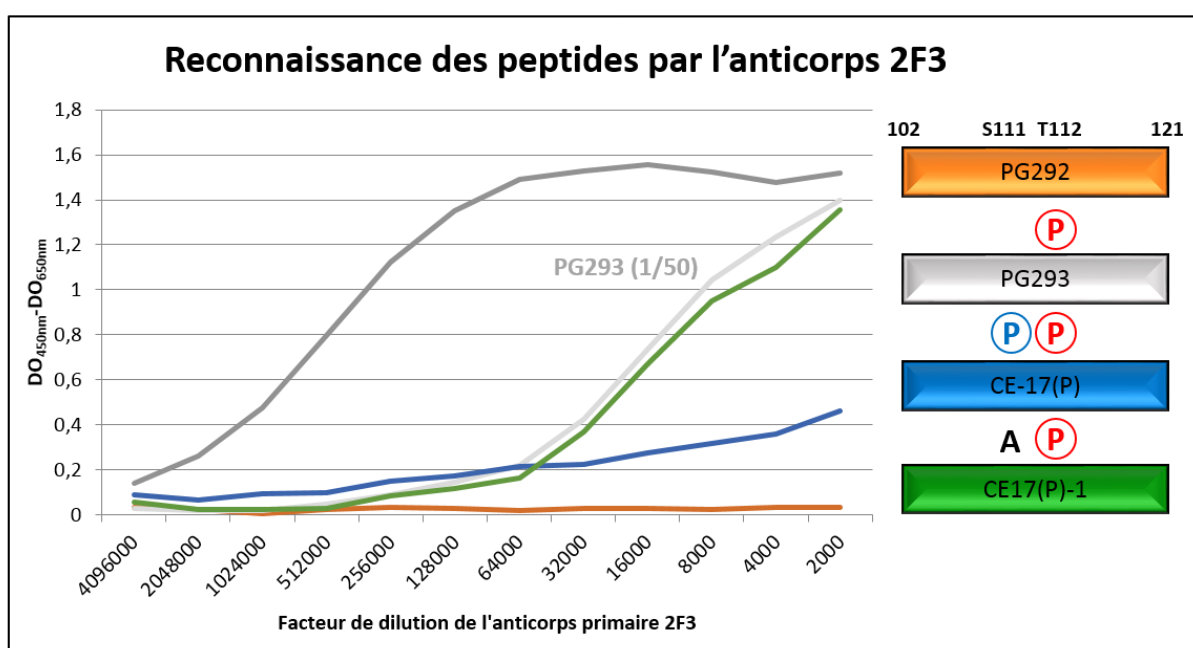


Figure 64 : Reconnaissance des peptides par l'anticorps 2F3

Test ELISA en utilisant l'anticorps 2F3 (dirigé contre le résidu T112 d'ATF7 phosphorylé) comme anticorps primaire. La courbe en gris clair a été réalisée dans les mêmes conditions sauf que l'anticorps primaire a été dilué 50x plus que dans les autres conditions.

Nous pouvons interpréter ces résultats en conjonction avec les précédents de deux manières différentes : i) La mutation S111A ne modifie en rien la phosphorylation de la T112 mais le fait que l'anticorps reconnaisse 50x moins bien cette forme ne lui permet pas de révéler la protéine par western blot. Néanmoins l'utilisation d'une concentration plus élevée d'anticorps n'a donné aucun signal. ii) Lorsque la S111 est mutée en alanine, la kinase responsable de la phosphorylation de la T112 n'est plus capable de reconnaître son substrat.

Par contre, une donnée intéressante peut être tirée de ces deux expériences : le résidu S111 d'ATF7 n'est pas phosphorylé lors de la mitose ou lors d'un stress cellulaire, sinon l'anticorps 2F3 ne donnerait aucun (ou qu'un très faible) signal sachant que la forme doublement phosphorylée n'est presque pas reconnue par l'anticorps.

DISCUSSION

1. Projet n°1 : le développement de nouveaux outils permettant l'étude de la sumoylation de la protéine ATF7.

A. La sumoylation de protéines :

Nous disposons maintenant d'un système fonctionnel de sumoylation de protéines « *in bacterio* ». Ce système optimisé permet d'étudier la sumoylation d'une protéine, de réaliser des tests de sumoylation ou encore de purifier une protéine sumoylée. Cependant le système possède des limites, par exemple les protéines capables de se lier aux cations métalliques divalents tels les ions Ni^{2+} peuvent contaminer les protéines sumoylées. C'est le cas de la protéine ATF7, et comme la protéine n'est pas totalement sumoylée, la fraction non sumoylée est co-purifiée et peut poser des problèmes pour des expériences qui nécessitent une protéine ultra pure. De telles protéines ne peuvent pas être utilisées pour réaliser des sélections par la méthode du phage display. Deux solutions pourront être utilisées à l'avenir pour contourner ce problème : i) Réaliser une seconde étape de purification par gel filtration afin d'éliminer la protéine non sumoylée ii) Modifier le plasmide qui permet l'expression de la protéine SUMO1 afin qu'il exprime la protéine en fusion avec une autre étiquette permettant la purification (un strep-tag par exemple). Effectivement le fait d'exprimer SUMO avec une étiquette 6HIS conduit à la contamination de protéine ATF7 libre lors de la purification car son motif en doigt à zinc permet l'attachement de la protéine. La protéine SUMO n'est pas conjuguée à 100% sur la protéine cible et peut ainsi contaminer la préparation. Il sera alors nécessaire de réaliser une seconde étape de purification.

Les expériences de sumoylation *in vitro* de la protéine ATF7 sont non concluantes. Le kit de sumoylation (Vaxron®) n'est pas fiable, d'autant plus que la quantité de protéine sumoylée pour le témoin positif est infime et ne permet en aucun cas de conduire à la production d'une quantité suffisante de protéine sumoylée pour réaliser des sélections par la méthode du phage display.

B. La sélection de scFv :

J'ai mis au point au laboratoire un protocole de sélections avec des antigènes présentés sur billes de Ni-NTA. Les sélections que j'ai réalisées m'ont permis d'obtenir une gamme de scFv dirigés contre les domaines (1-82) et (1-148) de la protéine ATF7 et contre la protéine SUMO1. J'ai également obtenu un scFv dirigé contre la forme d'ATF7 phosphorylée sur la T53. Bien que ce scFv n'a pas été exploité, il démontre la faisabilité de sélectionner des scFvs dirigés contre de petites modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation. De plus, il s'agit d'un scFv soluble et fonctionnel lorsqu'il est exprimé directement par la cellule lui donnant une caractéristique exploitable unique.

C. L'utilisation d'hélices chargées pour dimériser des scFv :

Au démarrage de ma thèse, ma problématique était d'obtenir des scFvs capables de reconnaître spécifiquement la protéine ATF7-SUMO. Les expériences de sumoylation s'étant avérées plus compliquées que prévu, je n'ai pas pu réaliser une sélection de scFv directement sur la protéine ATF7-SUMO purifiée. Cependant, ayant sélectionné des scFvs dirigés contre chacune des deux protéines, j'ai imaginé la stratégie de dimériser ces scFv afin de créer des scFvs-bispécifiques à la fois dirigés contre ATF7 et contre SUMO. Il fallait trouver une séquence d'acides aminés ayant plusieurs caractéristiques :

1. La plus courte possible pour limiter les problèmes de repliement de la protéine recombinante lors de l'expression dans les bactéries.
2. Permettant uniquement l'hétérodimérisation des protéines, sans formation d'homodimères.
3. Qui ne soit pas retrouvée chez l'Homme afin d'éviter tout problème d'interactions non spécifiques si elles étaient utilisées dans des cellules ou avec des extraits cellulaires.

Les hélices chargées désignées par Tripet et ses collaborateurs (Tripet et al., 1996; 1997) réunissaient tous ces critères. Ces hélices ont été créées pour servir de méthode de purification alternative. Cette équipe a synthétisé chimiquement une des deux hélices, et exprimé la seconde en fusion avec la protéine d'intérêt. Le principe de la méthode réside dans le fait que l'hélice synthétisée est chimiquement couplée à une résine sur laquelle on fait passer la protéine d'intérêt fusionnée à l'autre hélice (Tripet et al., 1996). Cette méthode

de purification n'est pas utilisée actuellement et ceci peut être facilement expliqué lorsque l'on tient compte des difficultés que j'ai eues à les exprimer ainsi qu'aux problèmes de solubilité auxquelles elles sont sujettes.

D. La formation de scFvs sous forme de tétramères :

Le domaine de tétramérisation de la protéine p53 (p53_{tet}) a été rapidement écarté des candidats dès le début du projet car deux caractéristiques l'éloignent de la molécule idéale. Tout d'abord, c'est une séquence retrouvée chez l'Homme et qui peut créer des interactions aspécifiques avec des protéines cellulaires. Deuxièmement, la formation de scFvs homotétramériques n'était pas mon but premier, même si l'augmentation de la valence est intéressante pour obtenir une bien plus forte avidité qui se traduit par une affinité apparente supérieure. En revanche, la mutation de ce domaine par Brokx et ses collaborateurs (Brokx, 2002) rend ce domaine bien plus intéressant pour mon travail car il est capable de former des hétérotétramères. Effectivement deux mutants ont été générés ; l'un forme uniquement des dimères alors que l'autre forme des dimères capables de s'assembler en hétérotétramères de faible affinité. Lorsque l'on met ces deux protéines en solution à quantité équimolaire, elles forment des hétérotétramères de forte affinité et aucune des deux mutantes n'est alors retrouvée sous forme de dimère. Ces mutants du domaine de p53_{tet} possèdent alors toutes les caractéristiques que je souhaite à l'exception du fait qu'ils dérivent d'une séquence existante chez l'Homme.

Lorsque ces domaines sont fusionnés à des scFvs, les protéines chimères s'expriment correctement et sont solubles. Les scFvs conservent leur fonctionnalité. J'ai donc été en mesure de générer des scFvs tétramères bispécifiques fonctionnels. Ces scFvs peuvent être utilisés sous forme d'homodimères ou sous forme de tétramères. Nous avons également la possibilité d'invertir les scFvs pour tester de nouvelles combinaisons. En plus du gain d'affinité important observé, j'ai créé un outil qui pourra être utilisé pour d'autres scFvs et ainsi servir à de nombreuses études.

Les scFvs utilisés proviennent d'une banque qui dérive du scFv 13R4 soluble et fonctionnel dans les cellules (il a été qualifié de « intrasolubody ») (Sibler *et al.*, 2003). Il serait extrêmement intéressant de tester par la suite si ces tétramères (ou les dimères)

formés à l'aides de ces domaines conservent cette capacité d'anticorps intracellulaires solubles et fonctionnels.

De plus le tétramère de scFv ainsi généré est le premier exemple d'anticorps recombinants bispécifiques qui reconnaisse à la fois une protéine et sa modification post traductionnelle. De nombreux anticorps dirigés contre des phosphorylations de protéines existent (anticorps phospho-spécifiques), mais ils sont bien plus rares lorsqu'il s'agit de modifications plus importantes (en taille) comme la sumoylation ou l'ubiquitylation. Combiner un des scFvs dirigé contre la protéine SUMO avec un scFv dirigé contre une protéine d'intérêt, cible de cette modification, permettrait l'étude de cette protéine. La méthode pourrait ainsi servir d'outil interchangeable pour l'étude des protéines sumoylées. Il pourrait alors être extrêmement intéressant de sélectionner un scFv dirigé contre l'ubiquitine car nous pourrions alors sur le même modèle créer un outil d'étude des protéines ubiquitylées. Le projet de développer de nouveaux outils dérivés de scFvs est un succès, la figure 65 rappelle les principaux avantages de ces nouveaux outils.

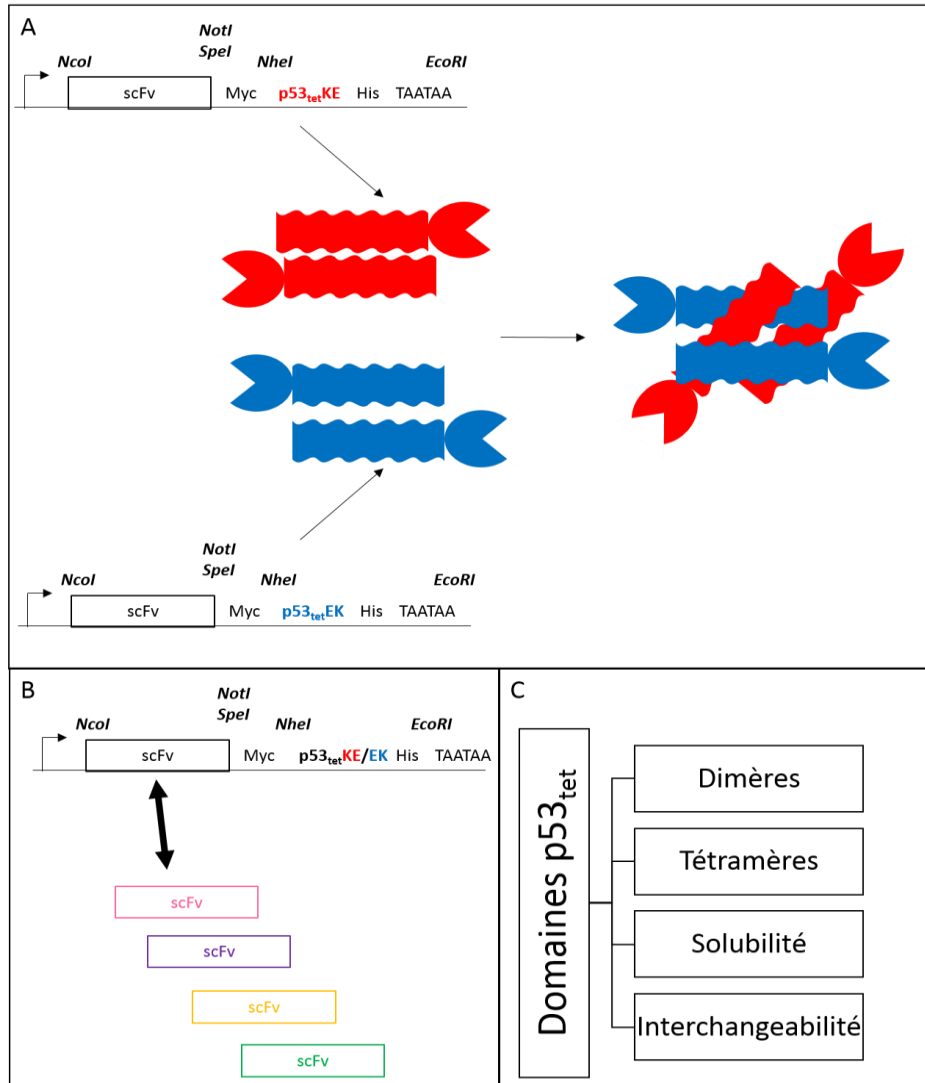


Figure 65 : Résumé du projet de développement de nouveaux outils.

A. Schéma de la région du plasmide qui permet d'exprimer les scFv en fusion avec les domaines de tétramérisation de la protéine p53 mutée. Les fusions scFv-p53_{tet} s'associent sous forme de dimères. Lorsqu'on met en contact les deux types de constructions, elles s'assemblent sous forme de tétramères de haute affinité. **B.** La puissance de l'outil généré réside dans son adaptabilité. Nous pouvons très facilement introduire d'autres scFvs dans les constructions pour générer de nouveaux dimères ou tétramères. Nous pouvons également générer des tétramères constitués du même scFv si nous le désirons, tout comme nous pouvons utiliser des tétramères bispécifiques comme je l'ai fait lors du développement des outils. **C.** Ces domaines p53_{tet} permettent donc de créer des homodimères (mono-spécifiques) de scFvs, des tétramères (mono ou bi-spécifiques). Ces constructions sont solubles et s'expriment correctement dans les bactéries et nous pouvons très facilement changer les scFv pour créer une molécule ayant une nouvelle fonction biologique.

2. Projet n°2 : L'étude de la relation de la protéine ATF7 avec le cycle cellulaire et des modifications post traductionnelles associées.

E. La phosphorylation de la T112 durant la mitose

La thréonine 112 (T112) de la protéine ATF7 est phosphorylée au cours de la phase M du cycle cellulaire. Cette phosphorylation apparaît en fin de prophase lorsque les chromosomes sont condensés. Elle perdure jusqu'en télophase où le signal relatif à cette phosphorylation s'estompe rapidement. L'anticorps monoclonal utilisé pour visualiser cette phosphorylation (nommé 2F3) reconnaît très spécifiquement cette forme d'ATF7 phosphorylée sur la T112. A la sortie de mitose, la protéine ATF7 n'est pas dégradée mais bien déphosphorylée. Ceci est confirmé car : i) nous voyons un signal en immunofluorescence et « western blot » pour la protéine ATF7 avec des anticorps non spécifiques de la forme phosphorylée. ii) l'expérience réalisée en présence de l'inhibiteur du protéasome MG132 conclut qu'il ne s'agit pas d'une dégradation (données non présentées dans ces travaux). Une autre expérience clé permet de conclure également que la T112 est déphosphorylée en sortie de mitose. Lors de l'analyse de la relation entre la phosphorylation de la S111 avec les T51, T53 et T112, on observe que l'anticorps 2F3 ne reconnaît que très faiblement le peptide phosphorylé sur les résidus S111 et T112. La perte de signal par l'anticorps 2F3 en sortie de mitose des cellules pourrait provenir d'une phosphorylation de la S111 et non d'une déphosphorylation de la T112. Or, nous avons clairement observé que la protéine ATF7 n'est plus phosphorylée (le retard de migration disparaît sur un western blot). Le fait que l'anticorps 2F3 ne reconnaisse pas le peptide phosphorylé sur les S111 et T112 indique également qu'en condition de stress, lorsque les T51, T53 et T112 sont phosphorylés, la S111 ne l'est pas sinon l'anticorps 2F3 ne donnerait aucun signal. Nous ne pouvons cependant pas conclure sur l'éventualité de la phosphorylation de la S111 dans d'autres conditions, suite à d'autres événements ou stimuli.

Ces études ont également permis de montrer que la phosphorylation de la T112 lors de la mitose dépend de la CDK1 et est inhibée par un inhibiteur des CDKs, la roscovitine. En revanche, des cellules traitées par ce même inhibiteur sont capables de phosphoryler la protéine ATF7 sur la T112 après un traitement par rayonnement UV ou par ajout de sorbitol

dans le milieu de culture. Ceci démontre que la voie de phosphorylation de la T112 lors de la mitose est indépendante de celle utilisée lors d'un stress cellulaire.

Lors de la mitose, nous observons très clairement que la protéine ATF7 est exclue de la chromatine par immunofluorescence et par fractionnement des extraits cellulaires en fractions solubles (cytoplasme et nucléoplasme) et insolubles (chromatine et matrice nucléaire). Cependant, des expériences de retardation de migration sur gel (EMSA) montrent qu'ATF7 provenant d'extraits de cellules bloquées en mitose est toujours capable de se fixer sur un oligo contenant le site de reconnaissance du facteur CREB. De plus, la protéine mutante T112A non phosphorylable, est également capable de se fixer à de l'ADN nu avec la même efficacité que la protéine sauvage. Ces résultats contradictoires s'expliqueraient par la condensation des chromosomes en mitose qui pourrait être le facteur primordial conduisant à l'exclusion chromatinienne de la protéine ATF7. L'hypothèse initiale était que la phosphorylation de la protéine ATF7 soit le signal permettant son relargage de la chromatine. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons également mené des expériences (que j'ai choisi de ne pas présenter dans cette thèse) où j'ai surexprimé soit la protéine ATF7 sauvage soit les protéines mutantes (T112A ou T112E) et procédé à des fractionnements d'extraits cellulaires solubles et insolubles. L'enjeu était de déterminer si nous pouvions observer une différence de localisation au niveau de la fraction chromatinienne entre la protéine non phosphorylable T112A et les protéines sauvage et mutante T112E. Le constat fût que la protéine ATF7 surexprimée est retrouvée en quantité égales au niveau de la chromatine que ce soit pour la protéine sauvage ou pour l'un des deux mutants (T112E ou T112A). D'autres expériences de ce type avec d'autres mutants de la protéine (T51A T53A, S111A, S111E, S108A, S108A S111A) ont présenté le même profil, n'apportant aucune réponse. Ces expériences montrent la limitation de la sur-expression de protéines dans les cellules de mammifères. La modification des résidus T51, T53, S111 et T112 au cours du cycle cellulaire et en fonction d'un stress est résumée dans la figure 66.

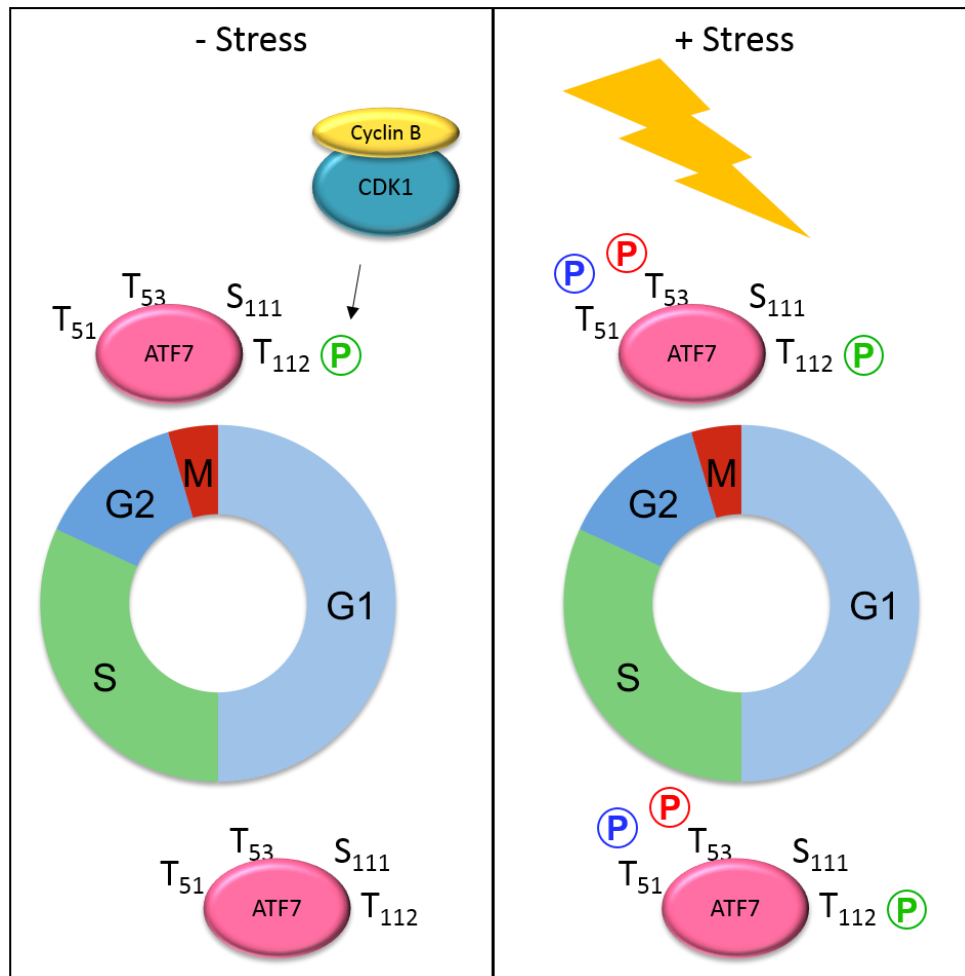


Figure 66 : La phosphorylation de la protéine ATF7 au cours du cycle cellulaire.

En absence de stress (**panel de gauche**) la T112 est phosphorylée uniquement au cours de la mitose alors que les résidus T51 et 53 ne sont pas phosphorylés. La sérine S111 ne semble pas être phosphorylée mais la question reste ouverte. Suite à un stress des cellules (**panel de droite**) par traitement aux UVs ou sorbitol, les résidus T51, 53 et 112 sont phosphorylés quel que soit le moment du cycle cellulaire. De plus le mécanisme de phosphorylation qui intervient dans la modification de la T112 est différent de celui mis en œuvre lors de la mitose en absence de stress.

F. La protéine ATF7 et la croissance des cellules

Le constat que la T112 était phosphorylée au cours du cycle cellulaire nous a amené à explorer non seulement le cycle cellulaire mais également la croissance des cellules.

J'ai pu démontrer que les cellules surexprimant la protéine ATF7 poussent plus vite en culture. La première question inhérente à cette observation était la dépendance de ce phénotype avec l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7. Le résidu T112 n'intervient que faiblement dans l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 et sa mutation en alanine ne réduit l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 que de 20% contrairement

aux T51 et 53 (Camuzeaux et al., 2008). Les expériences de croissance menées à l'aide des milieux conditionnés montrent que l'ajout de milieu de culture de cellules surexprimant la protéine ATF7, permet à des Mel501 de se diviser plus rapidement. Cependant, ces expériences ne répondent pas à la problématique de savoir ce qui déclenche cette croissance. Nous ne savons pas à l'heure actuelle, si l'effet est dû à l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 ou s'il est dû à une activation indirecte de la transcription, par activation ou répression d'un autre facteur. De plus, il pourrait également s'agir de l'inhibition de la transcription d'un facteur cytotatique. J'ai réalisé une expérience préliminaire (non présentée dans ces travaux) à l'aide de milieux compensés provenant de cultures de cellules surexprimant différents mutants de la protéine ATF7, mais il semblerait que toutes les formes de la protéine ATF7 permettent aux cellules de croître plus rapidement. Une étude plus fine devra être menée pour répondre à ces questions. Des expériences de RNAseq ont été menées au laboratoire sur des cellules Mel501 ainsi que des cellules Mel ATF7-1, Mel ATF7-2 et Mel ATF2 mais nous n'avons pas encore pu en tirer des conclusions.

G. Les mutants de la protéine ATF7-4 ont un avenir prometteur

Les travaux menés au laboratoire ont démontré que la protéine ATF7-4 est un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 (ainsi que son proche parent ATF2, (Diring et al., 2011). Cette petite protéine peut donc avoir un intérêt important lorsque l'on sait que la protéine ATF2 peut avoir une activité pro oncogénique dans le développement des mélanomes et qu'un peptide d'une séquence proche de la protéine ATF7-4 limite cet effet (Bhoumik et al., 2004). La protéine ATF7-4 est dégradée lors d'un stress des cellules ce qui permet l'activation des protéines ATF7 et ATF2, et réponse de la cellule au stress.

L'analyse de cette protéine montre que l'exon 4a spécifique de cette isoforme code pour une séquence protéique qui contient deux résidus lysines successifs. Les travaux du laboratoire avaient montré que la dégradation de la protéine ATF7-4 dépend de sa polyubiquitylation et de son adressage au protéasome (Diring et al., 2011). Mon hypothèse était qu'une de ces deux lysines (ou les deux) pourrait être responsable de la polyubiquitylation de la protéine ATF7-4. J'ai alors muté ces deux lysines

indépendamment, ou en combinaison, par des arginines. Ces mutants sont nettement plus stables que la protéine sauvage. Deux d'entre eux (constructions ATF7-4 RK et ATF7-4 RR) diminuent la phosphorylation de la protéine ATF7 même en cas de stress aux UVs et la construction ATF7-4 RR inhibe également l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 en condition de stress.

La protéine ATF7 induit une accélération de la croissance des cellules. La protéine ATF7-4 sauvage inhibe l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 en absence de stress et est dégradée lors d'un stress aux UV, permettant à ATF7 d'être activée. En revanche, la protéine ATF7-4 RR inhibe également l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 après un stress dû à un rayonnement UV. L'inhibition de l'activité de la protéine ATF7 par la protéine ATF7-4 (ou du mutant ATF7-4 RR) conduit à un allongement du temps de génération en comparaison avec des cellules Mel501 contrôle. Ainsi nous pouvons relier directement l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 avec le temps de génération des cellules en l'absence de stress.

Ce qu'il faut garder à l'esprit c'est que ce double mutant ATF7-4 RR, est bien plus stable et permet de conserver l'effet de l'inhibition de la phosphorylation et de l'activité transcriptionnelle de la protéine ATF7 après un stress cellulaire. La protéine ATF7-4 séquestre une protéine kinase dans le cytoplasme des cellules pour empêcher l'activation de la protéine ATF7 par phosphorylation. Le stress permet la phosphorylation, puis la dégradation de la protéine ATF7-4 (Diring et al., 2011). Ce double mutant permettra l'étude précise des protéines qui interagissent avec la protéine ATF7-4, et notamment la protéine kinase responsable de la phosphorylation de la T53 d'ATF7. Celle-ci pourra être identifiée par spectrométrie de masse.

[H. La migration et la résistance des cellules lorsqu'ATF7 est surexprimée](#)

Nous avons mis en évidence que la surexpression de la protéine ATF7, permet aux cellules de se diviser plus rapidement. La protéine ATF7 étant décrite comme une protéine de réponse au stress (Camuzeaux et al., 2008; De Graeve et al., 2000b; Hamard et al., 2005), deux questions importantes se posaient : i) les cellules sont-elles plus résistantes aux stress

lorsqu'elles surexpriment la protéine ATF7 ? ii) Les cellules sont-elles capables de migrer plus rapidement lors de tests de cicatrisation ?

Ces travaux démontrent que les cellules surexprimant la protéine ATF7 n'acquièrent aucune résistance supplémentaire face aux traitements par les UVs ou le sorbitol. Par contre les cellules surexprimant la protéine ATF7-1 semblent capables de refermer une cicatrice plus rapidement que les cellules contrôles, mais ces résultats devront être confirmés par d'autres manipulations comme par exemple des tests de migration dans des chambres de Boyden (BOYDEN, 1962).

I. Conclusions personnelles.

Les deux principaux projets menés de front ont été achevés avec succès et ont permis d'une part une meilleure compréhension de la protéine ATF7 et d'autre part de développer des outils qui sauront je l'espère servir dans la suite des études menées au laboratoire sur ATF7, mais aussi par d'autres équipes qui ont essayé de dimériser ces scFvs par d'autres méthodes. Ce travail m'a permis de me spécialiser dans la biologie moléculaire et dans la biologie cellulaire, mais m'a aussi permis de toucher à de nombreux domaines par sa variété et sa richesse. Des portes ont été ouvertes : d'où provient la croissance des cellules liée à la protéine ATF7 ? Quels sont les gènes impliqués ? L'effet est-il direct ou indirect ? Quelle est la protéine kinase séquestrée par la protéine ATF7-4 ? La thréonine 34 de la protéine est-elle déterminante dans la localisation subcellulaire de la protéine ATF7 ? Y-a-t-il un phénomène de repliement qui masque le NLS de la protéine ATF7 lorsque la T34 n'est pas phosphorylée ? J'espère que l'équipe pourra unir ses forces pour répondre à ces nombreuses questions qui restent ouvertes. Ces travaux m'ont aussi permis de me perfectionner dans un domaine que j'affectionne, qui est l'informatique et m'a surtout permis d'y donner goût à certains de mes collègues et j'espère que les petits plus qu'ils ont pu apprendre notamment pour l'étude des séquences et des images de microscopie leur servira longtemps encore.

REFERENCES

- Aleem, E., Kiyokawa, H., and Kaldis, P. (2005). Cdc2–cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol* 7, 831–836.
- Ali, A., Zhang, J., Bao, S., Liu, I., Otterness, D., Dean, N.M., Abraham, R.T., and Wang, X.-F. (2004). Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation. *Genes & Development* 18, 249–254.
- Bairoch, A., and Apweiler, R. (2000). The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res* 28, 45–48.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499–506.
- Banin, S. (1998). Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science* 281, 1674–1677.
- Barrière, C., Santamaría, D., Cerqueira, A., Galán, J., Martín, A., Ortega, S., Malumbres, M., Dubus, P., and Barbacid, M. (2007). Mice thrive without Cdk4 and Cdk2. *Molecular Oncology* 1, 72–83.
- Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 792–804.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280, 275–286.
- Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L., and Kaldis, P. (2003). Cdk2 Knockout Mice Are Viable. *Current Biology* 13, 1775–1785.
- Berthet, C., Klarmann, K.D., Hilton, M.B., Suh, H.C., Keller, J.R., Kiyokawa, H., and Kaldis, P. (2006). Combined Loss of Cdk2 and Cdk4 Results in Embryonic Lethality and Rb Hypophosphorylation. *Developmental Cell* 10, 563–573.
- Besson, A., Hwang, H.C., Cicero, S., Donovan, S.L., Gurian-West, M., Johnson, D., Clurman, B.E., Dyer, M.A., and Roberts, J.M. (2007). Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes & Development* 21, 1731–1746.
- Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., and Kerem, B. (2011). Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development. *Cell* 145, 435–446.
- Bhoomik, A., Fichtman, B., Derossi, C., Breitwieser, W., Kluger, H.M., Davis, S., Subtil, A., Meltzer, P., Krajewski, S., Jones, N., et al. (2008). Suppressor role of activating transcription

- factor 2 (ATF2) in skin cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 1674–1679.
- Bhoulmik, A., Gangi, L., and Ronai, Z. (2004). Inhibition of melanoma growth and metastasis by ATF2-derived peptides. *Cancer Res* 64, 8222–8230.
- Bhoulmik, A., Takahashi, S., Breitweiser, W., Shiloh, Y., Jones, N., and Ronai, Z. (2005). ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response. *Molecular Cell* 18, 577–587.
- Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M.C., Tassani, S., Piva, F., et al. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol* 40, 463–471.
- Bloom, J., and Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 149–160.
- Bohren, K.M. (2004). A M55V Polymorphism in a Novel SUMO Gene (SUMO-4) Differentially Activates Heat Shock Transcription Factors and Is Associated with Susceptibility to Type I Diabetes Mellitus. *J Biol Chem* 279, 27233–27238.
- Bossis, G., Malnou, C.E., Farràs, R., Andermarcher, E., Hipskind, R., Rodriguez, M., Schmidt, D., Muller, S., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M. (2005). Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol Cell Biol* 25, 6964–6979.
- Bouras, T. (2005). SIRT1 Deacetylation and Repression of p300 Involves Lysine Residues 1020/1024 within the Cell Cycle Regulatory Domain 1. *J Biol Chem* 280, 10264–10276.
- BOYDEN, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 115, 453–466.
- Brandeis, M., Rosewell, I., Carrington, M., Crompton, T., Jacobs, M.A., Kirk, J., Gannon, J., and Hunt, T. (1998). Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4344–4349.
- Brennan, K., Gonzalez-Sancho, J.M., Castelo-Soccio, L.A., Howe, L.R., and Brown, A.M. (2004). Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize β -catenin independently of Frizzled proteins. *Oncogene* 23, 4873–4884.
- Brox, R.D. (2002). A Stable Human p53 Heterotetramer Based on Constructive Charge Interactions within the Tetramerization Domain. *Journal of Biological Chemistry* 278, 2327–2332.
- Burgess, A.W., Cho, H.-S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P.J., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular Cell* 12, 541–552.
- Camuzeaux, B., Diring, J., Hamard, P.-J., Oulad-Abdelghani, M., Donzeau, M., Vigneron, M., Keding, C., and Chatton, B. (2008). p38 β -mediated phosphorylation and sumoylation of ATF7 are mutually exclusive. *J Mol Biol* 384, 980–991.

- Canman, C.E. (1998). Activation of the ATM Kinase by Ionizing Radiation and Phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677–1679.
- Carlson, M.E., Hsu, M., and Conboy, I.M. (2008). Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 454, 528–532.
- Carlson, S.M., and White, F.M. (2012). Labeling and Identification of Direct Kinase Substrates. *Science Signaling* 5, p13–p13.
- Chao, C., Herr, D., Chun, J., and Xu, Y. (2006). Ser18 and 23 phosphorylation is required for p53-dependent apoptosis and tumor suppression. *Embo J* 25, 2615–2622.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., and Boulton, S.J. (2012). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell* 47, 497–510.
- Chatton, B., Bocco, J.L., Gaire, M., Hauss, C., Reimund, B., Goetz, J., and Kedinger, C. (1993). Transcriptional activation by the adenovirus larger E1a product is mediated by members of the cellular transcription factor ATF family which can directly associate with E1a. *Mol Cell Biol* 13, 561–570.
- Chatton, B., Bocco, J.L., Goetz, J., Gaire, M., Lutz, Y., and Kedinger, C. (1994). Jun and Fos heterodimerize with ATF α , a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity. *Oncogene* 9, 375–385.
- Chen, C.-R., Kang, Y., Siegel, P.M., and Massagué, J. (2002). E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF β receptor to c-myc repression. *Cell* 110, 19–32.
- Chen, H.H., Wang, Y.C., and Fann, M.J. (2006). Identification and Characterization of the CDK12/Cyclin L1 Complex Involved in Alternative Splicing Regulation. *Mol Cell Biol* 26, 2736–2745.
- Chen, H.-H., Wong, Y.-H., Genevriere, A.-M., and Fann, M.-J. (2007). CDK13/CDC2L5 interacts with L-type cyclins and regulates alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 735–740.
- Cheng, T. (2000). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287, 1804–1808.
- Choudhury, A.R., Ju, Z., Djojotubroto, M.W., Schienke, A., Lechel, A., Schaetzlein, S., Jiang, H., Stepczynska, A., Wang, C., Buer, J., et al. (2006). Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet* 39, 99–105.
- Chuang, J.-Y., Wang, S.-A., Yang, W.-B., Yang, H.-C., Hung, C.-Y., Su, T.-P., Chang, W.-C., and Hung, J.-J. (2012). Sp1 phosphorylation by cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1 represses its DNA-binding activity during mitosis in cancer cells. *31*, 4946–4959.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell* 40, 179–204.

- Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 616–627.
- Citri, A., and Yarden, Y. (2006). EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 505–516.
- Cong, F. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the β -catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* 131, 5103–5115.
- Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867–872.
- De Graeve, F., Bahr, A., Chatton, B., and Keding, C. (2000a). A murine ATFa-associated factor with transcriptional repressing activity. *Oncogene* 19, 1807–1819.
- De Graeve, F., Bahr, A., Chatton, B., and Keding, C. (2000b). A murine ATFa-associated factor with transcriptional repressing activity. *Oncogene* 19, 1807–1819.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., Dijke, ten, P., Huet, S., and Gauthier, J.M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J* 17, 3091–3100.
- Deriano, L., Chaumeil, J., Coussens, M., Multani, A., Chou, Y., Alekseyenko, A.V., Chang, S., Skok, J.A., and Roth, D.B. (2011). The RAG2 C terminus suppresses genomic instability and lymphomagenesis. *Nature* 471, 119–123.
- Desterro, J.M.P. (1999). Identification of the Enzyme Required for Activation of the Small Ubiquitin-like Protein SUMO-1. *Journal of Biological Chemistry* 274, 10618–10624.
- Desterro, J.M.P., Thomson, J., and Hay, R.T. (1997). Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett* 417, 297–300.
- Difilippantonio, S., Celeste, A., Kruhlak, M.J., Lee, Y., Difilippantonio, M.J., Feigenbaum, L., Jackson, S.P., McKinnon, P.J., and Nussenzweig, A. (2007). Distinct domains in Nbs1 regulate irradiation-induced checkpoints and apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 204, 1003–1011.
- Dijke, ten, P., Miyazono, K., and Heldin, C.H. (2000). Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci* 25, 64–70.
- Dikstein, R., Zhou, S., and Tjian, R. (1996). Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130. *Cell* 87, 137–146.
- Diring, J., Camuzeaux, B., Donzeau, M., Vigneron, M., Rosa-Calatrava, M., Keding, C., and Chatton, B. (2011). A cytoplasmic negative regulator isoform of ATF7 impairs ATF7 and ATF2 phosphorylation and transcriptional activity. *PLoS ONE* 6, e23351.
- Ehebauer, M., Hayward, P., and Martinez-Arias, A. (2006). Notch Signaling Pathway.

Science's STKE 2006, cm7–cm7.

Engel, K., Sasaki, T., Wang, Q., and Kuriyan, J. (2013). A highly efficient peptide substrate for EGFR activates the kinase by inducing aggregation. *Biochem. J.* 453, 337–344.

Enslin, H. (1998). Selective Activation of p38 Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Isoforms by the MAP Kinase Kinases MKK3 and MKK6. *Journal of Biological Chemistry* 273, 1741–1748.

Esufali, S., and Bapat, B. (2004). Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of β -catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation. *Oncogene* 23, 8260–8271.

Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389–396.

Falck, J., Petrini, J.H.J., Williams, B.R., Lukas, J., and Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 30, 290–294.

Fasano, C.A., Dimos, J.T., Ivanova, N.B., Lowry, N., Lemischka, I.R., and Temple, S. (2007). shRNA Knockdown of Bmi-1 Reveals a Critical Role for p21-Rb Pathway in NSC Self-Renewal during Development. *Cell Stem Cell* 1, 87–99.

Feng, X.H., Lin, X., and Derynck, R. (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *Embo J* 19, 5178–5193.

Firestein, R., Bass, A.J., Kim, S.Y., Dunn, I.F., Silver, S.J., Guney, I., Freed, E., Ligon, A.H., Vena, N., Ogino, S., et al. (2008). CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates β -catenin activity. *Nature* 455, 547–551.

Fisher, R.P. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *Journal of Cell Science* 118, 5171–5180.

Foster, S.S., De, S., Johnson, L.K., Petrini, J.H.J., and Stracker, T.H. (2012). Cell cycle- and DNA repair pathway-specific effects of apoptosis on tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 9953–9958.

Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Ohkuma, Y., Chiba, T., Saya, H., and Nakao, M. (2003). MCAF mediates MBD1-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 23, 2834–2843.

Gaire, M., Chatton, B., and Kedinger, C. (1990). Isolation and characterization of two novel, closely related ATF cDNA clones from HeLa cells. *Nucleic Acids Res* 18, 3467–3473.

Gangloff, Y.G., Werten, S., Romier, C., Carré, L., Poch, O., Moras, D., and Davidson, I. (2000). The human TFIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form histone-like pairs. *Mol Cell Biol* 20, 340–351.

Garcia-Dominguez, M., and Reyes, J.C. (2009). *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Gene*

Regulatory Mechanisms *1789*, 451–459.

Geng, Y., Whoriskey, W., Park, M.Y., Bronson, R.T., Medema, R.H., Li, T., Weinberg, R.A., and Sicinski, P. (1999). Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell* *97*, 767–777.

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J.E., Bhattacharya, S., Rideout, W.M., Bronson, R.T., Gardner, H., and Sicinski, P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* *114*, 431–443.

Goetz, J., Chatton, B., Mattei, M.G., and Keding, C. (1996). Structure and expression of the ATFa gene. *J Biol Chem* *271*, 29589–29598.

Gong, Q., Huang, Z., and Wicks, W.D. (1995). Interaction of retinoblastoma gene product with transcription factors ATFa and ATF2. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *319*, 445–450.

Goodarzi, A.A., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M., and Jeggo, P.A. (2008). ATM Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin. *Molecular Cell* *31*, 167–177.

Gregoire, S. (2006). Control of MEF2 Transcriptional Activity by Coordinated Phosphorylation and Sumoylation. *J Biol Chem* *281*, 4423–4433.

Guo, D., Li, M., Zhang, Y., Yang, P., Eckenrode, S., Hopkins, D., Zheng, W., Purohit, S., Podolsky, R.H., Muir, A., et al. (2004). A functional variant of SUMO4, a new I κ B α modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* *36*, 837–841.

Hamard, P.-J., Boyer-Guittaut, M., Camuzeaux, B., Dujardin, D., Hauss, C., Oelgeschläger, T., Vigneron, M., Keding, C., and Chatton, B. (2007). Sumoylation delays the ATF7 transcription factor subcellular localization and inhibits its transcriptional activity. *Nucleic Acids Res* *35*, 1134–1144.

Hamard, P.-J., Dalbès-Tran, R., Hauss, C., Davidson, I., Keding, C., and Chatton, B. (2005). A functional interaction between ATF7 and TAF12 that is modulated by TAF4. *Oncogene* *24*, 3472–3483.

Hampsey, M., and Kinzy, T.G. (2007). Synchronicity: policing multiple aspects of gene expression by Ctk1. *Genes & Development* *21*, 1288–1291.

Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* *265*, 808–811.

Han, J., Lee, J.D., Tobias, P.S., and Ulevitch, R.J. (1993). Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem* *268*, 25009–25014.

Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* *98*, 859–869.

Hartwell, L.H., Culotti, J., and Reid, B. (1970). Genetic control of the cell-division cycle in

- yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* *66*, 352–359.
- He, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: Arrows point the way. *Development* *131*, 1663–1677.
- Holmen, S.L., Robertson, S.A., Zylstra, C.R., and Williams, B.O. (2005). Wnt-independent activation of β -catenin mediated by a Dkk1-Fz5 fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun* *328*, 533–539.
- Homer, H.A. (2005). Mad2 is required for inhibiting securin and cyclin B degradation following spindle depolymerisation in meiosis I mouse oocytes. *Reproduction* *130*, 829–843.
- Hu, D., Valentine, M., Kidd, V.J., and Lahti, J.M. (2007). CDK11p58 is required for the maintenance of sister chromatid cohesion. *Journal of Cell Science* *120*, 2424–2434.
- Huang, D., Friesen, H., and Andrews, B. (2007). Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol Microbiol* *66*, 303–314.
- Ichimura, T., Watanabe, S., Sakamoto, Y., Aoto, T., Fujita, N., and Nakao, M. (2005). Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. *J Biol Chem* *280*, 13928–13935.
- Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., and Wang, H. (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* *22*, 5834–5847.
- Ishida, W. (2000). Smad6 Is a Smad1/5-induced Smad Inhibitor. CHARACTERIZATION OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-RESPONSIVE ELEMENT IN THE MOUSE Smad6 PROMOTER. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 6075–6079.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *461*, 1071–1078.
- Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H.E., Saito, Y., Waring, M.T., Dombkowski, D.M., Cheng, T., DePinho, R.A., Sharpless, N.E., and Scadden, D.T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*.
- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* *376*, 313–320.
- Jirawatnotai, S. (2004). Cdk4 Is Indispensable for Postnatal Proliferation of the Anterior Pituitary. *J Biol Chem* *279*, 51100–51106.
- Johnson, E.S., and Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *The Journal of Cell Biology* *147*, 981–994.
- Johnson, E.S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 355–382.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A., Powers, S.E., and Wotton, D. (2005). Multiple activities contribute to Pc2 E3 function. *Embo J* *24*, 108–119.

- Kamitani, T. (1998). Characterization of a Second Member of the Sentrin Family of Ubiquitin-like Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 273, 11349–11353.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316–323.
- Kaszubska, W., Hooft van Huijsduijnen, R., Ghersa, P., DeRaemy-Schenk, A.M., Chen, B.P., (null), DeLamarter, J.F., and Whelan, J. (1993). Cyclic AMP-independent ATF family members interact with NF-kappa B and function in the activation of the E-selectin promoter in response to cytokines. *Mol Cell Biol* 13, 7180–7190.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E., and Sherr, C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes & Development* 7, 331–342.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Kippin, T.E. (2005). p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes & Development* 19, 756–767.
- Kitagawa, R. (2004). Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes & Development* 18, 1423–1438.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2002). PIAS Proteins Modulate Transcription Factors by Functioning as SUMO-1 Ligases. *Mol Cell Biol* 22, 5222–5234.
- Kozar, K., Ciemerych, M.A., Rebel, V.I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R.T., et al. (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118, 477–491.
- Kozlov, S.V., Graham, M.E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P.J., and Lavin, M.F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *Embo J* 25, 3504–3514.
- Krishnamurthy, J., Ramsey, M.R., Ligon, K.L., Torrice, C., Koh, A., Bonner-Weir, S., and Sharpless, N.E. (2006). p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 443, 453–457.
- Lapenta, V., Chiurazzi, P., van der Spek, P., Pizzuti, A., Hanaoka, F., and Brahe, C. (1997). SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics* 40, 362–366.
- Larochelle, S., Merrick, K.A., Terret, M.-E., Wohlbold, L., Barboza, N.M., Zhang, C., Shokat, K.M., Jallepalli, P.V., and Fisher, R.P. (2007). Requirements for Cdk7 in the Assembly of Cdk1/Cyclin B and Activation of Cdk2 Revealed by Chemical Genetics in Human Cells. *Molecular Cell* 25, 839–850.
- Lee, M.H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes & Development* 9, 639–649.

- Li, T., Inoue, A., Lahti, J.M., and Kidd, V.J. (2004). Failure To Proliferate and Mitotic Arrest of CDK11p110/p58-Null Mutant Mice at the Blastocyst Stage of Embryonic Cell Development. *Mol Cell Biol* 24, 3188–3197.
- Li, X.Y., and Green, M.R. (1996). Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes & Development* 10, 517–527.
- Lin, D. (2002). Identification of a Substrate Recognition Site on Ubc9. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21740–21748.
- Liu, F., and Green, M.R. (1990). A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1a protein. *Cell* 61, 1217–1224.
- Liu, G., Bafico, A., and Aaronson, S.A. (2005). The Mechanism of Endogenous Receptor Activation Functionally Distinguishes Prototype Canonical and Noncanonical Wnts. *Mol Cell Biol* 25, 3475–3482.
- Liu, J., Zhang, C., Hu, W., and Feng, Z. (2014). Cancer Letters. *Cancer Letters* 1–7.
- Liu, L., Ishihara, K., Ichimura, T., Fujita, N., Hino, S., Tomita, S., Watanabe, S., Saitoh, N., Ito, T., and Nakao, M. (2009). MCAF1/AM is involved in Sp1-mediated maintenance of cancer-associated telomerase activity. *J Biol Chem* 284, 5165–5174.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810.
- LOYER, P., TREMBLEY, J., KATONA, R., KIDD, V., and LAHTI, J. (2005). Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cellular Signalling* 17, 1033–1051.
- MacDonald, B.T., Semenov, M.V., and He, X. (2007). SnapShot: Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cell* 131, 1204.e1–1204.e2.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell* 17, 9–26.
- Macůrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., and Medema, R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 455, 119–123.
- Maekawa, T., Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Sudo, T., Yoshimura, T., Fujisawa, J., Yoshida, M., and Ishii, S. (1989). Leucine zipper structure of the protein CRE-BP1 binding to the cyclic AMP response element in brain. *Embo J* 8, 2023–2028.
- Maekawa, T., Kim, S., Nakai, D., Makino, C., Takagi, T., Ogura, H., Yamada, K., Chatton, B., and Ishii, S. (2010). Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. *Embo J* 29, 196–208.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 222–231.

- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* *30*, 630–641.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* *9*, 153–166.
- Malumbres, M., Pevarello, P., Barbacid, M., and Bischoff, J.R. (2008). CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends in Pharmacological Sciences* *29*, 16–21.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaría, D., Galán, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., and Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* *118*, 493–504.
- Mannen, H., Tseng, H.M., Cho, C.L., and Li, S.S. (1996). Cloning and expression of human homolog HSMT3 to yeast SMT3 suppressor of MIF2 mutations in a centromere protein gene. *Biochem Biophys Res Commun* *222*, 178–180.
- Manning, G. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* *298*, 1912–1934.
- Manning, G. (2005). Genomic overview of protein kinases. *WormBook*.
- Martín, J., Hunt, S.L., Dubus, P., Sotillo, R., Néhmé-Pélluard, F., Magnuson, M.A., Parlow, A.F., Malumbres, M., Ortega, S., and Barbacid, M. (2003). Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic β -cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* *22*, 5261–5269.
- Masquillier, D., and Sassone-Corsi, P. (1992). Transcriptional cross-talk: nuclear factors CREM and CREB bind to AP-1 sites and inhibit activation by Jun. *J Biol Chem* *267*, 22460–22466.
- Massague, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 169–178.
- Massagué, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* *432*, 298–306.
- Matsuda, S., Maekawa, T., and Ishii, S. (1991). Identification of the functional domains of the transcriptional regulator CRE-BP1. *J Biol Chem* *266*, 18188–18193.
- Matunis, M.J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology* *135*, 1457–1470.
- McKinnon, P.J. (2012). ATM and the Molecular Pathogenesis of Ataxia Telangiectasia. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *7*, 303–321.
- Mettus, R.V., and Rane, S.G. (2003). Characterization of the abnormal pancreatic development, reduced growth and infertility in Cdk4 mutant mice. *Oncogene* *22*, 8413–8421.
- Miller, M. (2009). The importance of being flexible: the case of basic region leucine zipper transcriptional regulators. *Curr. Protein Pept. Sci.* *10*, 244–269.

- Milo, R., Jorgensen, P., Moran, U., Weber, G., and Springer, M. (2009). BioNumbers--the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic Acids Res* *38*, D750–D753.
- Molofsky, A.V., Slutsky, S.G., Joseph, N.M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N.E., and Morrison, S.J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* *443*, 448–452.
- Morris, E.J., Ji, J.-Y., Yang, F., Di Stefano, L., Herr, A., Moon, N.-S., Kwon, E.-J., Haigis, K.M., Näär, A.M., and Dyson, N.J. (2008). E2F1 represses β -catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature* *455*, 552–556.
- Nagadoi, A., Nakazawa, K., Uda, H., Okuno, K., Maekawa, T., Ishii, S., and Nishimura, Y. (1999). Solution structure of the transactivation domain of ATF-2 comprising a zinc finger-like subdomain and a flexible subdomain. *J Mol Biol* *287*, 593–607.
- Nebreda, Á.R. (2006). CDK activation by non-cyclin proteins. *Current Opinion in Cell Biology* *18*, 192–198.
- Newman, S.P., Bates, N.P., Vernimmen, D., Parker, M.G., and Hurst, H.C. (2000). Cofactor competition between the ligand-bound oestrogen receptor and an intron 1 enhancer leads to oestrogen repression of ERBB2 expression in breast cancer. *Oncogene* *19*, 490–497.
- Nomura, N., Zu, Y.L., Maekawa, T., Tabata, S., Akiyama, T., and Ishii, S. (1993). Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *J Biol Chem* *268*, 4259–4266.
- Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin of Chromosomal Translocations in Lymphoid Cancer. *Cell* *141*, 27–38.
- Nørregaard Jensen, O. (2004). Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology* *8*, 33–41.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* *127*, 635–648.
- Ono, K., and Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cellular Signalling* *12*, 1–13.
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martín, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J.L., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* *35*, 25–31.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Lukas, J., Baldin, V., Ansorge, W., Bartek, J., and Draetta, G. (1993). Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* *121*, 101–111.
- Patterson, G.I., and Padgett, R.W. (2000). TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet* *16*, 27–33.

- Pechnick, R.N., Zonis, S., Wawrowsky, K., Pourmorady, J., and Chesnokova, V. (2008). p21Cip1 restricts neuronal proliferation in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 1358–1363.
- Pei, X.H., Bai, F., Smith, M.D., and Xiong, Y. (2007). p18Ink4c Collaborates with Men1 to Constrain Lung Stem Cell Expansion and Suppress Non-Small-Cell Lung Cancers. *Cancer Res* *67*, 3162–3170.
- Peifer, M., Pai, L.M., and Casey, M. (1994). Phosphorylation of the *Drosophila* adherens junction protein Armadillo: roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase. *Dev Biol* *166*, 543–556.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A., and Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* *108*, 109–120.
- Pietersma, A., Tilly, B.C., Gaestel, M., de Jong, N., Lee, J.C., Koster, J.F., and Sluiter, W. (1997). p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* *230*, 44–48.
- Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* *26*, 3100–3112.
- Rane, S.G., Cosenza, S.C., Mettus, R.V., and Reddy, E.P. (2002). Germ Line Transmission of the Cdk4R24C Mutation Facilitates Tumorigenesis and Escape from Cellular Senescence. *Mol Cell Biol* *22*, 644–656.
- Ren, S., and Rollins, B.J. (2004). Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* *117*, 239–251.
- Rodriguez, M.S. (2000). SUMO-1 Conjugation in Vivo Requires Both a Consensus Modification Motif and Nuclear Targeting. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 12654–12659.
- Rosu-Myles, M., Taylor, B.J., and Wolff, L. (2007). Loss of the tumor suppressor p15Ink4b enhances myeloid progenitor formation from common myeloid progenitors. *Experimental Hematology* *35*, 394–406.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A.R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* *78*, 1027–1037.
- Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *68*, 320–344.
- Saitoh, H. (2000). Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 6252–6258.
- Sampson, D.A. (2001). The Small Ubiquitin-like Modifier-1 (SUMO-1) Consensus Sequence

- Mediates Ubc9 Binding and Is Essential for SUMO-1 Modification. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 21664–21669.
- Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Caceres, J.F., Dubus, P., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* *448*, 811–815.
- Sasaki, M., Lange, J., and Keeney, S. (2010). Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* *3*, 400–408.
- Seong, K.-H., Maekawa, T., and Ishii, S. (2012). Inheritance and memory of stress-induced epigenome change: roles played by the ATF-2 family of transcription factors. *Genes to Cells no–no*.
- Shenhar, G., and Kassir, Y. (2001). A Positive Regulator of Mitosis, Sok2, Functions as a Negative Regulator of Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *21*, 1603–1612.
- Shilo, B.Z. (2005). Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time. *Development* *132*, 4017–4027.
- Shivers, R.P., Pagano, D.J., Kooistra, T., Richardson, C.E., Reddy, K.C., Whitney, J.K., Kamanzi, O., Matsumoto, K., Hisamoto, N., and Kim, D.H. (2010). Phosphorylation of the conserved transcription factor ATF-7 by PMK-1 p38 MAPK regulates innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* *6*, e1000892.
- Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., and Kastan, M.B. (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes & Development* *11*, 3471–3481.
- Stracker, T.H. (2013). The ATM signaling network in development and disease. 1–19.
- Stracker, T.H., and Petrini, J.H.J. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 90–103.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., and Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci USA* *102*, 13182–13187.
- Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrappetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstine, J.R., and Price, B.D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat Cell Biol* *11*, 1376–1382.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., and He, X. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular Cell* *13*, 149–156.
- Thornton, T.M., and Rincon, M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle

checkpoints and survival. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 44–51.

Tolwinski, N.S., Wehrli, M., Rives, A., Erdeniz, N., DiNardo, S., and Wieschaus, E. (2003). Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity. *Developmental Cell* 4, 407–418.

Trinh, A.T., Kim, S.H., Chang, H.Y., Mastrocola, A.S., and Tibbetts, R.S. (2013). Cyclin-dependent Kinase 1-dependent Phosphorylation of cAMP Response Element-binding Protein Decreases Chromatin Occupancy. *J Biol Chem* 288, 23765–23775.

Tripet, B., Yu, L., Bautista, D.L., Wong, W.Y., Irvin, R.T., and Hodges, R.S. (1996). Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Eng* 9, 1029–1042.

Tripet, B., Yu, L., Bautista, D.L., Wong, W.Y., Irvin, R.T., and Hodges, R.S. (1997). Engineering a de novo designed coiled-coil heterodimerization domain for the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Eng* 10, 299.

Tsantoulis, P.K., Kotsinas, A., Sfrikakis, P.P., Evangelou, K., Sideridou, M., Levy, B., Mo, L., Kittas, C., Wu, X.-R., Papavassiliou, A.G., et al. (2007). Oncogene-induced replication stress preferentially targets common fragile sites in preneoplastic lesions. A genome-wide study. *Oncogene* 27, 3256–3264.

Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., and Wrana, J.L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95, 779–791.

Tsutsui, T., Hesabi, B., Moons, D.S., Pandolfi, P.P., Hansel, K.S., Koff, A., and Kiyokawa, H. (1999). Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Mol Cell Biol* 19, 7011–7019.

Uchimura, Y., Ichimura, T., Uwada, J., Tachibana, T., Sugahara, S., Nakao, M., and Saitoh, H. (2006). Involvement of SUMO modification in MBD1- and MCAF1-mediated heterochromatin formation. *J Biol Chem* 281, 23180–23190.

Uchimura, Y., Nakao, M., and Saitoh, H. (2004). Generation of SUMO-1 modified proteins in *E. coli*: towards understanding the biochemistry/structural biology of the SUMO-1 pathway. *FEBS Lett* 564, 85–90.

Van Damme, E., Laukens, K., Dang, T.H., and Van Ostade, X. (2010). A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int. J. Biol. Sci.* 6, 51–67.

van den Heuvel, S., and Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262, 2050–2054.

van Vugt, M.A.T.M., Bras, A., and Medema, R.H. (2005). Restarting the Cell Cycle When the Checkpoint Comes to a Halt. *Cancer Res* 65, 7037–7040.

van Vugt, M.A.T.M., Brás, A., and Medema, R.H. (2004). Polo-like kinase-1 controls recovery

- from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Molecular Cell* *15*, 799–811.
- Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* *4*, 137–142.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* *36*, 131–149.
- Vinson, C., Myakishev, M., Acharya, A., Mir, A.A., Moll, J.R., and Bonovich, M. (2002). Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol* *22*, 6321–6335.
- Wagner, E.F., and Nebreda, Á.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. 1–13.
- Walkley, C.R., Fero, M.L., Chien, W.-M., Purton, L.E., and McArthur, G.A. (2005). Negative cell-cycle regulators cooperatively control self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* *7*, 172–178.
- Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., Tempst, P., Roeder, R.G., and Zhang, Y. (2003). mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Molecular Cell* *12*, 475–487.
- Wang, X.S. (1997). Molecular Cloning and Characterization of a Novel p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 23668–23674.
- Watts, F.Z. (2006). Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks. *DNA Repair* *5*, 399–403.
- Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., and DiNardo, S. (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* *407*, 527–530.
- Welstead, G.G., Brambrink, T., and Jaenisch, R. (2008). Generating iPS Cells from MEFS through Forced Expression of Sox-2, Oct-4, c-Myc, and Klf4. *JoVE*.
- Wilker, E.W., van Vugt, M.A.T.M., Artim, S.A., Huang, P.H., Petersen, C.P., Reinhardt, H.C., Feng, Y., Sharp, P.A., Sonenberg, N., White, F.M., et al. (2007). 14-3-3 σ controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. *Nature* *446*, 329–332.
- Xu, Z., and Au, S.W.N. (2005). Mapping residues of SUMO precursors essential in differential maturation by SUMO-specific protease, SENP1. *Biochem. J.* *386*, 325–330.
- Yagi, K. (1999). Alternatively Spliced Variant of Smad2 Lacking Exon 3. COMPARISON WITH WILD-TYPE Smad2 AND Smad3. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 703–709.
- Yang, Y., and Zhang, C.-Y. (2012). Sensitive Detection of Intracellular Sumoylation via SNAP-mediated Translation and RNA Polymerase-based Amplification. *Anal. Chem.* 120113051843009.

- Ye, X., Zhu, C., and Harper, J.W. (2001). A premature-termination mutation in the *Mus musculus* cyclin-dependent kinase 3 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* *98*, 1682–1686.
- Yeh, E.T.H. (2008). SUMOylation and De-SUMOylation: Wrestling with Life's Processes. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 8223–8227.
- Yeh, E.T., Gong, L., and Kamitani, T. (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* *248*, 1–14.
- Yingling, J.M., Datto, M.B., Wong, C., Frederick, J.P., Liberati, N.T., and Wang, X.F. (1997). Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol* *17*, 7019–7028.
- Yokoyama, H., Gruss, O.J., Rybina, S., Caudron, M., Schelder, M., Wilm, M., Mattaj, I.W., and Karsenti, E. (2008). Cdk11 is a RanGTP-dependent microtubule stabilization factor that regulates spindle assembly rate. *The Journal of Cell Biology* *180*, 867–875.
- Yu, H. (2005). Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18INK4C and p21Cip1/Waf1 in opposite manners. *Blood* *107*, 1200–1206.
- Yuan, Y., Shen, H., Franklin, D.S., Scadden, D.T., and Cheng, T. (2004). In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol* *6*, 436–442.
- Zarubin, T., and Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* *15*, 11–18.
- Zawel, L., Dai, J.L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Kern, S.E. (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Molecular Cell* *1*, 611–617.
- Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., et al. (2007). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* *135*, 367–375.
- Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., and He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* *438*, 873–877.
- Zhang, J., Cicero, S.A., Wang, L., Romito-Digiaco, R.R., Yang, Y., and Herrup, K. (2008). Nuclear localization of Cdk5 is a key determinant in the postmitotic state of neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 8772–8777.
- Zhou, B. (2002). The Activity of the Extracellular Signal-regulated Kinase 2 Is Regulated by Differential Phosphorylation in the Activation Loop. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 13889–13899.
- Zhu, C., Mills, K.D., Ferguson, D.O., Lee, C., Manis, J., Fleming, J., Gao, Y., Morton, C.C., and Alt, F.W. (2002). Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene

amplification subsequent to translocations. *Cell* 109, 811–821.

(2014a). yang 2006.

(2014b). gunther 2000.

ANNEXES

1. La thréonine 34 de la protéine ATF7

Le résidu T34 de la protéine ATF7 possède un homologue chez la protéine ATF2 (T52) qui a été décrit comme phosphorylé par la protéine kinase C epsilon. Cette phosphorylation permet la translocation nucléaire de la protéine ATF2. La séquence de cette région au sein des protéines ATF7 et ATF2 sont identiques, nous avons décidé de vérifier le rôle de la T34 chez la protéine ATF7 par similitude. Pour cela j'ai construit des mutants de la protéine ATF7 qui possèdent une thréonine 34 mutée en alanine (T34A) et un mutant T34E qui possède un acide glutamique à la place de la T34. Nous possédons aussi au laboratoire un mutant M33D et L35S qui avait été utilisé par d'anciennes études sur l'interaction d'ATF7 avec TAF12. J'ai transfecté transitoirement des cellules HeLa avec des plasmides qui permettent d'exprimer la protéine ATF7 sauvage ainsi que ces 3 mutants et ai réalisé des expériences d'immunofluorescence afin d'analyser la localisation cellulaire de la protéine ATF7. Le mutant T34E est utilisé car il a été montré dans certaines circonstances que la substitution d'un acide aminé phosphorylable par un acide glutamique peut conduire à un effet de phosphomimétisme, c'est-à-dire que la protéine mutante agit comme la protéine sauvage phosphorylée. La figure 67 nous montre le que la protéine ATF7 sauvage est localisée dans le noyau des cellules alors que les mutants T34A et M33D-L35S sont localisés dans le cytoplasme des cellules. Le mutant T34E est plus controversé car certaines cellules présentent une localisation nucléaire d'ATF7 à l'instar de la protéine sauvage alors que d'autres, une localisation diffuse dans le cytoplasme également (figure 67).

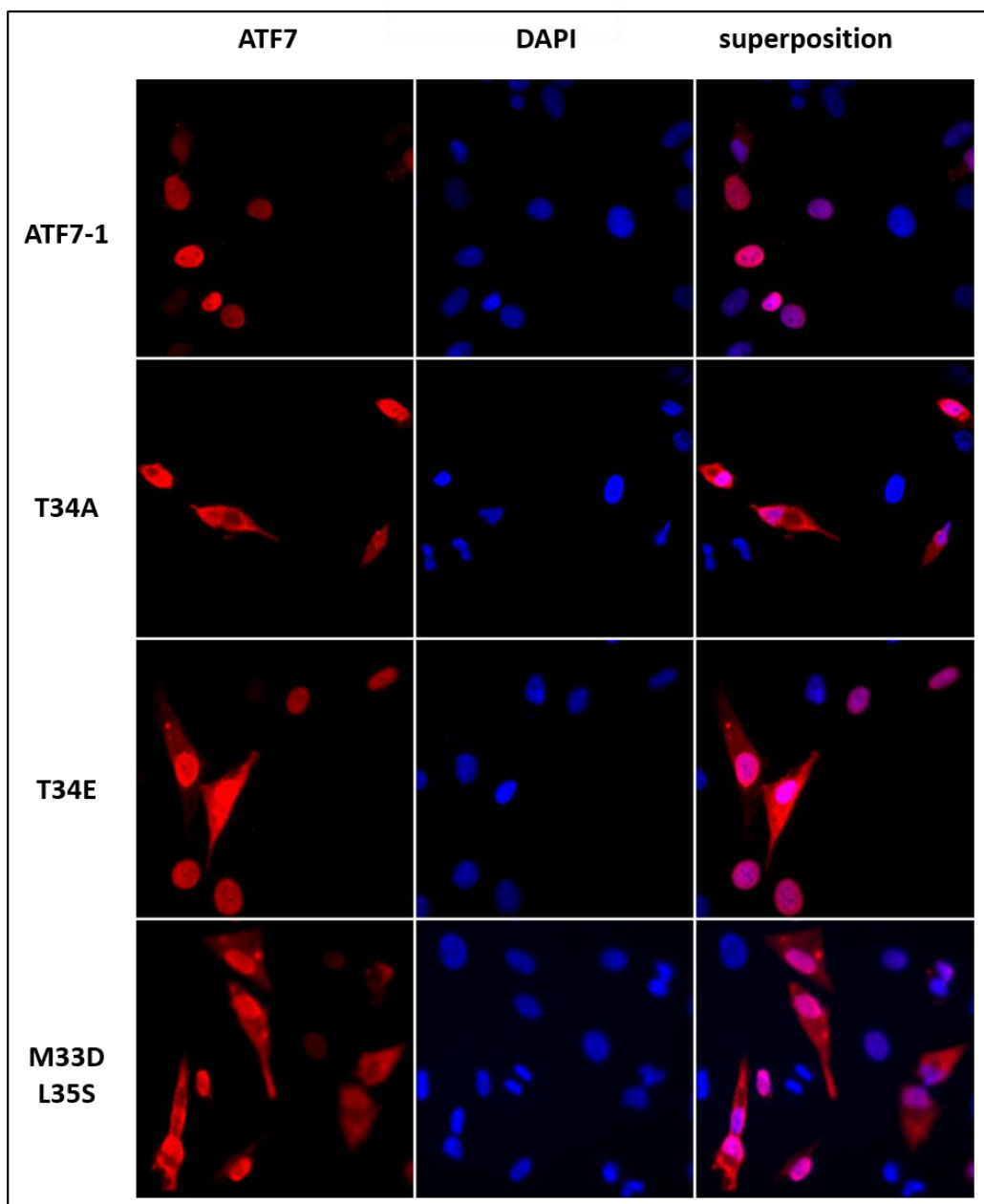
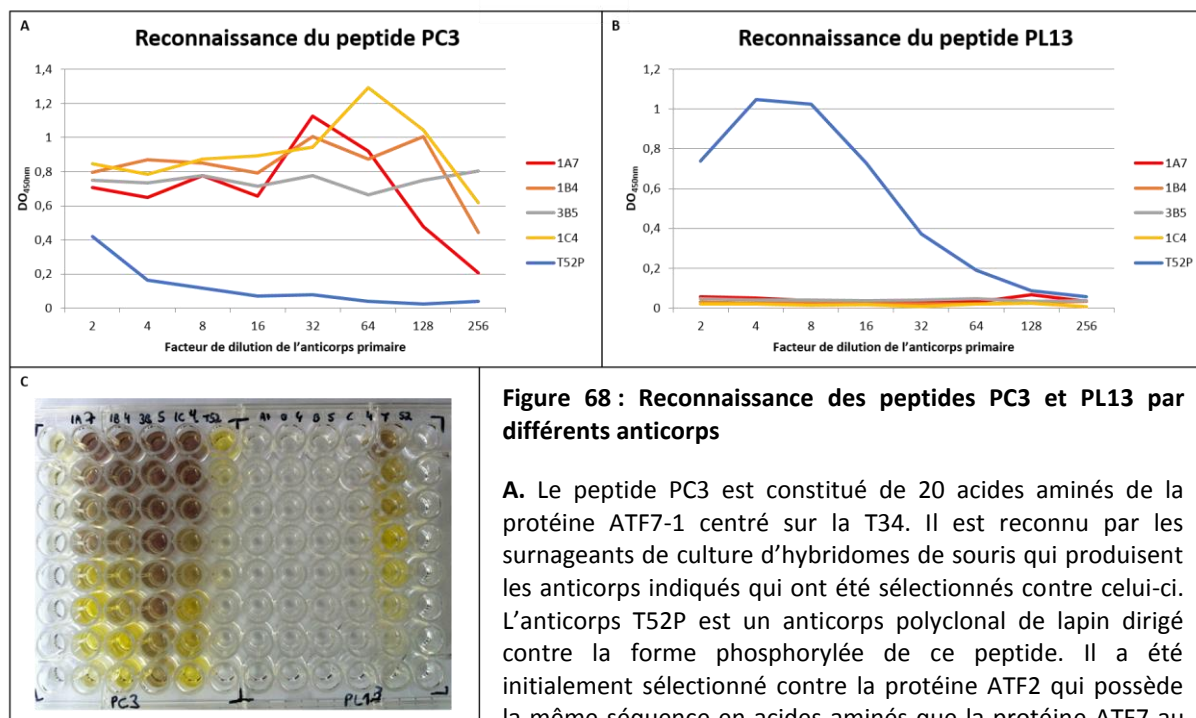


Figure 67 : Localisation subcellulaire de la protéine ATF7 et des mutants de la région T34.

Un plasmide codant pour la protéine ATF7-1 sauvage, la protéine ATF7-1 qui possède la T34 mutée en alanine ou acide glutamique ainsi que la protéine ATF7-1 dont la M33 est mutée en acide aspartique et la L35 en sérine ont été transfectés dans des cellules HeLa. 36h après transfections les cellules sont fixées et des expériences d'immunomarquage sont réalisées à l'aide de l'anticorps monoclonal 2F10 qui reconnaît le domaine Cter de la protéine ATF7. Nous pouvons observer que la protéine ATF7-1 sauvage est nucléaire. La protéine ATF7-1 T34A semble bien plus exclue du noyau tout comme la protéine ATF7-1 M33D L35S dont le site de reconnaissance de la kinase est détruit. La protéine ATF7-1 T34E a été désignée pour mimiquer la phosphorylation. Nous nous attendions alors, si la mimique fonctionne à retrouver 100% de la protéine dans le noyau des cellules, mais le résultat est plus surprenant. Certaines cellules présentent une localisation nucléaire pure alors que d'autres une localisation plus cytoplasmique.

Suite à ces résultats, nous avons commandé des anticorps dirigés spécifiquement contre la T34 non phosphorylée. J'ai testé leur spécificité par ELISA et nous pouvons

remarquer qu'ils ne reconnaissent pas les peptides phosphorylés, mais uniquement la forme non phosphorylée contrairement à l'anticorps polyclonal T52P qui reconnaît la forme phosphorylée de la T52 d'ATF2 (figure 68). C'est l'anticorps utilisé dans l'étude qui a montré que la phosphorylation de cette thréonine est nécessaire à la localisation nucléaire de la protéine ATF2, mais l'anticorps reconnaît aussi (plus faiblement) la protéine non phosphorylée.



B. Le peptide PL13 possède la même séquence que le PC3 mais est phosphorylé au niveau de la T34. Il n'est reconnu que par l'anticorps T52P dirigé contre cette forme phosphorylée. Le signal étant très fort et saturé le graphe de la densité optique ne forme pas une courbe typique. **C.** La photo de la plaque d'ELISA nous permet d'observer ces signaux marrons qui correspondent aux puits où le signal est fortement saturé dû à une forte reconnaissance de l'anticorps. Effectivement, comme les anticorps proviennent de surnageants de culture d'hybridomes leur quantité estimée est faible est je voulais m'assurer d'observer un signal.

J'ai ensuite réalisé des transductions de ces anticorps qui ont été purifiés dans les cellules HeLa et observé la localisation subcellulaire de la protéine ATF7 après 24, 48 et 72h mais ce ne sont que des résultats préliminaires et ne seront pas présentés lors de ce travail de thèse. Des études de localisation de la protéine ATF7 en présence d'inhibiteurs de la PKC epsilon sont menées au laboratoire par d'autres membres de l'équipe mais les résultats ne sont pas encore aboutis pour être discutés.

Conclusion : La phosphorylation de la T34 a-t-elle un rôle dans sa localisation nucléaire ?

Les résultats concernant la T34 de la protéine ATF7 semblent plus controversées qu'elles ne le sont pour la T52 de la protéine ATF2. Mes travaux ne permettent pas à l'heure actuelle de confirmer de manière forte que la localisation subcellulaire dépend de la phosphorylation de la T34. Effectivement, même si le mutant MTL ainsi que le mutant T34A sont plutôt cytoplasmiques, le mutant T34E peut présenter une localisation nucléaire ou cytoplasmique selon les cellules. De plus nous avons poursuivi ces études à l'aides d'anticorps qui reconnaissent la T34 non phosphorylées mais les résultats ne semblent pas concluants pour le moment.

2. Validation des anticorps dirigés contre la forme non phosphorylée de la T112.

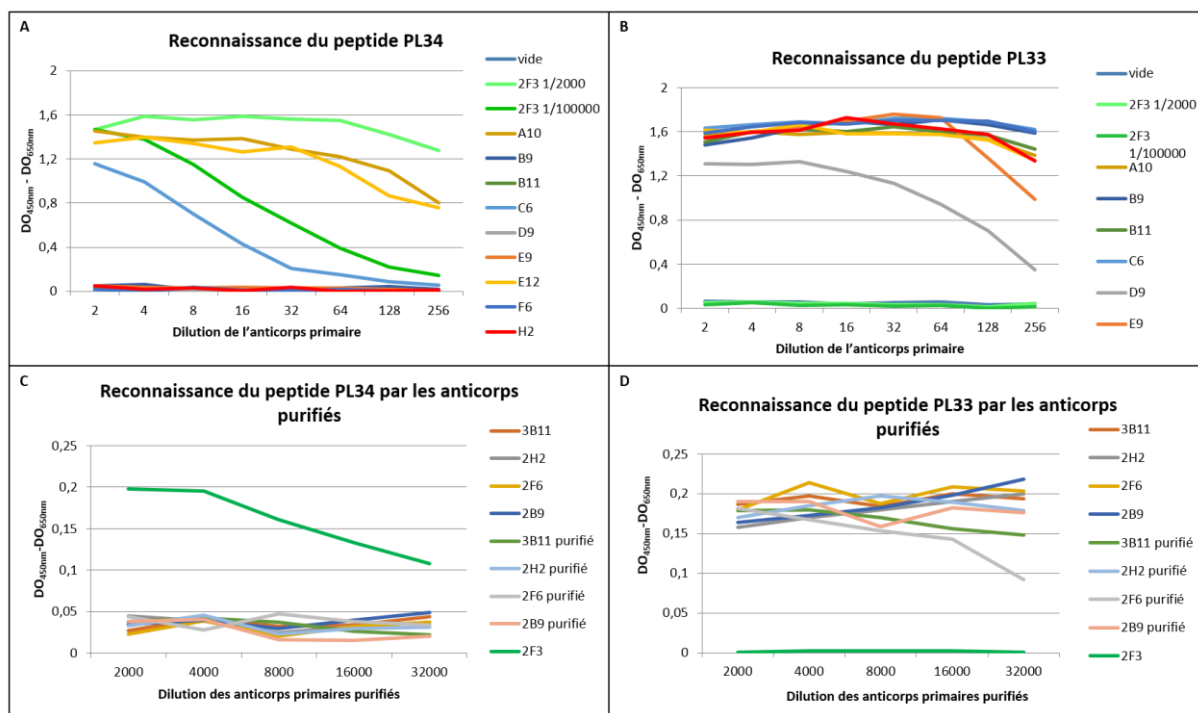


Figure 69 : Validation des anticorps dirigés contre la forme non phosphorylée de la T112

A. Et B. Les anticorps sélectionnés contre le peptide PL33 de 20 acides aminés de la protéine ATF7-1 centré sur la T112 ont été analysés par ELISA contre ce peptide PL33 mais aussi contre le peptide PL34 de même séquence mais phosphorylé sur la T112. Nous remarquons que tous les anticorps reconnaissent le peptide cible PL33 à l'exception de l'anticorps 2F3 qui est lui dirigé contre la forme phosphorylée de la T112. Cependant certains de ces anticorps reconnaissent également le peptide PL34 phosphorylé, ils ne pourront donc pas être utilisés pour reconnaître spécifiquement la T112 non phosphorylée. Les anticorps spécifiques de la forme non phosphorylée ont été purifiés sur billes protéine G-Sépharose et leur activité a été à nouveau testée en comparaison aux anticorps non purifiés. **C. et D.** Pour comparer les anticorps non purifiés et les anticorps purifiés par ELISA, j'ai dilué 50x plus les anticorps purifiés car c'est le facteur par lequel ils ont été concentrés lors de l'étape de purification. Nous pouvons observer que les anticorps purifiés n'ont pas perdu en activité et qu'ils sont toujours spécifiques de la forme non phosphorylée.

Etudes des modifications post-traductionnelle de la protéine

ATF7

1. La phosphorylation de la T112 au cours de la mitose

Selective inhibition of CDK1-dependent ATF7 phosphorylation during mitosis with a neutralizing monoclonal antibody in living cells.

Etienne Schaeffer ¹, Marc Vigneron ¹ Annie-Paule Sibling ¹, Mustapha Oulad-Abdelhani ², Bruno Chatton^{1*} and Mariel Donzeau ^{1*}.

¹ Université de Strasbourg, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, BP10413, 67412 Illkirch Cedex, France

¹ IGBMC, 67412 Illkirch Cedex, France

Keywords: ATF7/Phosphorylation/Cell-cycle/Mitosis/intrabody

*Corresponding authors: bchatton@unistra.fr, donzeau@unistra.fr

Tel.: (33) 368-854-787

Fax: (33) 368-854-770

Introduction

Activating transcription factor 7 (ATF7) subfamily belongs to the ATF/cAMP response element-binding protein family, and is composed of at least three variants (ATF7-1, ATF7-2 and ATF7-4) translated from alternatively spliced messengers transcribed from a single gene (Diring et al., 2011; Goetz et al., 1996). Although ATF7-2 differs from ATF7-1 by an additional 21 residues in the N-terminal domain, their transcriptional activities are undistinguishable (Hamard et al., 2005). In contrast, ATF7-4 isoform is a C-terminally truncated variant of ATF7, which down regulates transcriptional activity of both ATF7 and ATF2 (Diring et al., 2011).

ATF7-1 and ATF7-2 share significant structural and functional homologies with ATF2 (Gaire et al., 1990). Especially, the N-terminal activation domain and the C-terminal DNA binding/dimerization domain are highly conserved (De Graeve et al., 2000). ATF7 activation domain is comprised of a critical zinc-binding element and two threonine residues, Thr51 and Thr53 related to Thr69 and Thr71 in ATF2 (Chatton et al., 1993; 1994). Phosphorylation events on both Thr51 and Thr53 are linked to the transcriptional activity of ATF7 (De Graeve et al., 1999). Indeed, point mutations of these two threonine residues into alanine residues impair the direct interaction between ATF7 and TAF12, a subunit of TFIID complex, and subsequently abolish ATF7-dependent transcriptional activation (Hamard et al., 2005). Furthermore, phosphorylation of ATF7 on the Thr51 by the p38 β 2 kinase,

potentiates its interaction with TAF12 (Camuzeaux et al., 2008).

Two other amino acids residues (Lys118 and Thr112) missing in ATF2, are also post-translationally modified. The Lys118 residue is targeted by Small Ubiquitin-like Modifier proteins (SUMO) (Hamard et al., 2007). SUMOylation of ATF7 on the Lys118 delays its nuclear entry and therefore, inhibits ATF7 transcriptional activity by perturbing its interaction with TAF12 (Hamard et al., 2007). The Thr112 is modified by phosphorylation, however as opposed to Thr51 and Thr53, point mutation of Thr112 into alanine has little impact on ATF7-transcriptional activity (De Graeve et al., 1999), suggesting another function than potentiating ATF7 transcriptional activity.

Recent works using mass spectrometry experiments have shown that phosphorylation of ATF7 undergoes cell cycle regulated changes (Dephoure et al., 2008; Olsen et al., 2010). Cell division is a complex process tightly regulated by several protein kinases, which trigger cell progression throughout the different stages of the cell cycle (Malumbres and Barbacid, 2005). The key regulators of this process are the cyclin-dependent kinases (CDKs) and their associated cyclin proteins (Malumbres, 2011; Malumbres and Barbacid, 2005). CDKs activate or inactivate target proteins by phosphorylation to regulate crucial protein functions in eukaryotic cells (Rizkallah et al., 2011; Walsh et al., 2005; Whitmarsh and Davis, 2000). For instance, entry into mitosis is characterized by a wave of phosphorylation events leading to a temporal interruption of the transcriptional activity (Dovat et al., 2002; Gottesfeld and Forbes, 1997; John and Workman, 1998; Rizkallah et al., 2011).

Phosphorylation of specific transcription factors leads to their displacement from the condensed chromosomes, which correlates in some cases to reduce DNA binding activity *in vitro* (Martínez-Balbás et al., 1995; Muchardt et al., 1996; Rizkallah and Hurt, 2009).

In the present study, we demonstrate that phosphorylation of the residue Thr112 is cell cycle regulated and peaks during mitosis. The Thr112 phosphorylated form of ATF7 is excluded from the condensed chromosomes. Furthermore, we show that this phosphorylation event is dependent of the cyclin-dependent kinases *in cellulo*. In agreement with these results, active CDK1/cyclin B1 complex but not CDK2/cyclin A1 complex, is able to directly phosphorylate ATF7 on the Thr112 in an *in vitro* kinase assay. We generated a site-specific monoclonal antibody that binds specifically to the unphosphorylated Thr112 form of ATF7. Using a recent delivery technology of monoclonal antibodies in living cells (Freund et al., 2013), we show that this transduced mAb binds to its intracellular ATF7 target epitope and blocks specifically its CDK-dependent phosphorylation on the Thr112 in mitotic cells in a natural environment. Although it has not effect on ATF7 eviction from the condensed chromatin, these results demonstrate the benefits of mAbs interfering with a well define post-translational modification in living cells without perturbing the function of other modified form of the target protein.

UV induced ATF7 phosphorylation on two threonine residues.

In a previous work, we had investigated the phosphorylation pattern of the endogenous ATF7 transcription factor in Raji cells, a human lymphoid cell line where ATF7 is naturally abundant compared to other cell lines (Camuzeaux et al., 2008). We showed that cells exposed to ultraviolet (UV) radiations, ATF7 proteins had a reduced electrophoretic mobility compared to ATF7 proteins from unexposed cells. This mobility shift correlated with the phosphorylation of ATF7 on three distinct threonine residues, Thr51, Thr53 and Thr112. However, the detection of the endogenous phosphorylated species of ATF7 was not possible prior immunoprecipitation (Camuzeaux et al., 2008).

Therefore, we generated a stable cell line over-expressing ATF7. Because transcriptional activities and localization of ATF7-1 and ATF7-2 isoforms are undistinguishable, we decided to express tagged HA-ATF7-1 isoform (Hamard et al., 2005). After several rounds of selection, stably transfected clones were selected in HeLa cells and designated herein as HeLa-ATF7. We assessed the subcellular localization of tagged ATF7-1 by immuno-fluorescence assay using an anti-HA monoclonal antibody. HA-ATF7-1 was predominantly localized in the nucleus as observed in parental cell lines (Fig. 1A). Subsequently, HA-ATF7-1 protein expression was monitored by Western-Blot analysis and quantified using the Odyssey^R software. The level of HA-ATF7-1 was estimated to be a least 10-fold higher in HeLa-ATF7 than the endogenous protein (Fig. 1B). We next tested whether

ATF7-1 expressed from stable cell line responded to UV radiations to the same extent than the endogenous protein. Immune-protein complexes from HeLa cells and total cell extracts from HeLa-ATF7 cells were analyzed by Western-Blotting using the phosphospecific monoclonal antibodies, pThr53 and pThr112, and an ATF7 mAb recognizing all forms of ATF7 (Fig. 1C). As shown in figure 1C, while Thr53 and Thr112 were slightly phosphorylated in unexposed cells, UV radiation led to a strong phosphorylation on all three threonine residues (Fig. 1C). These phosphorylation events resulted in a reduced electrophoretic mobility of ATF7 as observed with the anti-ATF7 mAb (Fig. 1C). These results demonstrate that the phosphorylation pattern induced by UV radiations of tagged ATF7-1 is similar to the pattern observed for the endogenous ATF7 protein.

Since ATF7-1 expressed from the stable cell line has the same cellular localization and the same activation pattern than the endogenous protein, HeLa-ATF7 stable cell line was used to further investigate the phosphorylation events on the Thr112, and HA-ATF7-1 was referred to ATF7.

Thr112 phosphorylation peaks during the G2/M phase.

While phosphorylation events on both Thr51 and Thr53 have been positively correlated to ATF7 transcriptional activity likewise the phosphorylation events on Thr69 and Thr71 of ATF2, the physiological relevance of the Thr112 phosphorylation remains unknown (De Graeve et al., 1999; Hamard et al., 2005).

Recent phospho-proteome screenings have revealed a large number of proteins whose phosphorylation levels fluctuate during the cell cycle (Dephoure et al., 2008; Olsen et al., 2010). Among them, ATF7 has been characterized.

In order to determine whether ATF7 is regulated during cell cycle progression, we examined the level of expression and the phosphorylation patterns of ATF7 in synchronized cultures of HeLa-ATF7 cells. Cells were arrested in G₁/S phases by double thymidine block, and then thymidine was removed to allow synchronous progression through the cell cycle. At different times following thymidine removal, cells were exposed or not to UV radiation. Protein extracts were prepared and analyzed by immuno-blotting using specific monoclonal antibodies (Fig. 2A). Cell cycle distribution following release was determined by flow cytometry (Fig. 2B).

ATF7 expression level was almost constant during the whole cell cycle (Fig. 2A). UV radiations induced shifted bands due to phosphorylation events on Thr53 and Thr112 residues at all stages of the cell cycle following drug withdrawal (Fig. 2A). But in unexposed cells, Thr112 phosphorylation occurred transiently between 6 hours and 10 hours after drug removal, with a peak at 8 hours while more than 90% of the cells were in G₂/M phases (Fig. 2A). Thereafter, phosphorylation on the Thr112 residue rapidly declined as cells entered G₁ phase. In contrast, Thr53 phosphorylation was not induced in unexposed cells. Thus, Thr112 residue is phosphorylated during G₂/M phases, whereas UV radiations induced a strong phosphorylation on both threonine residues whatever the cell cycle stage, pointing out a cell cycle-independent regulated pathway.

Phosphorylated ATF7 (pThr112) is excluded from the condensed chromosomes at mitosis.

In order to define the particular mitotic state wherein the Thr112 phosphorylation event occurs, we performed immunofluorescence assays. Asynchronous HeLa and Mel501 cells were fixed for immuno-staining using either Thr112 or Thr53 phospho-specific mAbs, and an anti-ATF7 polyclonal antibody. The physical appearance of the DNA stained using propidium iodide was used to determine the specific stages of mitosis (Mitchison and Salmon, 2001; Pines and Rieder, 2001). The Thr112 phosphorylation was exclusively observed in mitotic cells (Fig. 3A) in both HeLa and Mel501 cell lines indicating that this phosphorylation event is not cell type specific. In contrast, no staining could be observed with pThr53 mAb (Fig. 3A). The Thr112 phosphorylation was detectable in prophase and maintained until anaphase (Fig. 3B). As cells entered telophase, ATF7 protein re-localized with the de-condensing chromosomes while Thr112 phosphorylation rapidly disappeared (Fig. 3B). This was confirmed using a polyclonal anti-phospho Ser10 of core histone H3. The phosphorylation of the histone H3 on serine 10 is a molecular mechanism, which is accompanied by chromosome condensation in mitosis (Hans and Dimitrov, 2001). The ATF7 staining co-localized with the histone H3 Ser10 immuno-staining only in telophase cells but not in metaphase cells (Fig.3B).

Altogether, these findings provide evidences that the Thr112 phosphorylation of ATF7 occurs transiently during mitosis and that the phosphorylated form is displaced

from the condensed chromatin. At the end of telophase, ATF7 re-localizes within the chromatin, while the remaining phosphorylated form is still excluded from the chromatin.

We further investigated the correlation between the phosphorylation on the Thr112 and the exclusion of ATF7 from the condensed chromatin. HeLa-ATF7 cells were synchronized at G2/M using thymidine-nocodazole block and fractionated into soluble (cytosol and nucleoplasm) and insoluble (chromatin and nuclear matrix) fractions at different times following release. Fractions were analyzed by immuno-blotting using specific antibodies (Fig. 3C). Cell cycle distribution was determined by flow cytometry (data not shown).

ATF7 protein was undetectable in insoluble fractions within the 2 hours following drug withdrawal while more than 85% of the cells were still in M phase (Fig. 3C). Thereafter, ATF7 is associated with the insoluble fractions as cells entered G1 phase. In contrast, the amount of ATF7 was roughly constant in soluble fractions. ATF7 was detectable as a shifted form 2 hours after drug removal, which correlated with the phosphorylation on the Thr112. Afterwards, Thr112 phosphorylation disappeared abruptly when cells entered interphase and reappeared slightly 16 hours after drug removal as cells re-entered mitosis (Fig. 3C). Thr112 phosphorylated form was exclusively observed in soluble fractions of mitotic cells and undetectable in insoluble fractions whatever the cell cycle stages. As expected, the nucleosomal protein histone H4 remains tightly associated with chromatin fractions throughout mitosis, while Hsp60 partitioned exclusively with the soluble fractions (Singh et al., 1990; Kouzarides, 2007).

Thus, ATF7 partitioned between soluble and insoluble fractions from interphase cells but is not longer associated with the chromatin and nuclear matrix in mitotic cells. Our results strongly suggest that phosphorylation of ATF7 on the Thr112 is critical for its exclusion from the condensed chromatin during mitosis.

CDK1/cyclin B phosphorylates ATF7 at Thr112

CDKs are the main kinases implicated in the regulation of the cell cycle as well as checkpoint controls via the phosphorylation of various substrates. We analyzed Thr112 phosphorylation in the presence of roscovitine, a potent inhibitor of CDK2 and CDK1 (De Azevedo et al., 1997) to determine whether CDKs could be implicated in ATF7 Thr112 phosphorylation. HeLa-ATF7 cells were blocked in prometaphase by nocodazole treatment in the presence or in the absence of roscovitine. Upon nocodazole treatment, mitotic cells were collected by shake-off. In parallel, asynchronous HeLa-ATF7 exposed or not to UV radiations were treated or not with roscovitine.

Cells were fractionated as previously described and fractions were analyzed by Western-Blotting. Cell cycle state was verified by flow cytometry (data not shown). In soluble fractions, a strong Thr112 phosphorylation signal was detected in mitotic cells and after UV radiations, as expected (Fig. 4A). However, Thr112 phosphorylation declined abruptly in mitotic cells treated with roscovitine compared to the untreated mitotic cells (Fig. 4A). In contrast, roscovitine treatment did not abolish Thr112 phosphorylation in cells exposed to UV radiations. Phosphorylation of the Thr53 was

observed after UV radiations, and slightly detectable in mitotic cells but was not affected by the roscovitine treatment (Fig. 4A). In insoluble fractions, ATF7 was observed in asynchronous cells exposed or not to UV radiations but was reduced in mitotic cells (Fig. 4A). Roscovitine treatment restored the chromatin and nuclear matrix occupancy of ATF7 in mitotic cells (Fig. 4A).

These data suggest that the phosphorylation on the Thr112 is CDK-dependent in mitosis but CDK-independent following UV radiations. In addition, chromatin-nuclear matrix occupancy of ATF7 is dependent on CDK activity.

To test whether ATF7 could be directly phosphorylated by the CDK1, we performed *in vitro* kinase assays with either recombinant CDK1/Cyclin B1 or CDK2/Cyclin A1 complexes and GST-ATF7 (1-148) WT or GST-ATF7 (1-148) Thr112A as substrates. The products of the kinase reactions were analyzed by Western-Blotting using the pThr112 antibody. As shown in figure 4B, CDK1/cyclin B1 complex was able to phosphorylate ATF7 specifically on the Thr112 residue, whereas the CDK2/cyclin A1 complex was markedly less efficient (Fig. 4B). As expected, the pThr112 mAb did not detect the GST-ATF7 T112A mutated protein (Fig. 4B) as well as the GST-ATF7 in absence of the CDK1/Cyclin B1 complex (Fig. S1). In this assay, both kinase complexes were equally competent to phosphorylate the myelin basic protein in the presence of P³² ATP (Fig. 4B).

Thus, the ATF7 protein is a good substrate for the CDK1/Cyclin B *in vitro*, which corroborates the results obtained *in cellulo*.

To further investigate the physiological relevance of the Thr112 phosphorylation, we generated several specific mAbs directed against a non-phosphorylated peptide surrounding the ATF7 Threonine 112 residue, which could discriminate between the non- and the phosphorylated Thr112 peptides (Fig. S2).

After purification, these mAbs were tested for their capacity to recognize specifically the non-phosphorylated Thr112 (U-Thr112) versus the phosphorylated Thr112 ATF7 species (P-Thr112). HeLa-ATF7 cells were arrested in metaphase by thymidine-nocodazole block and released in fresh medium. Cells were then arrested at different times following release and cell extracts were analysed by Western blotting using these specific mAbs. Cell cycle distribution was determined by flow cytometry. One mAb, referred as U-Thr112, stained exclusively ATF7 species 4h after released while 90% of the cells were in G1 phase but did not detect ATF7 from nocodazole-arrested cells. As expected, the P-Thr112 mAb stained ATF7 protein only in nocodazole-arrested cells (Fig. 5A).

This mAb was consequently tested in an *in vitro* kinase assay with the purified CDK1/Cyclin B1 complex. GST-ATF7 recombinant protein was pre-incubated with either a mAb directed against the HPV16 E6 protein (Freund et al., 2013), or the U-Thr112 mAb prior to the addition of the CDK1/Cyclin B1 complex, and the kinase reactions were analyzed by Western-blot. The U-Thr112 mAb was able to block the phosphorylation on the Thr112 by the CDK1/Cyclin B1 complex *in vitro* (Fig. 5B and

data not shown), while the E6 mAb had no effect. The same results were obtained in a parallel experiment using mitotic cell extract in spite of the recombinant CDK1/Cyclin B1 complex. Furthermore, the U-Thr112 antibody did not inhibit by itself the phosphorylation of the MBP by the CDK1/Cyclin B1 complex (Fig. 5C), clearly demonstrating that inhibition was specific to ATF7. Thus, the U-Thr112 mAb is able to interfere with the Thr112 phosphorylation of ATF7 by competing with the CDK1/Cyclin B1 complex.

A recent delivery method of monoclonal antibodies by electroporation in living cells has been described (Freund et al., 2013). This technique is extremely effective, as up to 99% of treated cells incorporate mAbs. We used this technique to analyse the U-Thr112 mAb behaviour in living cells. The U-Thr112 and the E6 mAbs were electrotransferred in HeLa cells. The cells were fixed at different times post-treatment, and the mAbs were visualized using a fluorescent anti-mouse antibody. In addition, both mAbs were used as primary antibodies in a conventional *in vitro* immuno-staining assay. As shown in figure 6A, the transduced E6 mAb was essentially present in the cytoplasm after 24h post treatment and subsequently spread within the entire cell after 72h. Since HeLa cells do not contain HPV16 E6 protein, as shown by the conventional *in vitro* immuno-staining, and the electric shock does not permeabilized the nuclear membrane, the E6 mAb diffuses within the nucleus only after cell division as expected (Freund et al., 2013). By contrast, the electro-transferred U-Thr112 mAb was partially detected in the nucleus after 24h but exhibited a predominant nuclear staining pattern 72h post treatment, indistinguishable from the conventional *in vitro* immuno-staining (Fig. 6A). These results

indicate that the U-Thr112 antibody is able to recognize the endogenous non-phosphorylated Thr112 epitope of ATF7 in the cytoplasm and once bound to it, is translocated into the nucleus in a piggyback fashion.

We next investigated the effect of the mAb U-Thr112 on the Thr112 phosphorylation in living cells and its consequence on ATF7 cellular sub-localization. After electro-transfer of either the U-Thr112 or the E6 mAbs, cells were fixed at different times post-treatment and stained with the pThr112 coupled with Alexa-568 to avoid interference with the transduced mAbs for immunofluorescence detection, and with the anti-ATF7 polyclonal antibody (Fig. 6B). In mitotic cells, the P-Thr112 staining intensity decreased in U-Thr112 electro-transfected cells only 72h post-treatment compared to either E6 treated cells or the U-Thr112 24h post-treatment (Fig. 6B), indicating that the U-Thr112 mAb can inhibit the phosphorylation of ATF7 only when localized in the nuclear compartment. By contrast, the U-Thr112 did not impair the UV-dependent phosphorylation of the Thr53. As cyclin B1 enters into the nucleus only at the onset of G2-M giving rise to an active CDK1/Cyclin B1 complex able to phosphorylate its nuclear substrates (Lindqvist et al., 2007), we conclude that the transduced U-Thr112 mAb bound to its cognate epitope competes with the CDK1/Cyclin B1 complex for the kinase consensus site of ATF7.

However, this inhibition did not impair the chromatin displacement of ATF7 as shown by the polyclonal ATF7 antibody staining. These results demonstrate that although it does not lead to a re-localization of ATF7 on the chromatin during mitosis, the U-Thr112 specifically inhibits the Thr112 phosphorylation in living cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, stable cell line and synchronization

HeLa and HeLa-ATF7 cells were grown as monolayer in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 4.5 g/L glucose and 10 % fetal calf serum (FCS) and 1 mM pyruvate for HeLa-ATF7 cell line. Mel501, Mel-ATF7-1 and Mel-ATF7-2 were grown as monolayer in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 1 mg /L glucose and 10 % fetal calf serum (FCS).

To generate HeLa-ATF7-1 cell line, HA-ATF7-1 coding sequences were introduced into the pOZ-FH-N retroviral vector (Nakatani and Ogryzko, 2003) to transduce HeLa cells. After several rounds of selection, HeLa-ATF7-1 cell line was isolated.

For synchronization, two protocols were used as previously described (Whitfield et al., 2000). To obtain cells arrested at the beginning of S phase, a double thymidine block was carried out. Cells were blocked for 19 hours with 2 mM thymidine (Calbiochem), released for 9 hours in fresh medium, and then blocked again with 2 mM thymidine for an additional period of 17 hours. The cells were released in fresh medium to progress through G2 and mitosis synchronously and collected each hour after release from thymidine. To arrest cells in metaphase, 2 mM thymidine was added for 18 hours, followed by a 3 hours release, and then blocked at mitosis with 100 ng of nocodazole (Calbiochem) per ml for 12 h. The cells were released in fresh medium and allowed to

progress through the cell cycle. For enrichment of cells in metaphase, nocodazole was added at 100 ng/ml for 12 hours, and cells were collected by shake-off. Roscovitine drug (Calbiochem) was used to a final concentration of 20 μ M.

Cell extracts

To perform whole cell extracts (WCE), cells were harvested in PBS and extracted in mini-extract buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 300 mM NaCl, 1 % (w/w) NP-40, 0.5 % (w/w) sodium deoxycholate, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 mM NaF. After 30 min on ice, the crude extract was frozen in liquid nitrogen and cleared by centrifugation for 15 min at 13 000 rpm.

For fractionation, cell membranes lysed in low salt extraction buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 10 % glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM NaF, 1 mM N-ethyl-maleimide (NEM) and 0.1 % Triton-X100) as described (Dutertre et al., 2000). The nuclei were pelleted by centrifugation at 2200 rpm for 10 min and the supernatant was retained as a cytosolic fraction. The nuclei were incubated for 1 h on ice in the same buffer supplemented with 300 mM NaCl. The insoluble fraction was pelleted by centrifugation at 14000 rpm for 25 min and the supernatant designated soluble fraction was precipitated with cold acetone overnight at -20°C, and then solubilized in Laemmli buffer. Pellets corresponding to the chromatin associated fraction and nuclear matrix containing fraction were solubilized in Laemmli buffer and sonicated with a Bioruptor™ Next Gen (Diagenode).

Antibodies and electroporation

Mouse monoclonal antibodies, pThrT112, pThr53 and anti-ATF7 (Camuzeaux et al., 2008), rabbit anti-actin polyclonal antibody (Sigma-Aldrich), mouse monoclonal anti-cyclin B1, anti-HP1 (Santa Cruz Biotechnology) were used in this study. The P-Thr112 and P-Thr53 were labelled with Alexa568 using the Dylight™ Microscale Antibody labelling kit (Thermoscientific). To generate specific non phospho- Thr112 monoclonal antibodies, a peptide LPSTPDIKIKKEEPPV corresponding to amino acids [109-123] of ATF7-3 was synthesized, coupled to ovalbumin as a carrier protein and used for mouse immunization. Immunization and monoclonal antibody production were performed as previously described (Brou et al., 1993). The specificity of the monoclonal antibodies was tested by ELISA, comparing their immuno-reactivity against the unphosphorylated peptide versus the phospho-peptide as described (Camuzeaux et al., 2008). For electroporation of mAbs in living cells, 5 to 10µg of purified mAbs were transduced using to the NeonR transfection system (Life technologie) as previously described (Freund et al., 2013).

Western Blotting

Cell extracts were separated on SDS-PAGE gradient gels and transferred by electro blotting on a nitrocellulose membrane (Protran, Whatman, Dassel, Germany). The membrane was blocked for 1h at RT in PBS, 0.05 % Tween-20, 10 % nonfat dry milk. Primary antibodies were added to the membrane in PBS, 0.05 % Tween-20 overnight at 4°C. The membrane was washed twice in PBS, 0.05 % Tween-20 and secondary antibodies IRDye800-conjugated anti-mouse or IRDye700-conjugated anti-rabbit antibodies (ScienceTec) were added for 1h at RT in PBS, 0.05 % Tween-20. Membranes were scanned with the LI-COR Odyssey infrared imaging system and analyzed with the Odyssey v3.0 software (LI-COR).

Fluorescence microscopy

Cells grown on coverslips were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature, permeabilized in PBS containing 0.1 % Triton-X100 for 20 min, and incubated in blocking buffer (PBS containing 10 % FCS) for an additional 20 min. Staining with primary antibodies was performed in PBS, 0.1 % Triton-X100 overnight at 4°C. After three washes in PBS-Triton-X100, cells were incubated with the secondary antibodies Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit immunoglobulin IgGs (Invitrogen, Molecular Probes) in PBS-Triton-X100 for 1h at RT. Finally, the cells were mounted in DAPI-fluoromount (Southern-Biotech) and images were captured with deconvolution (confocal) fluorescence microscopy (Leica DMIRBE inverted microscope and OPENLAB 3.1.4 software).

Fluorescence-activated Cell Sorter analysis

Asynchronous or synchronous cells were trypsinized, washed three times with PGE (PBS containing 01 % Glucose and 1 mM EDTA) and then fixed in 70 % ethanol-PGE solution on ice for 2h. Cells were rehydrated overnight at 4°C in PGE. RNase A/free DNase was added at 1 µg /ml for 30 min at RT followed by addition of propidium iodide (IP) solution at 50 µg /ml final concentration, and incubated for 30 min on ice in the dark. The suspended cells were filtrated using a 50-µm-nylon membrane to remove clumps and analyzed on fluorescence-activated cell sorter for DNA content (FACS Callibur Becton Dickinson).

In vitro Kinase assay

Cold kinase reactions were performed according to the manufacturer. Briefly, purified GST-ATF7 WT or mutant T112A were incubated with either the CDK1/cyclin B1 complex (New England Biolabs) or the CDK2/cyclin A1 complex (SignalChem) in kinase buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 2mM DTT, 0.01% Brij35) with 200 µM ATP at 30°C for 30 min. For radioactive reactions, MBP (Sigma-Aldrich) was incubated in the same conditions with the respective kinase and [γ -³²P] ATP to a final specific activity of 150 µCi /µmol. Proteins were analyzed by western blot or exposed to a phospho-imager screen and scanned with a Typhoon FLA9500.

Acknowledgements

This work was supported by funds and/or fellowships from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Strasbourg, the French Ministry of Research, the INCa PLB10 2010-186, and the Ligue Nationale contre le Cancer Comités Alsace (Haut-Rhin et Bas-Rhin) et Vosges.

Discussion

The results presented in this study establish that ATF7 is specifically phosphorylated on the Thr112 residue at the entrance of mitosis and remains phosphorylated throughout mitosis. Our findings validate the high throughput proteomic screens for mitotic phospho-proteins in which the ATF7 Thr112 residue was identified as a phosphorylated site in mitotic arrested cells (Dephoure et al., 2008; Olsen et al., 2010). Using immunofluorescence staining, we show that the endogenous ATF7 is phosphorylated on the Thr112 in mitotic cells and this modification correlates with its displacement from the condensed chromatin. Cell fractionation experiments from synchronized cells confirmed these observations. Indeed, the Thr112 phosphorylated form of ATF7 was exclusively detected in the cytoplasm/nucleoplasm fractions during M phase. Furthermore, while the unphosphorylated form of ATF7 protein was completely absent from the chromatin/nuclear matrix in mitotic cells, it re-localized to this insoluble fraction in interphase and S phase cells.

During mitosis, we could demonstrate that ATF7 is phosphorylated on the Thr112 in CDK-dependent manner, as roscovitine, a potent CDK inhibitor (De Azevedo et al., 1997), abolishes its phosphorylation in mitotic arrested cells. In addition, we could show that the inhibition of ATF7 phosphorylation by roscovitine treatment decreases its dissociation from the condensed chromatin in mitotic arrested cells, whereas it had not effect on the chromatin occupancy of UV-dependent Thr112 phosphorylation of the ATF7. These findings suggest the existence of two distinct pathways leading to the phosphorylation of Thr112, one during mitosis and the other one in response to stress. In

agreement with the roscovitine experiments, ATF7 is phosphorylated by the CDK1/Cyclin B1 complex, whereas it is a poor substrate for CDK2/Cyclin A1 complex in an *in vitro* kinase assay.

Phosphorylation of transcription factors at the entrance of mitosis has been shown to be a key player in turning off transcription. Indeed, various components of the basic transcriptional machinery like the RNA polymerase II and TFIID, are modified by phosphorylation in mitotic cells and are displaced from the condensed chromatin (Gebara et al., 1997; Long et al., 1998). Some Zinc finger transcription factors are also displaced from the chromatin following phosphorylation (Dovat et al., 2002; Rizkallah and Hurt, 2009; Rizkallah et al., 2011). AIB1, a transcriptional co-activator, which promotes pre-neoplastic changes and cancer initiation in animal models, is also phosphorylated on a Ser728 in mitotic cells. This phosphorylation is CDK1-dependent and alters its chromatin occupancy (Ferrero et al., 2011). The CREB protein, which belongs to the CREB/ATF transcription factor family, is also phosphorylated at the beginning of mitosis on two serine residues (Ser720/Ser721) in a CDK dependent manner (Trinh et al., 2013). These phosphorylation events correlate with a reduced association of CREB with the chromatin during mitosis. Although the phosphomimetic substitution of both serines in aspartates reduced CREB association with the chromatin, mutations of these two residues in alanine did not abolish its chromatin dissociation, suggesting that even though the phosphorylation of these two residues promotes CREB dissociation from the chromatin, it is not absolutely required for its displacement from the chromatin in mitotic cells (Trinh et al., 2013). Beside the fact that AIB1 phosphorylation correlates with its

exclusion from the condensed chromatin, phosphorylation or point mutations of the Ser728 into alanine or glutamate did not alter its capacity to be recruited to a minimal promoter and to co-activate ER α during M-phase (Ferrero et al., 2011). The authors pointed out that minimal promoters are not subjected to the same epigenetic complexity as endogenous promoters. These results highlight the difficulties to find a strict causality between phosphorylation events and displacement of transcription factors from the condensed chromatin in a cellular context.

To elucidate the direct correlation between Thr112 phosphorylation of ATF7 and its exclusion from the condensed chromatin, we generated a site-specific mAb of the Thr112 unphosphorylated form of ATF7 (U-Thr112), which was able to inhibit Thr112 phosphorylation in an *in vitro* kinase assay. Using a recent technology of intracytoplasmic antibodies delivery (Freund et al., 2013), we could show that the transduced U-Thr112 antibody remained fully active and was brought to the nucleus by binding to its endogenous ATF7 epitope. Moreover, this mAb was also able to specifically inhibit the Thr112 phosphorylation of the endogenous ATF7 protein in mitotic cells 72h post-transduction. This result correlates with the nuclear localization of the active CDK1/Cyclin B1 complex at the onset of G2-M. Thus, we assume that this U-Thr112 mAb interacts with the kinase consensus site prior the nuclear translocation of the CDK1/Cyclin B1 complex. Inhibition of the Thr112 phosphorylation did not lead to a re-association of ATF7 with the condensed chromatin. These findings suggest that the Thr112 phosphorylation during mitosis is not a prerequisite for ATF7 chromatin

dissociation, even though the chromatin eviction of ATF7 is CDK1-dependent event. It appears that another uncharacterized post-translational modification CDK-dependent is responsible for the displacement of ATF7 from the condensed chromatin during mitosis.

Thus, the use of neutralizing intrabodies or mAbs becomes an attractive option to dissect the critical role of a particular post-translationally modified form of a given protein in living cells. ScFv fragments have been developed for neutralizing a particular form of a given protein in a cellular context (Koo et al., 2014; Haque et al., 2011). An intrabody that stabilized the inactive conformation state of the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) has been shown to attenuate selectively the phosphatase function of PTP1B (Haque et al., 2011). Recently, Koo et al (2014) have developed a scFv molecule that binds specifically to the tyrosine-phosphorylated form (Tyr705) of STAT3 protein (pYSTAT3). This intrabody blocks the accumulation of pYSTAT3 in the nucleus and the production of acute phase response proteins induced by interleukin-6 without affecting downstream response of pSSTAT3. Thus, this remarkably tool could be used to dissect the cellular functions of specific modified form of STAT3.

To our knowledge, there is no example of an intrabody or mAb able to inhibit a specific post-translational modification directly in living cells. In this paper, we demonstrate for the first time the feasibility of a neutralizing mAb able to interfere in living cells with a specific phosphorylation event by directly binding at the phosphorylation consensus site and thus competing with the kinase. Thereby, the used of intrabodies is a very attractive and powerful approach to study a function of a particular

state of a given protein in living cells without impairing cellular function of its non-modified form or distinct modified forms.

References

- Brou, C., S. Chaudhary, I. Davidson, Y. Lutz, J. Wu, J.M. Egly, L. Tora, and P. Chambon. 1993. Distinct TFIID complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *EMBO J.* 12:489–499.
- Camuzeaux, B., J. Diring, P.-J. Hamard, M. Oulad-Abdelghani, M. Donzeau, M. Vigneron, C. Kedinger, and B. Chatton. 2008. p38beta2-mediated phosphorylation and sumoylation of ATF7 are mutually exclusive. *J Mol Biol.* 384:980–991. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.008.
- Chatton, B., J.L. Bocco, J. Goetz, M. Gaire, Y. Lutz, and C. Kedinger. 1994. Jun and Fos heterodimerize with ATFa, a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity. *Oncogene.* 9:375–385.
- Chatton, B., J.L. Bocco, M. Gaire, C. Hauss, B. Reimund, J. Goetz, and C. Kedinger. 1993. Transcriptional activation by the adenovirus larger E1a product is mediated by members of the cellular transcription factor ATF family which can directly associate with E1a. *Mol Cell Biol.* 13:561–570.
- De Azevedo, W.F., S. Leclerc, L. Meijer, L. Havlicek, M. Strnad, and S.H. Kim. 1997. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* 243:518–526.
- De Graeve, F., A. Bahr, B. Chatton, and C. Kedinger. 2000. A murine ATFa-associated factor with transcriptional repressing activity. *Oncogene.* 19:1807–1819. doi:10.1038/sj.onc.1203492.
- De Graeve, F., A. Bahr, K.T. Sabapathy, C. Hauss, E.F. Wagner, C. Kedinger, and B. Chatton. 1999. Role of the ATFa/JNK2 complex in Jun activation. *Oncogene.* 18:3491–3500. doi:10.1038/sj.onc.1202723.
- Dephoure, N., C. Zhou, J. Villén, S.A. Beausoleil, C.E. Bakalarski, S.J. Elledge, and S.P. Gygi. 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:10762–10767. doi:10.1073/pnas.0805139105.
- Diring, J., B. Camuzeaux, M. Donzeau, M. Vigneron, M. Rosa-Calatrava, C. Kedinger, and B. Chatton. 2011. A cytoplasmic negative regulator isoform of ATF7 impairs ATF7 and ATF2 phosphorylation and transcriptional activity. *PLoS ONE.* 6:e23351. doi:10.1371/journal.pone.0023351.

- Dovat, S., T. Ronni, D. Russell, R. Ferrini, B.S. Cobb, and S.T. Smale. 2002. A common mechanism for mitotic inactivation of C2H2 zinc finger DNA-binding domains. *Genes & Development*. 16:2985–2990. doi:10.1101/gad.1040502.
- Dutertre, S., M. Ababou, R. Onclercq, J. Delic, B. Chatton, C. Jaulin, and M. Amor-Gu ret. 2000. Cell cycle regulation of the endogenous wild type Bloom's syndrome DNA helicase. *Oncogene*. 19:2731–2738. doi:10.1038/sj.onc.1203595.
- Ferrero, M., J. Ferragud, L. Orlando, L. Valero, M. Sánchez Del Pino, R. Farr s, and J. Font De Mora. 2011. Phosphorylation of AIB1 at Mitosis Is Regulated by CDK1/CYCLIN B. *PLoS ONE*. 6:e28602. doi:10.1371/journal.pone.0028602.g011.
- Freund, G., A.-P. Sibling, D. Desplancq, M. Oulad-Abdelghani, M. Vigneron, J. Gannon, M.H. Van Regenmortel, and E. Weiss. 2013. Targeting endogenous nuclear antigens by electrotransfer of monoclonal antibodies in living cells. *mabs*. 5:518–522. doi:10.4161/mabs.25084.
- Gaire, M., B. Chatton, and C. Kedingler. 1990. Isolation and characterization of two novel, closely related ATF cDNA clones from HeLa cells. *Nucleic Acids Research*. 18:3467–3473.
- Gebara, M.M., M.H. Sayre, and J.L. Corden. 1997. Phosphorylation of the carboxy-terminal repeat domain in RNA polymerase II by cyclin-dependent kinases is sufficient to inhibit transcription. *J Cell Biochem*. 64:390–402.
- Goetz, J., B. Chatton, M.G. Mattei, and C. Kedingler. 1996. Structure and expression of the ATF  gene. *J Biol Chem*. 271:29589–29598.
- Gottesfeld, J.M., and D.J. Forbes. 1997. Mitotic repression of the transcriptional machinery. *Trends in Biochemical Sciences*. 22:197–202.
- Hamard, P.-J., M. Boyer-Guittaut, B. Camuzeaux, D. Dujardin, C. Hauss, T. Oelgeschl ger, M. Vigneron, C. Kedingler, and B. Chatton. 2007. Sumoylation delays the ATF7 transcription factor subcellular localization and inhibits its transcriptional activity. *Nucleic Acids Research*. 35:1134–1144. doi:10.1093/nar/gkl1168.
- Hamard, P.-J., R. Dalbies-Tran, C. Hauss, I. Davidson, C. Kedingler, and B. Chatton. 2005. A functional interaction between ATF7 and TAF12 that is modulated by TAF4. *Oncogene*. 24:3472–3483. doi:10.1038/sj.onc.1208565.
- Hans, F., and S. Dimitrov. 2001. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*. 20:3021–3027. doi:10.1038/sj.onc.1204326.
- Haque, A., J.N. Andersen, A. Salmeen, D. Barford, and N.K. Tonks. 2011. Conformation-Sensing Antibodies Stabilize the Oxidized Form of PTP1B and Inhibit

- Its Phosphatase Activity. *Cell*. 147:185–198. doi:10.1016/j.cell.2011.08.036.
- John, S., and J.L. Workman. 1998. Bookmarking genes for activation in condensed mitotic chromosomes. 1–5.
- Koo, M.Y., J. Park, J.M. Lim, S.Y. Joo, S.P. Shin, H.B. Shim, J. Chung, D. Kang, H.A. Woo, and S.G. Rhee. 2014. Selective inhibition of the function of tyrosine-phosphorylated STAT3 with a phosphorylation site-specific intrabody. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111:6269–6274. doi:10.1073/pnas.1316815111.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128:693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Lindqvist, A., W. van Zon, C. Karlsson Rosenthal, and R.M.F. Wolthuis. 2007. Cyclin B1–Cdk1 Activation Continues after Centrosome Separation to Control Mitotic Progression. *Plos Biol*. 5:e123. doi:10.1371/journal.pbio.0050123.sg010.
- Long, J.J., A. Leresche, R.W. Kriwacki, and J.M. Gottesfeld. 1998. Repression of TFIID transcriptional activity and TFIID-associated cdk7 kinase activity at mitosis. *Mol Cell Biol*. 18:1467–1476.
- Malumbres, M. 2011. Physiological Relevance of Cell Cycle Kinases. *Physiol Rev*. 91:973–1007. doi:10.1152/physrev.00025.2010.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*. 30:630–641. doi:10.1016/j.tibs.2005.09.005.
- Martínez-Balbás, M.A., A. Dey, S.K. Rabindran, K. Ozato, and C. Wu. 1995. Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin. *Cell*. 83:29–38.
- Mitchison, T.J., and E.D. Salmon. 2001. Mitosis: a history of division. *Nat Cell Biol*. 3:E17–21. doi:10.1038/35050656.
- Muchardt, C., J.C. Reyes, B. Bourachot, E. Leguoy, and M. Yaniv. 1996. The hbrm and BRG-1 proteins, components of the human SNF/SWI complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis. *EMBO J*. 15:3394–3402.
- Nakatani, Y., and V. Ogryzko. 2003. Immunoaffinity Purification of Mammalian Protein Complexes. *In Methods in Enzymology*. Elsevier. 430–444.
- Olsen, J.V., M. Vermeulen, A. Santamaria, C. Kumar, M.L. Miller, L.J. Jensen, F. Gnad, J. Cox, T.S. Jensen, E.A. Nigg, S. Brunak, and M. Mann. 2010. Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy

- During Mitosis. *Science Signaling*. 3:ra3–ra3. doi:10.1126/scisignal.2000475.
- Pines, J., and C.L. Rieder. 2001. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol*. 3:E3–6. doi:10.1038/35050676.
- Rizkallah, R., and M.M. Hurt. 2009. Regulation of the Transcription Factor YY1 in Mitosis through Phosphorylation of Its DNA-binding Domain. *Mol Biol Cell*. 20:4766–4776. doi:10.1091/mbc.E09.
- Rizkallah, R., K.E. Alexander, and M.M. Hurt. 2011. Global mitotic phosphorylation of C2H2 zinc finger protein linker peptides. *Cell Cycle*. 10:3327–3336. doi:10.4161/cc.10.19.17619.
- Singh, B., H.V. Patel, R.G. Ridley, K.B. Freeman, and R.S. Gupta. 1990. Mitochondrial import of the human chaperonin (HSP60) protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 169:391–396.
- Trinh, A.T., S.H. Kim, H.Y. Chang, A.S. Mastrocola, and R.S. Tibbetts. 2013. Cyclin-dependent Kinase 1-dependent Phosphorylation of cAMP Response Element-binding Protein Decreases Chromatin Occupancy. *Journal of Biological Chemistry*. 288:23765–23775. doi:10.1074/jbc.M113.464057.
- Walsh, C.T., S. Garneau-Tsodikova, and G.J. Gatto. 2005. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 44:7342–7372. doi:10.1002/anie.200501023.
- Whitfield, M.L., L.X. Zheng, A. Baldwin, T. Ohta, M.M. Hurt, and W.F. Marzluff. 2000. Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms. *Mol Cell Biol*. 20:4188–4198.
- Whitmarsh, A.J., and R.J. Davis. 2000. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci*. 57:1172–1183.

Figure 1: ATF7 is localized in the nuclei and is modified by phosphorylation following UV radiations. (A) Confocal microscopy images of HeLa and HeLa-ATF7 stained by immunofluorescence with an anti-ATF7 monoclonal antibody (ATF7) (green). DNA was stained with DAPI (blue). Merged signals are shown on the right panels. (B) Total cell extracts from HeLa and stable cell line HeLa-ATF7 were analyzed by Western blotting with an anti-ATF7 mAb, an anti-actin polyclonal antibody for quantification. (C) HeLa cells and HeLa-ATF7 were either exposed or not to UV radiations (40KJ/m²) 30 min prior to be harvested. Total cell extracts from stable cell line and immuno-complexes precipitated from HeLa cell lysates using an anti-ATF7 mAb were analyzed by Western blotting with phospho-specific monoclonal antibodies P-Thr51, P-Thr53 and P-Thr112 and an anti-ATF7 as indicated.

Figure 2: Phosphorylation of ATF7 on the Thr112 occurs in mitotic cells. (A) HeLa-ATF7 cells were synchronized using double thymidine block. After release, cells were exposed or not to UV radiations 30 min prior to be harvested at the indicated time points. Total cell extracts were analyzed by Western blotting with P-Thr53, P-Thr112 and ATF7 MAbs, and an anti-cyclin B1 to visualize the end of mitosis, as indicated. Actin was used as a loading control. (B) To monitor cell cycle progression an aliquot of each sample was taken for FACS analysis. Percentages of mitotic cells are indicated.

Figure 3: ATF7 is phosphorylated on the Thr112 during mitosis and displaced from the condensed chromatin. (A) Images captured on confocal microscope from

asynchronous HeLa and Mel501 cells grown on coverslips and stained with either P-Thr112 mAb (green) and a polyclonal anti-ATF7 (red) followed by DAPI staining (bleu). Merged images are shown in the right panel. **(B)** The Thr112 phosphorylation timing during mitosis was determined on HeLa cells grown on coverslips and stained with P-Thr112 mAb (green), a polyclonal anti-ATF7 (red) and DAPI (blue). Images captured using fluorescence confocal microscope show cells in prophase, metaphase, anaphase and telophase based on the chromatin morphology. **(C)** HeLa-ATF7 cells were synchronized using thymidine-nocodazole block. Cells were harvested at different times after released and fractionated in soluble and insoluble fractions. Fractions were analyzed by Western blot using different antibodies as indicated. Cell cycle progression was monitored by FACS analysis (data not shown).

Figure 4: Thr112 phosphorylation is CDK1/cyclin B1 dependent. **(A)** HeLa-ATF7 cells were exposed or not to UV radiations or blocked with nocodazole to trigger accumulation of mitotic cells for 12 hours and treated or not with roscovitine (Rosco). Mitotic cells were collected by shake-off. Cells were fractionated, and soluble and insoluble fractions were analyzed by Western blotting using the P-Thr53, P-Thr112 mAbs, and anti-ATF7 mAb. Actin was used as a loading control, and an anti-Hsp60 and anti-Histone H4 were used as fractionation control. **(B)** Purified ATF7 recombinant proteins, wild-type (WT) and mutant Thr112A were incubated with either active CDK1/cyclin B or active CDK2/cyclin A1 for 1 hour at 30°C. Kinase reactions were analyzed by Western-Blotting (upper panel) and or coomassie staining as loading control (bottom panel). **(C)** Myelin basic protein was incubated with either active

CDK1/cyclin B or active CDK2/cyclin A1 using the same assay condition in the presence of [γ - ^{32}P] ATP. Kinase reactions were resolved on SDS-PAGE. The gel was dried and exposed with a Typhoon FLA9500.

Figure 5: Inhibition of the Thr112 phosphorylation in living cells by a mAb. (A) HeLa-ATF7 cells were synchronized using thymidine-nocodazole block. Cells were harvested at different times after release and cell extracts were analyzed by Western blot using different antibodies as indicated. Cell cycle progression was monitored by FACS analysis (data not shown). (B) Purified ATF7 recombinant protein pre-incubated or not with mAbs as indicated was used for an *in vitro* kinase assay with either purified CDK1/Cyclin B1 complex or total extracts from Nocodazole arrested cells. (C) MBP was used in an *in vitro* kinase assay in the presence or absence of mAbs, as indicated, with purified CDK1/Cyclin B1 complex.

Figure 6: Site-specific monoclonal antibody inhibits specifically the Thr112 phosphorylation in living cells. (A) HeLa cells were transduced with either the E6 or the U-Thr112 antibody and grown on coverslips. The delivered mAbs were revealed with an Alexa 488-labeled goat anti-mouse antibody after 24h or 72h post-treatment. Images were taken by immunofluorescence microscopy. (B) HeLa cells were transduced with either the E6 or the U-Thr112 mAb and grown on coverslips. 24h or 72h post-treatment, cells were stained with an Alexa 568-labeled P-Thr112 (red) to visualize the Thr112 phosphorylation event in mitotic cells and in parallel with a polyclonal-ATF7 antibody (green) and DAPI (blue). (C) HeLa cells were transduced

with either the E6 or the U-Thr112 mAb and grown on coverslips. 72h post-treatment, cells were stained with an Alexa 568-labeled P-Thr53 (red) to visualize the Thr53 phosphorylation and in parallel with a polyclonal-ATF7 antibody (green) and DAPI (blue).

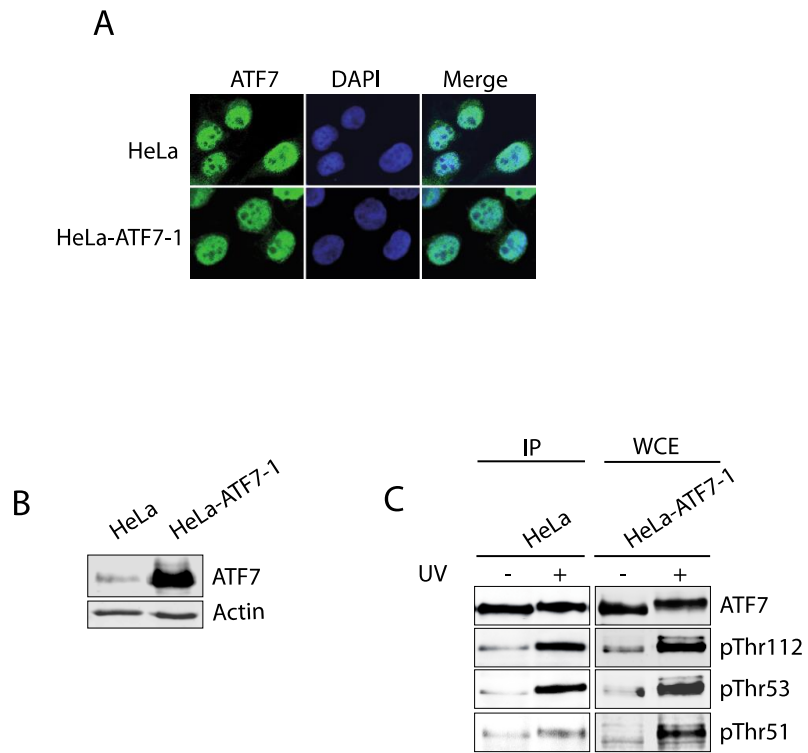


Figure 1: ATF7 is predominantly localized in the nuclei and modified by phosphorylation on Thr53 and Thr112 following UV radiation.

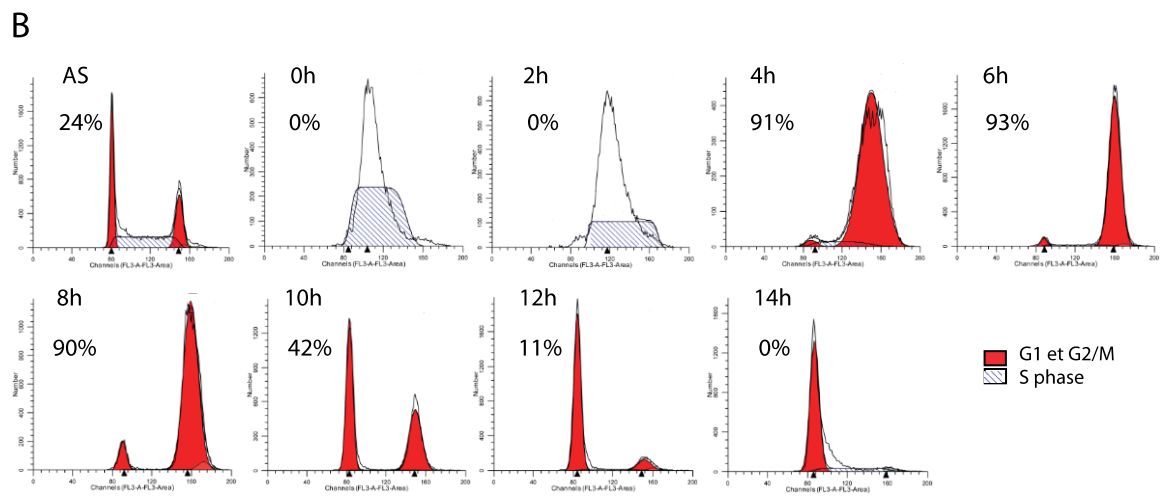
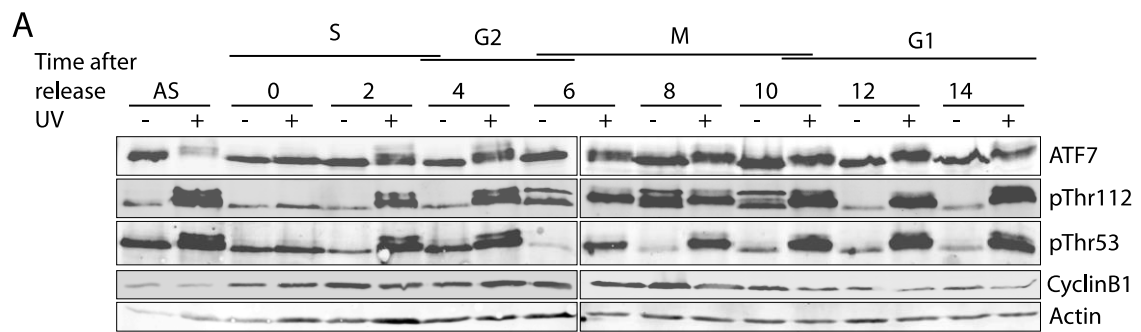


Figure 2: Phosphorylation of ATF7 on the Thr112 during mitosis.

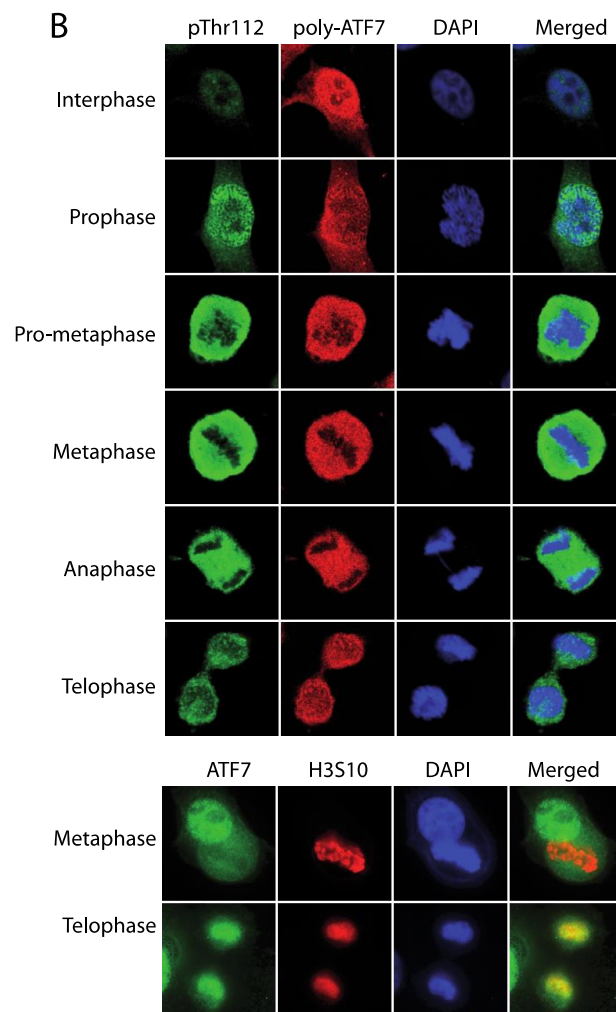
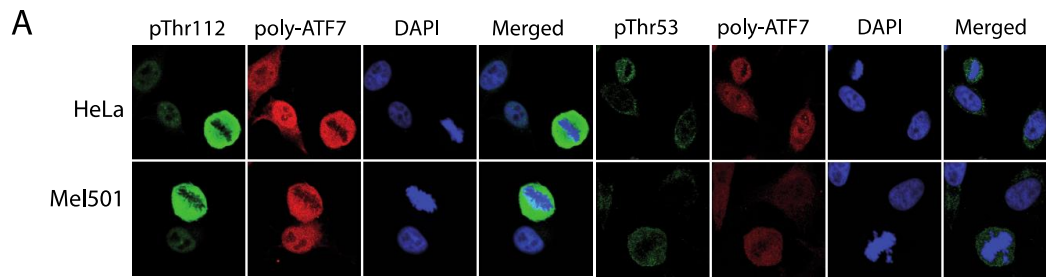


Figure 3: ATF7 is phosphorylated on the Thr112 during mitosis and displaced from the chromatin.

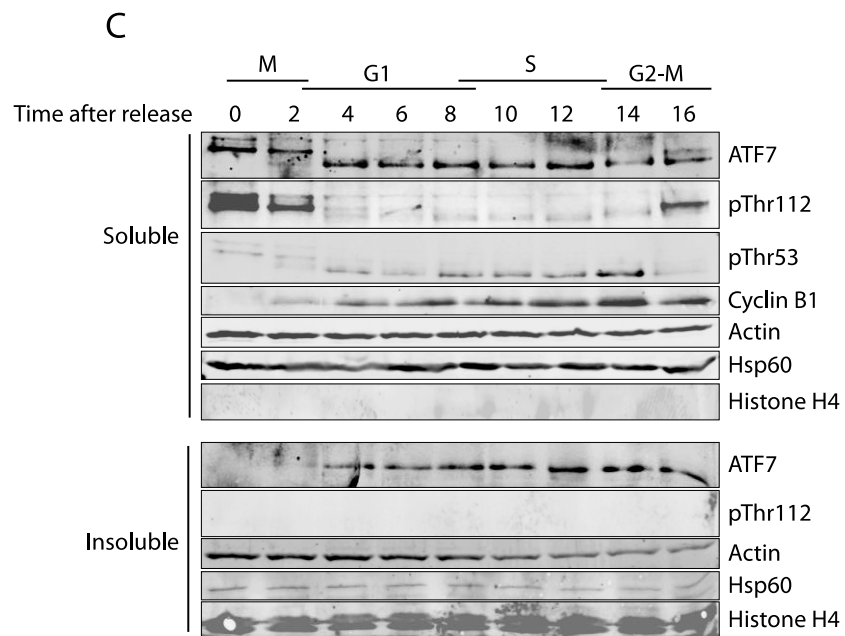


Figure 3: ATF7 is phosphorylated on the Thr112 during mitosis and displaced from the chromatin.

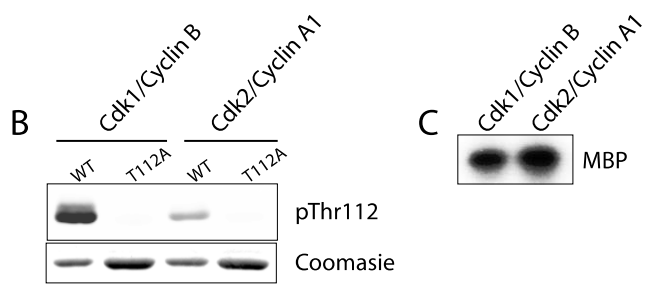
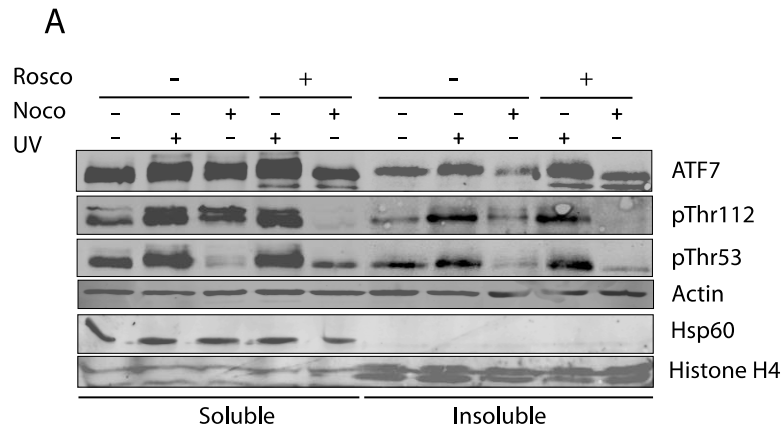


Figure 4: Thr112 phosphorylation is CDK1-dependent.

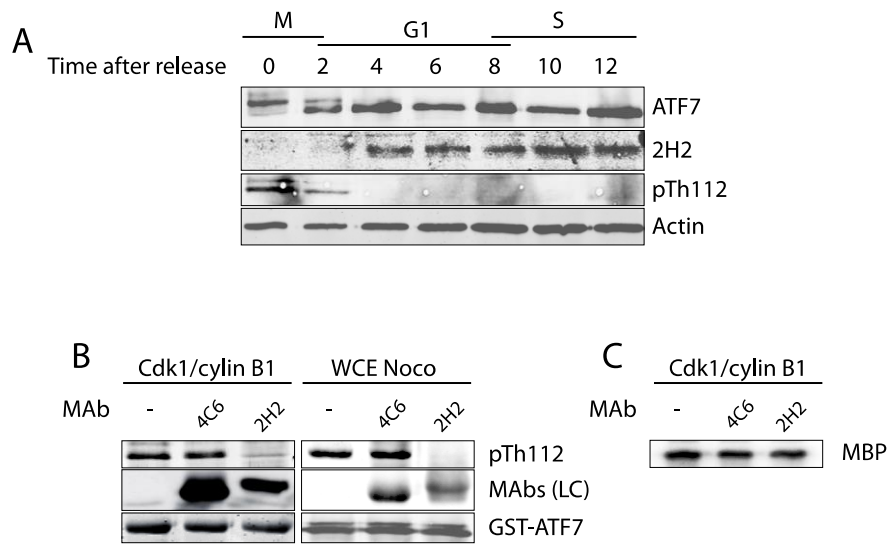


Figure 5: Inhibition of the Thr112 phosphorylation in cellulo.

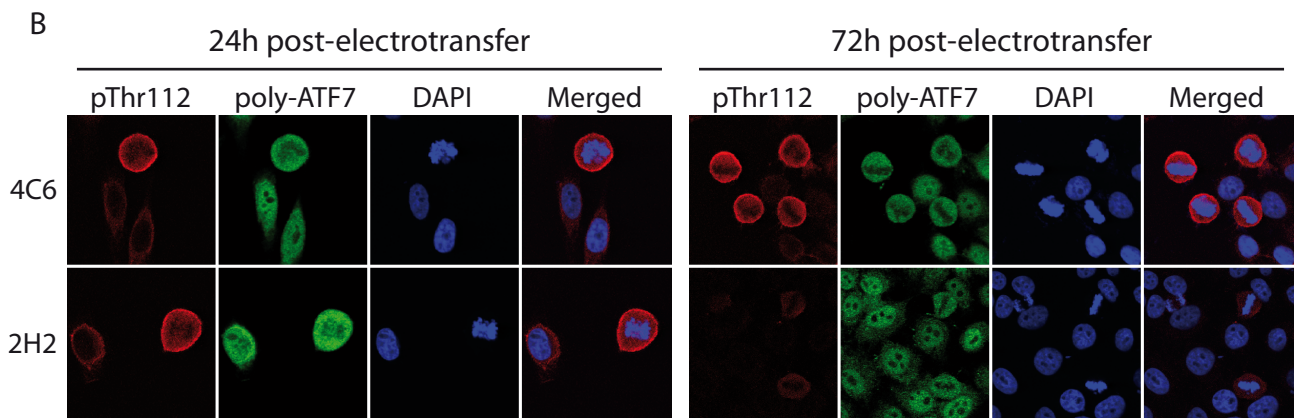
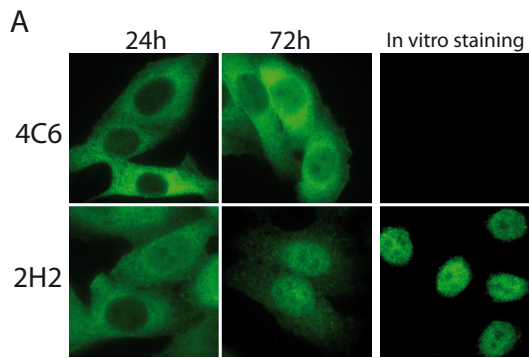
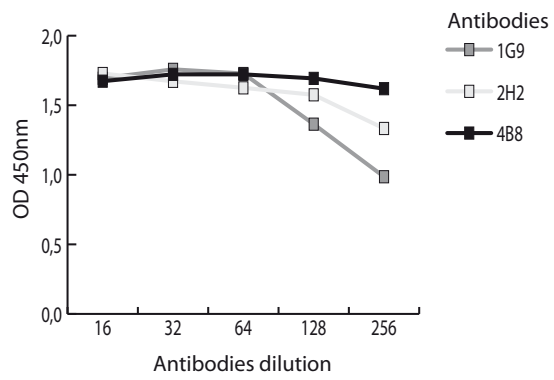
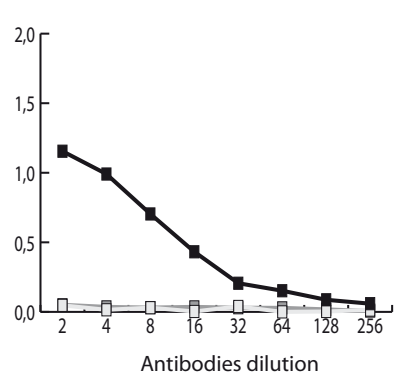


Figure 6: Site-specific monoclonal antibody inhibits specifically the Thr112 phosphorylation in living cells.

A. Non phosphorylated peptide recognition



B. Phosphorylated peptide recognition



Supplementary figure 1

Summary

Post-translational modifications of proteins increase the functional diversity of the proteome. The ATF7 proteins, which belong to the CREB/ATF family of transcription factors, exist in several distinct forms including phosphorylated and SUMOylated forms having distinct cellular activities. Stress and growth factors regulate cellular activity of ATF7 via sequential phosphorylation on two threonine residues, Thr51 and Thr53, resulting in its transcriptional activation. Sumoylation affects its intranuclear localization by delaying its entry into the nucleus thus inhibiting ATF7 transactivation activity. We show in this study that ATF7 is specifically phosphorylated during mitosis on its Thr112 residue by the CDK1/Cyclin B1 active complex. This phosphorylation step is correlated with the exclusion of ATF7 from the condensed chromatin. Using a site-specific mAb that binds specifically to the unphosphorylated Thr112 epitope, we show that while impairing the phosphorylation of the Thr112 in living cells, it does not lead to ATF7 chromatin association. Our results demonstrate the feasibility of using neutralizing mAbs in a dynamic cellular context to directly correlate the role of a specific post-translational modification without influencing the cellular functions of other modified species of a given protein.

Résumé de la thèse

L'objectif de ces travaux de thèse est l'étude des modifications post-traductionnelles de la protéine ATF7. Cette protéine est phosphorylée sur les résidus thréonine (T) 51, T53 et T112 lorsque les cellules subissent un stress (UVs, choc osmotique). Cela permet à la protéine d'être active transcriptionnellement. En absence de stress une fraction de la protéine ATF7 est sumoylée et cela induit une inhibition de son activité transcriptionnelle. Le premier projet consiste à développer des outils qui permettent l'étude de la forme sumoylée de la protéine ATF7. Ces travaux ont permis l'élaboration de scFv-bispécifiques tétramériques qui permettent la reconnaissance simultanée de la protéine ATF7 et de la protéine SUMO1. L'autre projet principal était l'étude du rôle de la phosphorylation de la T112 en absence de stress. Les travaux menés au laboratoire ont permis de montrer que cette thréonine est phosphorylée pendant la phase M du cycle cellulaire et que cet événement est conduit par une autre voie de phosphorylation que la voie du stress et met en jeu la CDK1.

Thesis abstract

The objective of this thesis work was is the study of post-translational modifications (PTM) of the protein ATF7. This protein is phosphorylated on several threonine (T) residues upon stress (UVs, osmotic chock). This allows the protein to be transcriptionally active. In the absence of stress, a fraction of the protein is sumoylated resulting in an inhibition of its transcriptional activity. The first project raise to the development of tools that will enable the study of the sumoylated form of ATF7 protein. This work raise to the development of tetrameric bispecific scFv possessing a simultaneously recognizing ability of the proteins ATF7 and SUMO1. The other main project was the study of ATF7 T112 phosphorylation in the absence of stress. The experiments drove in the lab have shown that thus threonine is phosphorylated during mitosis by a specific pathway, which includes the CDK1.