

Université de Sherbrooke

Mécanismes de régulation de la voie NOTCH1

Par
Jennifer Blain
Programme de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Juillet, 2017

Membres du jury d'évaluation
Pre Marie-Josée Boucher, Département de médecine, Université de Sherbrooke
Pre Nathalie Perreault, Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Université de
Sherbrooke
Pr Jean-Luc Parent, Département de médecine, Université de Sherbrooke
Pr Éric Asselin, Département biologie médicale, Université du Québec à Trois-Rivières

© Jennifer Blain, 2017

« Un pessimiste voit la difficulté dans chaque opportunité, un optimiste voit l'opportunité dans chaque difficulté »

Winston Churchill

«Le succès consiste à aller d'échecs en échecs sans perdre son enthousiasme »

Winston Churchill

RÉSUMÉ

Mécanismes de régulation de la voie NOTCH1

Par

Jennifer Blain

Programme de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La voie NOTCH est activée de manière aberrante dans de nombreux cancers. Son activation implique la liaison d'un récepteur transmembranaire NOTCH à son ligand, engendrant une série de clivages qui libèrent le domaine intracellulaire de NOTCH appelé NIC. Ce dernier transloque au noyau, s'associe à ses partenaires transcriptionnels MAML1 et CSL pour réguler l'expression génique. À prime abord, la signalisation NOTCH apparaît donc simple. Cependant, il existe certainement des mécanismes de régulation précis encore mal connus à ce jour qui permettent de réguler finement cette voie de signalisation.

Bien que des études montrent que NOTCH1 est constamment internalisé, l'activation de NOTCH1 au niveau des endosomes est controversée chez les mammifères. Nous n'avons pas pu déterminer clairement si l'activation de NOTCH1 pouvait se réaliser au niveau des endosomes. Néanmoins, nous avons observé que l'inhibition de l'endocytose réduit les niveaux d'expression de NIC1 suggérant une contribution des processus endocytiques dans la régulation de NOTCH1/NIC1. De plus, nous avons découvert qu'une forme de NIC1 non phosphorylée est rapidement dégradée dans le lysosome tandis qu'une forme de NIC1 hautement phosphorylée est dégradée par le protéasome.

Les mécanismes de régulation de NIC1, une fois libéré, étant peu connus, une équipe avait généré des souris transgéniques ROSA^{Nic1}. Cependant, nous avons remarqué que ce Nic1 était tronqué d'une grande partie de son domaine C-terminal. Nous avons donc généré une version humaine de NIC1 similaire au Nic1 des souris ROSA^{Nic1}, nommé NIC1dC. Nous avons observé que NIC1dC est beaucoup plus stable que NIC1 et qu'il n'est plus dégradé par le protéasome. Cependant, nos résultats montrent qu'une plus grande stabilité de NIC1dC ne confère ni un plus fort pouvoir transcriptionnel à NIC1dC vs. NIC1 ni une plus grande capacité aux cellules de croître en indépendance d'ancrage comparativement aux cellules qui expriment NIC1. Nos analyses de spectrométrie de masse montrent que les partenaires d'interaction de NIC1dC sont différents de NIC1. Finalement, nos résultats démontrent que la délétion du domaine C-terminal de NIC1 augmente la stabilité de son partenaire transcriptionnel MAML1 et prévient sa phosphorylation.

Dans leur ensemble, notre étude montre que la signalisation induite par NIC1dC ne phénotype pas celle de NIC1 et suggère que le domaine C-terminal de NIC1 est important pour récapituler la durée et l'amplitude du signal NOTCH1 afin de médier des réponses cellulaires appropriées.

Mots clés : NIC1, MAML1, domaine C-terminal, endocytose, transcription, phosphorylation

TABLE DES MATIERES

Résumé	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
Liste des annexes	xi
Liste des abréviations	xii
Avant propos	1
1. Introduction	2
1.1. Les fonctions de la voie NOTCH	2
1.1.1. Dans le développement	2
1.1.2. Dans les cancers	4
1.2. L'activation de la voie de signalisation NOTCH.....	7
1.2.1. Les récepteurs NOTCH.....	7
1.2.1.1. Synthèse et maturation des récepteurs NOTCH	7
1.2.1.2. Structures des récepteurs NOTCH	8
1.2.2. Les ligands.....	8
1.2.3. Clivage du récepteur.....	10
1.2.4. Modulation de l'interaction récepteur-ligand.....	12
1.2.4.1. Implication de l'endocytose dans la régulation des récepteurs NOTCH et de ses ligands ..	14
1.2.5. Assemblage du complexe transcriptionnel.....	19
1.2.5.1. Complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1	20
1.2.5.2. Partenaires du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1	23
1.2.5.2.1. p300.....	23
1.2.5.2.2. SKIP	24
1.2.5.2.3. CDK8.....	24
1.2.5.2.4. Autres partenaires transcriptionnels.....	25
1.2.6. Gènes cibles du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1	26
1.2.6.1. Gènes cibles de la signalisation NOTCH dans les cellules tumorales.....	28
1.3. Signalisation NOTCH CSL-indépendante.....	29
1.3.1. Cibles potentielles de la signalisation NOTCH CSL-indépendante.....	30

1.3.2.	Rôles potentiels de la signalisation NOTCH-dépendante CSL-indépendante	31
1.4.	Rôles des modifications post-traductionnelles dans la régulation du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1	32
1.4.1.	Hydroxylation.....	33
1.4.2.	Acétylation	34
1.4.3.	Méthylation	35
1.4.4.	Ubiquitination.....	35
1.4.5.	Phosphorylation.....	36
1.4.6.	Sumoylation	37
1.5.	Hypothèse et objectifs.....	38
2.	Matériel et méthodes	40
2.1.	Culture cellulaire et agents pharmacologiques	40
2.2.	Constructions d'ADN	42
2.3.	Transfections transitoires et stables	44
2.4.	Préparation des extraits protéiques	47
2.4.1.	Extraction des protéines totales : lyse triton.....	47
2.4.2.	Fractionnement subcellulaire	47
2.5.	Immunobuvardage et densitométrie.....	48
2.6.	Immunoprécipitation.....	50
2.7.	Essais phosphatase.....	51
2.8.	Essais luciférase.....	51
2.9.	Extraction d'ARN et réaction de polymérisation en chaîne	52
2.10.	Test de croissance cellulaire	53
2.11.	Croissance en agar mou	54
2.12.	Spectrométrie de masse	54
2.12.1.	Préparation des échantillons.....	54
2.12.2.	Préparation des peptides.....	55
2.12.3.	LC-MS/MS	56
2.12.4.	Quantification et analyse bio-informatique.....	57
2.13.	Analyses statistiques	58
3.	Résultats.....	59

3.1.	Objectif 1 : Déterminer l'impact de la délétion du domaine C-terminal de NIC1 sur l'activité du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1	59
3.1.1.	La délétion du domaine C-terminal de NIC1 influence la stabilité du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1	59
3.1.2.	La délétion du domaine C-terminal de NIC1 modifie son pouvoir transcriptionnel	69
3.1.3.	La perte du domaine C-terminal de NIC1 n'influence pas l'interaction de NIC1 avec ses partenaires CSL et MAML1	76
3.1.4.	NIC1 est plus efficace à promouvoir la croissance en indépendance d'ancrage que NIC1dC	93
3.2.	Objectif 2 : Identifier des mécanismes de régulation post-traductionnelle du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1 influencés par la perte du domaine C-terminal de NIC1	95
3.2.1.	NIC1 est phosphorylé dans son domaine C-terminal	95
3.2.2.	NIC1 influence la phosphorylation de MAML1	99
3.3.	Objectif 3 : Évaluer la participation des processus endocytiques dans la régulation de NOTCH1	106
3.3.1.	NIC1 peut emprunter la voie de dégradation protéasomale et lysosomale	106
3.3.2.	Les processus endocytiques participent à la libération du NIC1	111
4.	Discussion	114
4.1.	Rôles potentiels de l'endocytose dans la régulation de la signalisation NOTCH	114
4.2.	Le domaine C-terminal de NIC1 est important pour récapituler la signalisation NOTCH1	120
4.2.1.	La délétion du domaine C-terminal de GFP-NIC1 stabilise la protéine	121
4.2.2.	Impact potentiel de la délétion du domaine C-terminal de NIC1 sur la signalisation CSL-dépendante et CSL-indépendante	122
4.2.3.	Rôles potentiels des modifications post-traductionnelles dans la régulation de NIC1	127
4.2.4.	La délétion de la partie C-terminale de NIC1 module ses partenaires d'interaction	130
4.2.5.	La délétion du domaine C-terminal influence la réponse cellulaire médiée par NIC1	134

4.3. NIC1, un acteur pivot dans la régulation de son partenaire d'interaction MAML1 .	
.....	138
5. Conclusions et perspectives.....	142
6. Remerciements.....	152
7. Liste des références.....	154
8. Annexes.....	176

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Fonctions de la signalisation NOTCH dans le développement.....	4
Figure 2 : Structures des récepteurs et des ligands de la voie NOTCH chez les mammifères.	9
Figure 3 : La voie de signalisation NOTCH.....	11
Figure 4 : La complexité de la voie NOTCH.....	19
Figure 5 : Modèle classique de l'assemblage et du désassemblage du complexe transcriptionnel ternaire.	21
Figure 6 : Disposition des sites de liaison de CSL à l'ADN de différents promoteurs.	28
Figure 7 : Les modifications post-traductionnelles suggérées de NIC1.	33
Figure 8 : Génération de lignées cellulaires exprimant GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC.....	60
Figure 9 : Cinétique d'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC.	61
Figure 10 : Stabilité de NIC1.....	63
Figure 11 : Stabilité des partenaires de NIC1, CSL et MAML1.	65
Figure 12 : Dégradation protéasomale de NIC1.	67
Figure 13 : L'inhibition du protéasome n'altère pas significativement l'expression des partenaires transcriptionnels de NIC1 : CSL et MAML1.....	69
Figure 14 : Mesure de l'activité transcriptionnelle de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC.	71
Figure 15 : Expression de transcrits de différents composants de la voie NOTCH en présence de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC.....	73
Figure 16 : Expression protéique des cibles de la voie NOTCH suivant l'expression de GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC.....	75
Figure 17 : Distribution subcellulaire des membres du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 dans les cellules U2OS.....	77
Figure 18 : Distribution subcellulaire du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 dans les cellules MiaPaCa-2.	79
Figure 19 : Interaction de NIC1 et NIC1dC avec ses partenaires connus CSL et MAML1. 81	

Figure 20 : Diagramme de Venn des partenaires de GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC identifiés par spectrométrie de masse.	83
Figure 21 : Impact de l'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC sur la croissance des cellules U2OS.	94
Figure 22 : NIC1 est phosphorylé dans son domaine C-terminal.	97
Figure 23 : NIC1 est influencé par la voie MEK/ERK.	99
Figure 24 : Phosphorylation de MAML1 dans les cellules U2OS.	101
Figure 25 : Phosphorylation de MAML1 dans les cellules HEK293T et MIA PaCa-2.	102
Figure 26 : Régulation de la phosphorylation de MAML1.	105
Figure 27 : NIC1 peut être dégradé à la fois par le lysosome et le protéasome.	107
Figure 28 : Une fraction du NIC1 nouvellement libérée emprunte la voie de dégradation lysosomale.	108
Figure 29 : Une fraction de NIC1 nouvellement libérée de manière ligand-indépendante peut être dégradée par le lysosome.	110
Figure 30 : Les processus endocytiques régulent les niveaux d'expression de NOTCH1 et de NIC1.	112
Figure 31 : L'inhibition de l'endocytose prévient partiellement la dégradation protéasomale et lysosomale de NIC1.	113

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Agents pharmacologiques utilisés	40
Tableau 2 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour NIC1dC	43
Tableau 3 : Vecteurs et gènes-rapporteurs utilisés	43
Tableau 4 : Conditions de transfection à la Lipofectamine 2000	45
Tableau 5 : Conditions de transfection au jetPrime®	46
Tableau 6 : Anticorps primaires utilisés	49
Tableau 7 : Anticorps secondaires utilisés.....	50
Tableau 8 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour la réaction en chaîne	53
Tableau 9 : Cycles pour les réactions de polymérase en chaîne	53
Tableau 10 : Partenaires communs de GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC.....	84
Tableau 11 : Protéines associées exclusivement à GFP-NIC1 et identifiées par spectrométrie de masse.	86
Tableau 12 : Protéines associées exclusivement à GFP-NIC1dC et identifiées par spectrométrie de masse suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1dC à partir d'un lysat total de cellules U2OS GFP-NIC1dC.....	87
Tableau 13 : Protéines associées exclusivement à GFP-NIC1dC et identifiées par spectrométrie de masse suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1dC à partir d'un extrait nucléaire de cellules U2OS GFP-NIC1dC.	90
Tableau 14 : Protéines associées à GFP-NIC1dC identifiées par spectrométrie de masse à la fois suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1dC à partir d'un lysat total et d'un extrait nucléaire d'U2OS GFP-NIC1dC.....	92
Tableau 15 : Identification de sites potentiels de phosphorylation de MAML1 par spectrométrie de masse.	103
Tableau 16 : Identification de sites potentiels de phosphorylation de MAML1 par analyses bio-informatiques.....	104

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protéines associées exclusivement à GFP-NIC1dC et identifiées par spectrométrie de masse suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1dC à partir d'un lysat total d'U2OS GFP-NIC1dC.....	176
Annexe 2 : Protéines associées exclusivement à GFP-NIC1dC et identifiées par spectrométrie de masse suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1dC à partir d'un extrait nucléaire d'U2OS GFP-NIC1dC.....	180

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADAM	A desintegrin and metalloproteinase
ADN	Acide d éoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ANK	Domaine composé de répétitions ankyrines
ARN	Acide R ibonucléique
ARNm	ARN m essenger
APS	A mmonium P ersulfate
ATM	A taxia t elangiectasia m utated
BCA	B icinchoninic acid
BioID	Proximity-dependent biotin id entification
bHLH	B asic h elix- L oop- h elix
BSA	B ovine S erum A lbumin
C	Cytoplasme
CARM1	Coactivator associated arginine methyltransferase I
CDC2	C ell d ivision c ycle protein 2 homolog
CDK	c yclin- d eependent k inase
ChIP	C hromatin i mmunoprecipitation
CHX	C yclo h eximide
CK2	C aséine k inase 2
conA	C oncanavaline A
CRD	Domaine riche en cystéine
CSL	C BF1 (mammifère)/ S uppresseur de Hairless (drosophile)/ L AG-1(<i>C. elegans</i>)
DAPT	N -[N -(3,5-Difluorophenacetyl)- L -alanyl]- S -phenylglycine t-butyl este
DI	D elta ligand
DLL	D elta-like ligand
DMEM	D ulbecco's m odified E agle's m edium
DMSO	D iméthylsulfoxyde
DNAPK	D N A P rotein k inase
DOS	D elta e t O SM-11-like protein
Dox	D oxycycline
DTT	D ithiothreitol
DSH	D IS H E V ELLED
DSL	D elta- S errate- L AG2
E(spl)	E nhancer of s plit complex
EDTA	Acide É thylène D iamine T étraacétique
EGF-like	E pidermal G rowth F actor-like
EGTA	Acide É thylène G lycol T étraacétique
ER α	E strogen receptor a lpha

ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERKt	ERK total
FBW7	F-Box and WD repeat domain containing 7
FBS	Foetal bovine serum
FIH	Asparagine hydroxylase inhibitrice du facteur HIF1 α
FT	Flp-In™ T-REx™
GAPDH	Glyc éraldéhyde-3- phosphate déshydrogénase
GCN5	General control of amino acid synthesis 5
GEF	facteur d'échange de nucléotides guanyliques
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK3	Glycogène Synthase kinase 3
HAT	Histone acétyl transférase
HD	Domaine d'hétérodimérisation
HEK293T	Human embryonic kidney 293T
HEPES	Acide 4-(2- hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfate
HES1	Hairy/enhancer of split 1
HEY	Hairy/enhancer of split avec motif yrpw
HIF α	Hypoxia inducible factor 1α
HPLC	Chromatographie en phase liquid à haute performance
HRP	Horseradish peroxydase
IP	Immunoprécipitation
JAG	Jagged
JNK	c- JUN N-terminal kinase
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
kDa	kiloDalton
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LEF	Lymphoid enhancing factor
LNR	Région riche en LIN12-NOTCH
LT	Lysat Total
m/z	Ratio masse sur charge
MAML	Mastermind-like
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK kinase
MVB	Corps multivésiculaires (Multivesicular bodies)
N	Noyau
NEXT	Récepteur NOTCH dépourvue de son domaine extracellulaire
NGN3	Neurogénine 3
NH ₄ Cl	Chlorure d'ammonium
dNic	NIC version drosophile
NIC1	Notch intracellular domain version humaine
Nic1	NIC1 version murine
NIC1dC	NIC1 tronqué de son domaine C-terminal
NLS	Nuclear localization sequence
ns	Non significatif
Nt	Nucléotides
NRR	Région de régulation négative

PanIn	Lésions néoplasiques intraépithéliales pancréatiques
PCAF	p300/CBP-associated factor
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
p-ERK	ERK phosphorylé
PEST	Domaine riche en p roline, acide glutamique (E), sérine et thréonine
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3-kinase
PIN1	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerise NIMA-interacting 1
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PPM	Partie par million
PMSF	Fluorure de p hénul m éthylsulfonyle
RAM	RBP-J Kappa-associated module
RPM	Rotations par minute
S1, S2, S3	Sites de clivage du récepteur NOTCH
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	Serrate
shARN	Small hairpin ARN
SILAC	Stable isotope labeling by amino acid in cell culture
SKIP	Ski-interacting protein (SNW domain-containing protein 1 = SNW1)
SPS	Su(H) Paired Sites
TAD	Transactivation domain
T-ALL	T-cell acute lymphoblastic leukemia
TCF	T-cell factor
TK	Thymidine kinase
TLE	Transducin-like Enhancer of split1
Tw1	Twist
vol	volume
vv	Vecteur vide
WNT	Wingless integration site

AVANT PROPOS

Certains résultats présentés dans cette thèse font l'objet d'une publication acceptée le 24 mai 2017 : Blain J., Bédard J., Thompson M., Boisvert F.-M., Boucher M.-J., 2017, *C-terminal deletion of NOTCH1 intracellular domain (NI^{ICD}) increases its stability but does not amplify and recapitulate NI^{ICD} -dependent signalling*, Scientific reports 7(1):5034(Blain et al., 2017).

1. INTRODUCTION

La signalisation NOTCH est importante dans le développement. Elle est éteinte dans la plupart des tissus chez l'adulte. C'est une voie de signalisation très conservée et d'architecture simple qui semble donc demander une régulation fine et complexe, mal connue à ce jour. Comprendre cette régulation est important puisque la voie NOTCH est activée de manière aberrante dans plusieurs pathologies dont le cancer.

1.1. Les fonctions de la voie NOTCH

1.1.1. Dans le développement

La signalisation NOTCH est très conservée dans le règne animal, on la retrouve de *Caenorhabditis elegans* jusqu'à l'homme. Cette voie de signalisation joue des rôles très diversifiés au sein de la cellule allant de la prolifération cellulaire jusqu'à l'apoptose. Cependant, celle-ci possède un rôle prédominant au cours du développement notamment au niveau du maintien des cellules souches (Figure 1C), de la spécification du destin cellulaire et de la différenciation (Radtke & Raj, 2003). Dans l'organogenèse du pancréas, l'activation de la voie NOTCH est importante pour assurer la prolifération des cellules progénitrices et prévenir la différenciation prématurée (Edlund, 2002). Entre autres, l'activation de la voie NOTCH a été décrite pour inhiber la transcription de *NGN3* (NEUROGÉNINE 3) en plus de déstabiliser la protéine NGN3, un facteur de transcription impliqué dans la détermination des cellules endocriniennes (J. C. Lee *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2013). Ainsi, l'activation de la voie NOTCH prévient la différenciation des cellules progénitrices en cellules endocrines dans les stades précoces du développement du pancréas.

Un des rôles de la voie NOTCH au cours du développement est la détermination cellulaire soit par inhibition latérale (Figure 1A) soit par signal inductif (Figure 1B) (Radtke & Raj, 2003). En plus du modèle pancréatique décrit ci-haut, le principe de l'inhibition latérale est démontré chez la drosophile où, à partir d'un précurseur commun, la voie NOTCH permet de diriger le précurseur vers un destin épidermal ou neuronal (Figure

1A). Les précurseurs expriment à la fois les ligands et le récepteur de la voie NOTCH. Au cours du temps, certaines cellules expriment préférentiellement les ligands et d'autres le récepteur par des mécanismes encore inconnus. Les cellules qui expriment le récepteur sont les cellules réceptrices du signal NOTCH et adoptent un destin épidermal tandis que les cellules qui expriment les ligands adoptent un destin neuronal.

La participation de la voie NOTCH dans le destin cellulaire peut aussi se faire via signal inductif (Figure 1B). Chez la souris, l'activation de la voie NOTCH dans les cellules précurseuses de lymphocytes, à leur entrée dans le thymus, permettra leur différenciation en cellules T. En absence de signalisation NOTCH, les cellules précurseuses de lymphocytes adopteront un destin de cellules B par défaut (Borggreffe & Oswald, 2009).

La voie NOTCH peut également induire un signal menant à la différenciation terminale (Figure 1D). À ce jour, cette fonction de la voie NOTCH a été observée seulement dans les kératinocytes. En effet, l'activation de la voie NOTCH permet l'arrêt du cycle cellulaire et favorise la différenciation des kératinocytes (Lowell *et al.*, 2000).

Ainsi, la voie NOTCH assume de nombreuses fonctions très importantes et variées au cours du développement dont favoriser la prolifération cellulaire et le maintien à l'état de cellules souches. Ces processus étant aussi impliqués dans la transformation/carcinogenèse, il n'est pas étonnant que cette voie soit souvent dérégulée dans de nombreux cancers.

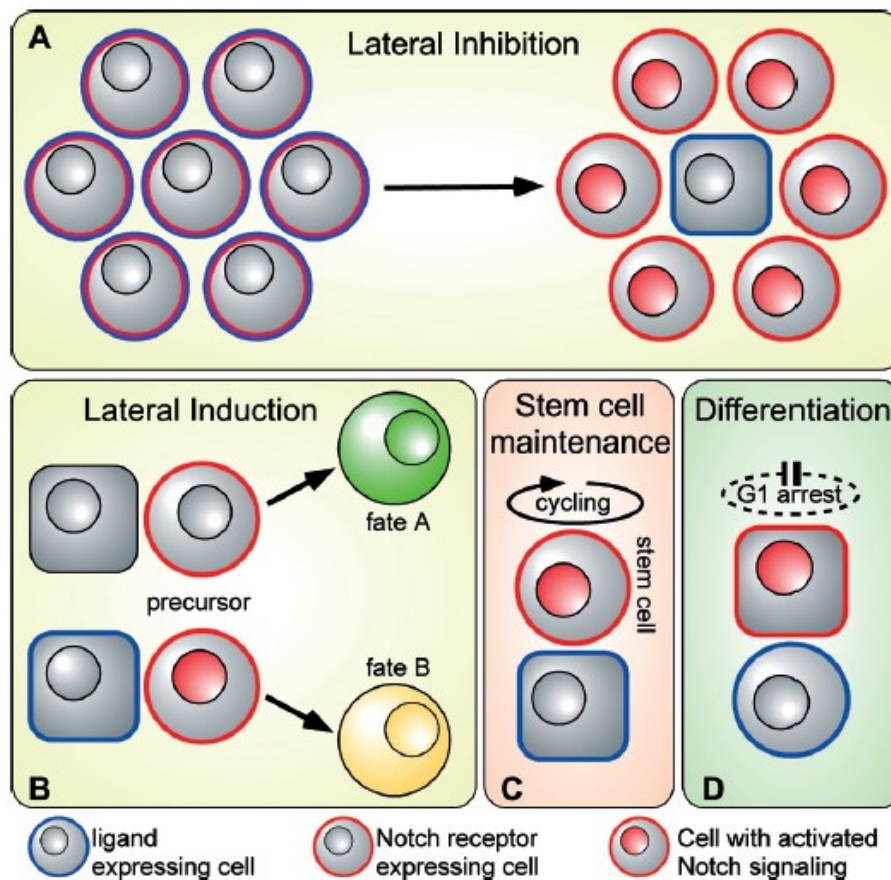


Figure 1 : Fonctions de la signalisation NOTCH dans le développement.

La voie NOTCH participe à la détermination cellulaire soit par signal latéral (A) soit par induction latérale (B). Le signal NOTCH favorise également le maintien du caractère de cellule souche (C) et la différenciation (D). (Borggreffe & Oswald, 2009) (Autorisation : 4104980991147).

1.1.2. Dans les cancers

L'activation de la voie NOTCH a été montrée dans de nombreux cancers dont quelques-uns sont présentés ci-dessous (Radtke & Raj, 2003; Leong & Karsan, 2006).

Le cancer pancréatique est le 4^e cancer le plus mortel au Canada en 2016 d'après Statistiques Canada. Le diagnostic tardif, causé par l'absence de symptômes, et les traitements peu efficaces contribuent certainement à expliquer le faible taux de survie des patients à 5 ans soit 8%. Le modèle de carcinogenèse pancréatique propose que des lésions néoplasiques intraépithéliales pancréatiques (PanIN1-3) soient impliquées dans l'initiation

et la progression du cancer pancréatique (Bardeesy & DePinho, 2002). Dès le premier stade de PanIN, des mutations génétiques sont observées. On y retrouve l'oncogène KRAS qui est muté dans 30% des PanIN de grade 1 et dans plus de 90% des cancers pancréatiques (Bardeesy & DePinho, 2002). L'activation de la GTPase KRAS permet d'initier de nombreuses voies de signalisation telles que RAF/MEK/ERK et PI3K/AKT responsable de nombreux effets cellulaires comme la prolifération, la survie et l'invasion. De plus, des mutations inactivatrices de suppresseurs de tumeurs tels que *TP53*, *SMAD4* et *CDKN2A* sont observées très tôt lors de la carcinogenèse pancréatique. La protéine p53, codée par *TP53*, conduit à l'arrêt du cycle cellulaire ou à l'apoptose en réponse à des signaux de stress ou à des dommages de l'ADN. *SMAD4* code pour un composant clé, SMAD4, de la voie TGF β responsable de l'inhibition de la croissance cellulaire en bloquant le transition G1/S ou en induisant l'apoptose. *CDKN2A* code pour deux protéines : p16INK4A qui inhibe la phosphorylation de pRB prévenant ainsi la transition G1/S et p14ARF qui stabilise p53. Les mutations de *TP53*, *SMAD4* et *CDKN2A* sont retrouvées tout au long de la progression des PanINs et dans les cancers pancréatiques (Bardeesy & DePinho, 2002). Des études montrent que la voie NOTCH est réactivée dès les PanIN et aussi dans le cancer pancréatique. En effet, une augmentation de l'expression protéique et ARNm des différents composants de la voie NOTCH ainsi que des gènes cibles sont observés dans les lignées cellulaires pancréatiques tumorales humaines, les PanIN et les tissus pancréatiques cancéreux (Miyamoto *et al.*, 2003; Buchler *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2008; Plentz *et al.*, 2009; Mullendore *et al.*, 2009). Plentz *et al.* ont montré l'importance de la voie NOTCH dans le maintien et la progression du cancer pancréatique (Plentz *et al.*, 2009). En effet, l'inhibition de la voie NOTCH dans les cellules issues de PanIN ou de cancer pancréatique entraîne une diminution de la prolifération de ces cellules et une réduction de la croissance en indépendance d'ancrage. De plus, les auteurs montrent que l'inhibition de la voie NOTCH limite la progression tumorale dans un modèle murin (Pdx1-Cre LSL-KrasG12D p53Lox/+) de cancer pancréatique. Ces observations suggèrent que la voie NOTCH est activée dès les stades PanIN, qu'elle est maintenue active et participe à la carcinogenèse pancréatique.

Le cancer pancréatique n'est pas le seul type de cancer qui présente une signalisation aberrante de la voie NOTCH. En effet, plusieurs autres études ont démontré son implication

au niveau du cancer du sein ainsi que dans les cancers hématopoïétiques. Le cancer du sein, représente la deuxième cause de décès par cancer chez les femmes en 2016 au Canada avec un taux de survie après 5 ans d'environ 90%. La voie NOTCH serait activée de manière aberrante et son activation est associée à un faible taux de survie (Reedijk *et al.*, 2005). L'expression des différents composants de la voie NOTCH a été détectée plus fortement dans les tissus cancéreux de glandes mammaires que dans les tissus normaux (Mittal *et al.*, 2009). L'inhibition de la voie NOTCH dans les cellules humaines tumorales de glandes mammaires entraîne une augmentation d'apoptose, une diminution de prolifération cellulaire et de croissance en indépendance d'ancrage ainsi qu'une diminution du volume de la tumeur suite à l'injection sous-cutanée des cellules dans la souris (Zang *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2015).

Finalement, les cancers hématopoïétiques sont également reconnus pour présenter une signalisation NOTCH aberrante. Les leucémies, tous types confondus, sont la sixième cause de mort par cancer au Canada en 2016. D'après statistiques Canada, le taux de survie à 5 ans des personnes atteintes de leucémies s'élève à près de 60%. La voie NOTCH a un rôle important particulièrement dans le développement des leucémies lymphoblastiques aiguë à cellules T (T-ALL). Dans ce type de cancer, une translocation chromosomique entre les chromosomes 7 et 9 impliquant une recombinaison inter-chromosomique de la région codant pour le fragment actif de la voie NOTCH (chromosome 9) et le gène du récepteur des cellules T (chromosome 7) (Ellisen *et al.*, 1991; Reynolds *et al.*, 1987) ou des mutations (Weng *et al.*, 2004) expliquent la régulation aberrante de la voie NOTCH. À noter que dans les cancers solides peu de mutation ont été identifiées pour être responsables de l'activation aberrante de la signalisation NOTCH à l'exception du cancer du sein (Wang *et al.*, 2015). La signalisation NOTCH est responsable de la croissance cellulaire dans les T-ALL puisque son inhibition amène à un arrêt du cycle cellulaire (Weng *et al.*, 2004; Palomero *et al.*, 2006; H. Liu *et al.*, 2010) et à l'induction de l'apoptose (Lewis *et al.*, 2007).

Ces exemples de cancer dans lesquels la voie NOTCH est activée de manière aberrante supportent l'importance de garder sous contrôle cette signalisation afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et tissulaire.

1.2. L'activation de la voie de signalisation NOTCH

1.2.1. Les récepteurs NOTCH

1.2.1.1. Synthèse et maturation des récepteurs NOTCH

Les protéines de la famille NOTCH sont des récepteurs transmembranaires. Il existe 4 récepteurs NOTCH (NOTCH1-4) chez les mammifères (Figure 2) et un seul récepteur NOTCH (dNotch) chez la drosophile (Kopan & Ilagan, 2009). La principale différence entre les récepteurs NOTCH et dNotch est le nombre de sous-unités constituant le récepteur. Le récepteur dNotch est formé d'une seule sous-unité tandis que les récepteurs NOTCH sont formés de 2 sous-unités.

Chez les mammifères, les récepteurs NOTCH sont synthétisés en précurseurs sous forme de monomère (Kopan & Ilagan, 2009). Lors de leur transit dans l'appareil de Golgi pour leur maturation, les récepteurs monomériques sont clivés à un site S1 par des convertases de type furine (Figures 3 et 4). Les deux sous-unités qui en résultent sont tout de même maintenues entre elles via des interactions non-covalentes calcium-dépendantes (Figure 3). La déstabilisation de cette interaction calcium-dépendante par un chélateur de cation bivalent comme l'EGTA ou l'EDTA peut activer la voie NOTCH de manière ligand-indépendante (Tremblay *et al.*, 2013). Cette étape de clivage en S1 est requise pour la localisation des récepteurs à la surface cellulaire (van Tetering & Vooijs, 2011). En effet, l'inhibition des convertases de type furine empêche le clivage S1 du récepteur et le transport de ce dernier vers la membrane plasmique (Logeat *et al.*, 1998).

Suite à leur synthèse, les récepteurs NOTCH subissent d'autres modifications post-traductionnelles avant leur transport à la membrane plasmique (Kopan & Ilagan, 2009). En effet, dans le réticulum endoplasmique, les récepteurs sont fucosylés par l'O-fucosyltransférase O-fut1/POFUT1 (drosophile/mammifères) sur des sérines et thréonines situées dans les répétitions EGF-Like, ce qui assure un bon repliement des récepteurs. La fucosylation des récepteurs NOTCH est principalement importante pour la O-glycosylation

subséquente des récepteurs dans l'appareil de Golgi par les protéines de la famille FRINGE.

1.2.1.2. Structures des récepteurs NOTCH

En N-terminal des récepteurs se trouve un domaine extracellulaire qui contient entre 29 et 36 répétitions en tandem EGF-Like (Kopan & Ilagan, 2009). Certaines de ces répétitions EGF-Like médient l'interaction avec les ligands, notamment les répétitions 11-12 et 24-29. Les répétitions EGF-Like sont suivies d'une région régulatrice négative unique (NRR), composée de 3 répétitions Lin12-Notch riche en cystéines (LNR) et d'un domaine d'hétérodimérisation (HD) où les deux sous-unités du récepteur interagissent. Cette région NRR a un rôle très important puisqu'elle empêche l'activation du récepteur en absence de ligand (Kopan & Ilagan, 2009).

Le domaine intracellulaire est composé d'un domaine RAM (RBP-J Kappa-associated module), important pour l'association du domaine intracellulaire de NOTCH (NIC) à son partenaire transcriptionnel CSL (CBF1-Su(H)-Lag1) et d'un domaine ANK composé de 7 répétitions ankyrines, jouant un rôle dans la modulation de l'activité transcriptionnelle. Ce domaine ANK est encadré de séquences de localisation nucléaire (NLS) bipartites de chaque côté du domaine ANK puis il est suivi d'un domaine de transactivation (TAD) et d'un domaine riche en acides aminés proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T) (PEST), domaine notamment impliqué dans la stabilité des NIC (Figure 2) (Rechsteiner & Rogers, 1996; Kopan & Ilagan, 2009).

1.2.2. Les ligands

Les ligands des récepteurs NOTCH sont également des protéines transmembranaires (Figure 2) (D'Souza *et al.*, 2010). Chez les mammifères, il existe 5 ligands soient : DELTA-LIKE 1, 3, 4 (DLL1, 3, 4) et JAGGED (JAG1, 2) tandis que chez la drosophile, il en existe 2 : Delta (Dl) et Serrate (Ser). Tous les ligands sont composés d'un domaine DSL (Delta/Serrate/Lag-2) en N-terminal suivi de répétitions EGF-Like. Le domaine DSL est nécessaire mais non suffisant pour l'interaction aux répétitions EGF-Like 11-12 des récepteurs NOTCH (Bray, 2006; D'Souza *et al.*, 2010). Les 2 ligands chez la drosophile et les ligands JAG1, 2 et DLL1 diffèrent par la présence d'un motif conservé appelé DOS

(Delta and OSM-11-like protein) qui serait, en coopération avec le domaine DSL, nécessaire pour l'interaction avec les récepteurs. Finalement, les ligands JAG1, 2 chez les mammifères et Serrate chez la drosophile ont un domaine riche en cystéine (CR) qui pourrait moduler les interactions ligand-récepteur (Lissemore & Starmer, 1999).

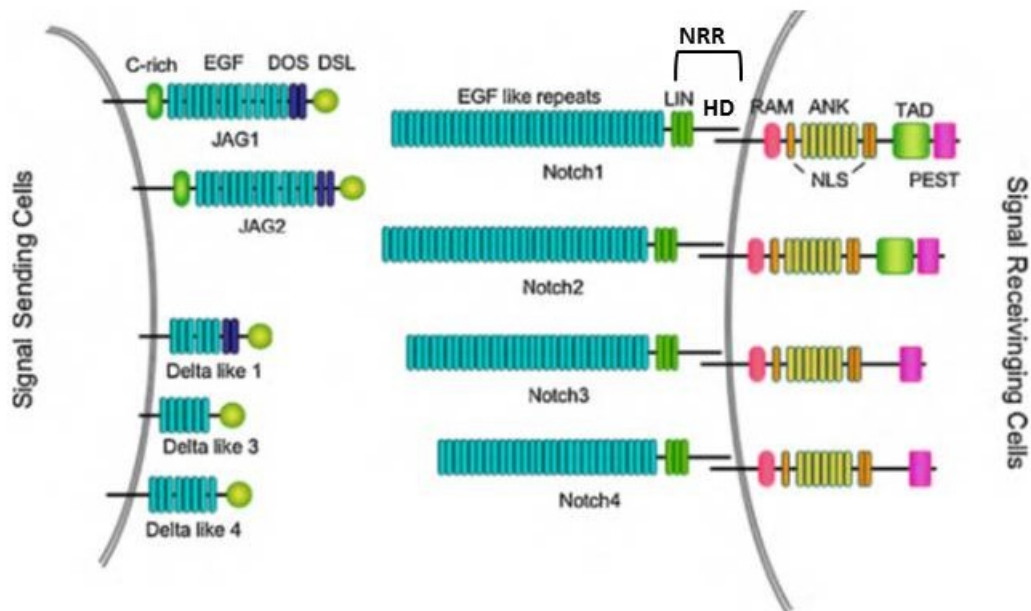


Figure 2 : Structures des récepteurs et des ligands de la voie NOTCH chez les mammifères.

Représentation graphique des domaines des 4 récepteurs NOTCH (NOTCH1-4) et des 5 ligands : JAGGED (JAG1, 2) et DELTA-LIKE (DLL1, 3, 4).

C-rich = Domaine riche en cystéine

DOS = Delta and OSM-11-like protein

DSL = Delta/Serrate/Lag-2

LIN = Répétitions Lin12-Notch

NRR = Région régulatrice négative

HD = Domaine d'hétérodimérisation

RAM = Domaine RAM (RBP-J Kappa-associated module)

NLS = Séquence de localisation nucléaire

ANK = Domaine ANK

TAD = Domaine de transactivation

PEST = Domaine riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T)

Modifiée de (Yashiro-Ohtani *et al.*, 2010) (Autorisation : 4110370445701)

1.2.3. Clivage du récepteur

Les récepteurs et les ligands étant transmembranaires, leur liaison nécessite une proximité cellule-cellule. Lors de l'interaction du récepteur avec son ligand, une séquence de clivages protéolytiques des récepteurs NOTCH est amorcée à la membrane plasmique (Figure 3) (Kopan & Ilagan, 2009). Le premier clivage est médié par les protéases transmembranaires ADAM (A disintegrin and metalloprotease) au site 2 (S2) au niveau de la région NRR (région régulatrice négative) du récepteur. Il existe plusieurs membres de la famille ADAM qui, malgré le fait qu'ils produisent le même type de clivage, sont utilisés dans différents contextes cellulaires pour activer la voie NOTCH. En effet, ADAM10 clive NOTCH1 suite à sa liaison avec son ligand tandis que ADAM17 clive NOTCH1 de manière ligand-indépendante et ne peut pas remplacer fonctionnellement l'activité d'ADAM10 (Bozkulak & Weinmaster, 2009). Ainsi, le choix de la protéase dépend du contexte. Bien que NOTCH1 et NOTCH2 soient structurellement similaires, il existe des différences notamment dans le clivage en S2. NOTCH2 est clivé par ADAM10 donc de manière ligand-dépendante mais il ne peut pas être clivé par ADAM17. Ainsi, NOTCH2 ne pourrait pas être activé et clivé de manière ligand-indépendante (Habets *et al.*, 2015).

Le clivage des récepteurs au site S2 permet de créer un intermédiaire instable du récepteur NOTCH qui est dépourvu de son domaine extracellulaire (NEXT) (Kopan & Ilagan, 2009). NEXT pourra alors subir un deuxième clivage au site S3 médié par le complexe γ -sécrétase. Ce dernier clivage permet alors la libération du domaine intracellulaire de NOTCH (NIC version humaine, Nic version murine). L'activation de la voie NOTCH peut être prévenue à cette étape en interférant avec le complexe γ -sécrétase, par exemple via un inhibiteur tel le DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester), ce qui prévient la libération de NIC (Tsao *et al.*, 2008; Tremblay *et al.*, 2013).

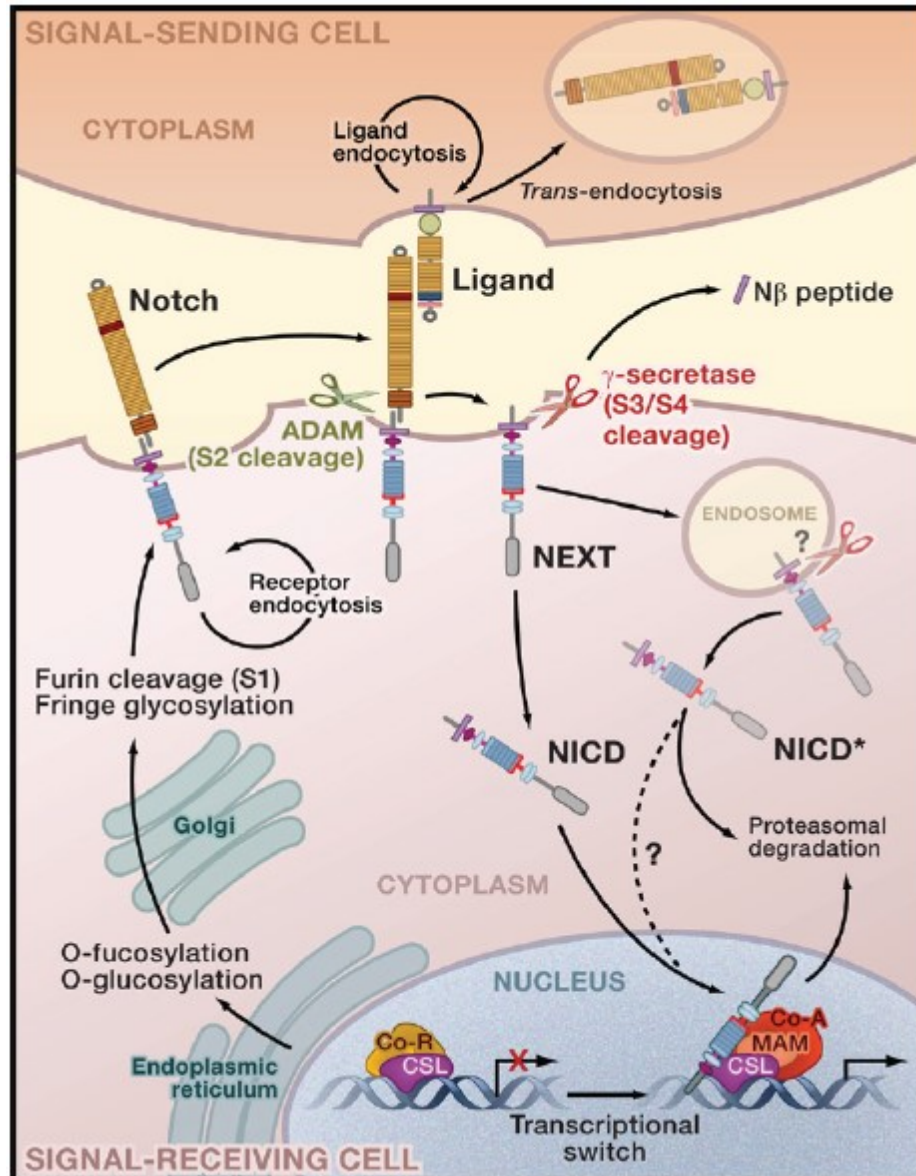


Figure 3 : La voie de signalisation NOTCH.

La maturation du récepteur NOTCH monomère dans l'appareil de Golgi implique le clivage en S1 afin d'obtenir un récepteur NOTCH hétérodimérique. Au cours de son passage dans l'appareil de Golgi, les récepteurs subissent d'autres modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation avant d'être exprimés à la surface cellulaire. L'activation de la voie NOTCH est réalisée suite à la liaison du récepteur à son ligand pour engendrer une série de clivages au site S2 puis S3 du récepteur NOTCH. Le clivage de NOTCH permet de libérer le fragment intracellulaire de NOTCH, NIC (ou NICD), qui transloque alors au noyau pour s'associer à ses partenaires afin de former le complexe transcriptionnel ternaire NIC/CSL/MAML. Il en résulte l'activation de la transcription des gènes cibles de NOTCH.

NEXT = Récepteur NOTCH dépourvue de son domaine extracellulaire

NICD* = NIC libéré de NOTCH dans les endosomes

Co-R = Co-répresseur

Co-A = Co-activateur
(Kopan & Ilagan, 2009) (Autorisation : 4105490335636)

1.2.4. Modulation de l'interaction récepteur-ligand

Il a été suggéré que les différentes interactions ligand-récepteur pouvaient initier des réponses NOTCH distinctes. Par exemple, l'interaction des récepteurs NOTCH avec JAG1 engendrerait une réponse plus faible que celle engendrée suite à l'interaction avec DLL1. Cette réponse plus faible se traduirait par la transcription d'un sous-groupe de gènes cibles qui répondent à de faible niveau d'activation de NOTCH comme *HEY1*. D'autres gènes cibles tels que *HES5* requièrent un fort signal NOTCH pour leur expression (Bray, 2016). Ainsi, la force d'interaction ligand-récepteur, en influençant l'efficacité de clivage du récepteur, participerait à la détermination de l'amplitude du signal NOTCH conduisant à un patron transcriptomique distinct responsable d'une réponse cellulaire précise.

De plus, la glycosylation du récepteur par la famille FRINGE dans l'appareil de Golgi a été suggéré pour moduler l'interaction des récepteurs et des ligands afin de moduler l'activation de la voie NOTCH. Chez la drosophile, la glycosylation par dFringe favorise l'interaction de dNotch avec le ligand Delta plutôt qu'avec le ligand Serrate (Panin *et al.*, 1997). L'impact fonctionnel de la glycosylation des récepteurs NOTCH est plus difficile à démontrer chez les mammifères à cause des multiples isoformes de récepteurs, ligands et O-glycosyltransférases (LUNATIC FRINGE, MANIC FRINGE et RADICAL FRINGE). Une étude a montré que Lunatic fringe, version murine, inhibe la signalisation Notch1 induite par Jag1 et non par Dll1. La même étude montre que Lunatic fringe potentialise la signalisation Notch2 à la fois médiée par Jag1 et Dll1. Ces résultats suggèrent que Lunatic fringe module différemment la signalisation selon le récepteur Notch (Hicks *et al.*, 2000). De plus, la modulation d'interaction récepteur-ligand par les protéines de la famille FRINGE chez les mammifères semble être dépendante du type cellulaire. Par exemple, Lunatic fringe promeut l'interaction Notch-Delta dans les cellules T alors qu'il inhibe cette interaction dans les somites (Kopan & Ilagan, 2009).

Récemment, une étude intéressante a montré que FRINGE était capable de moduler la spécificité et la directionnalité (cellule réceptrice ou émettrice) du signal NOTCH (LeBon *et al.*, 2014). En effet, la plupart des études considèrent qu'une cellule n'exprime que les ligands ou que les récepteurs NOTCH. Pourtant, elle peut exprimer à la fois les ligands et les récepteurs avec des ratios différents. Les auteurs ont surexprimé une des 3 protéines de la famille Fringe, Notch1, Dll1 et Jag1. Ils ont observé que l'expression de Lunatic ou Manic fringe augmentaient l'activation de Notch1 lorsque celui-ci liait le ligand Dll1 sur une cellule voisine (*trans* activation). Cependant, les modifications médiées par Lunatic et Manic fringe sur Notch1 inhibait Notch1 lorsque celui-ci liait un Dll1 exprimé sur la même cellule (*cis* inhibition). À l'opposé, l'expression de Lunatic et Manic fringe diminuait à la fois la *trans* activation et la *cis* inhibition de Notch1 par Jag1. Quant à Radical fringe, son expression influençait seulement la *trans* activation de Notch1 peu importe le ligand lié i.e. Dll1 ou Jag1. Ces résultats supportent un rôle pour les protéines de la famille FRINGE dans la spécificité du signal NOTCH. Ainsi, au sein d'une cellule, l'activité de la signalisation NOTCH dépendrait du niveau d'expression des récepteurs, de leurs modifications post-traductionnelles par les protéines de la famille FRINGE, du niveau d'expression des ligands et des types de ligands exprimés. L'ensemble de ces facteurs permettraient de moduler l'intensité du signal NOTCH et de définir si la cellule agit principalement comme cellule émettrice du signal NOTCH (expression des ligands prédominante et/ou *cis* inhibition importante) ou si la cellule reçoit le signal NOTCH (expression des récepteurs prédominante et/ou *trans* activation importante). Cette étude soulève clairement la complexité de la signalisation NOTCH dont l'activité ne peut être déduite que par les niveaux d'expression des récepteurs et des ligands.

Enfin, la régulation des ligands peut également moduler l'interaction récepteur-ligand et peut jouer un rôle dans l'activation de la voie NOTCH. Les ligands subissent également des clivages protéolytiques par la famille ADAM décrite dans la section 1.2.3. Ce clivage a pour conséquence de réduire la disponibilité des ligands interagissant avec les récepteurs. À noter que le clivage des ligands par les protéases de la famille ADAM libère le domaine extracellulaire résultant en un ligand soluble. Le rôle du ligand soluble demeure toutefois controversé. Des études suggèrent que le ligand soluble perd sa capacité d'activer les récepteurs NOTCH alors que d'autres observations laissent présager que, sous certaines

conditions, l'agglomération des ligands solubles serait apte à favoriser le clivage des récepteurs NOTCH (D'Souza *et al.*, 2010).

Dans leur ensemble, les données de la littérature suggèrent que la régulation et le type d'interaction récepteur-ligand peut moduler la force du signal NOTCH et ainsi dicter la réponse cellulaire.

1.2.4.1. Implication de l'endocytose dans la régulation des récepteurs NOTCH et de ses ligands

Comme la plupart des protéines transmembranaires, les récepteurs NOTCH et ses ligands sont internalisés pour pouvoir contrôler leur disponibilité à la surface membranaire et réguler ainsi l'activation de la voie NOTCH. Ce processus, appelé endocytose, est un mécanisme de transport de molécule dans la cellule. Les récepteurs sont alors dans des vésicules, nommées endosomes qui permettent de les envoyer soit au recyclage vers la membrane plasmique soit à la dégradation lysosomale. Le signal d'internalisation des récepteurs est en général l'ubiquitination par une ubiquitine ligase.

Plusieurs études montrent qu'en absence de ligand, le récepteur Notch1 est constitutivement internalisé (McGill *et al.*, 2009; Kopan & Ilagan, 2009; Moretti & Brou, 2013). L'endocytose des récepteurs NOTCH permettrait de contrôler leur disponibilité à la membrane plasmique (Figures 3 et 4). Chez les mammifères, plusieurs études montrent que la disponibilité des récepteurs à la membrane plasmique se produit par 2 mécanismes qui font suite à l'internalisation : le recyclage à la membrane plasmique ou la dégradation dans le lysosome. Une fois le récepteur internalisé, il se retrouve dans un endosome précoce où il peut soit être renvoyé à la membrane cellulaire pour recyclage soit demeurer dans un endosome précoce. L'endosome précoce peut maturer en corps multivésiculaires (MVB) où Notch1 peut toujours être recyclé à la membrane plasmique. Cependant, si les corps multivésiculaires fusionnent avec un lysosome, cela entraîne la dégradation du récepteur (Piper & Katzmann, 2007; Moretti & Brou, 2013).

L'ubiquitination jouerait un rôle important dans la décision de diriger Notch1 soit au recyclage à la membrane plasmique soit à la dégradation lysosomale (Chastagner *et al.*, 2008; McGill & McGlade, 2003; McGill *et al.*, 2009). Il a été montré que l'ubiquitination

de Notch1 par l'ubiquitine ligase C-Cbl est importante pour réguler le trafic intracellulaire du récepteur de la membrane plasmique jusqu'à sa dégradation lysosomale (Jehn *et al.*, 2002).

D'autres études ont suivi et ont identifié plusieurs ubiquitines ligases responsables de l'ubiquitination de Notch1 et de son endocytose subséquente. Une des ubiquitines ligases la plus étudiée est Itch. Découverte pour ubiquitiner Notch1 (L. Qiu *et al.*, 2000), Itch ne lierait pas directement le récepteur, mais nécessiterait un adaptateur (Chastagner *et al.*, 2008). Plusieurs adaptateurs d'Itch ont été identifiés tels que l'arrestine et Numb (Melino *et al.*, 2008; Puca *et al.*, 2013). Chez les mammifères, Numb a été découvert pour interagir avec Notch1 pour le réorienter à la dégradation lysosomale au lieu de son recyclage suite à son ubiquitination par Itch (McGill & McGlade, 2003; McGill *et al.*, 2009). Ainsi, Numb serait un régulateur négatif de Notch1. Une dérégulation de Numb et notamment une diminution de son expression peut amener à une augmentation d'activité de la voie NOTCH. Il a été montré qu'une activité aberrante de la signalisation NOTCH était retrouvée dans le cancer du sein dans lequel environ 50% des cas ont perdu l'expression de NUMB (Pece *et al.*, 2004).

Dans certains cas, il a été montré que la déubiquitination de Notch1 (à une étape différente de l'ubiquitination) pouvait agir comme signal pour envoyer Notch1 à la dégradation lysosomale, comme c'est le cas pour les cargos délivrés dans les corps multivésiculaires (Piper & Katzmann, 2007). La déubiquitination de NOTCH1 serait assurée par la déubiquitinase USP12 recrutée par ITCH afin que NOTCH1 puisse être dégradé dans le lysosome (Moretti *et al.*, 2012). En somme, il semble de plus en plus probable que la régulation de l'ubiquitination et de l'endocytose contribue à réguler le nombre de récepteurs disponibles au niveau de la membrane plasmique et module ainsi l'activation ligand-dépendante des récepteurs NOTCH (Moretti & Brou, 2013).

Il a été suggéré que les événements endocytiques influencent également les ligands de NOTCH notamment en leur permettant de les rendre compétents à lier et activer les récepteurs NOTCH (Figure 4). D'une part, une fois le ligand synthétisé et exprimé à la membrane cellulaire, il serait ubiquitiné par les ubiquitines ligases NEURALIZED ou MINDBOMB. L'ubiquitination du ligand permettrait son endocytose afin de le rendre

compétent à activer le récepteur par des mécanismes inconnus, puis permettrait son recyclage à des endroits spécifiques de la membrane pour se retrouver à proximité des récepteurs NOTCH d'une cellule voisine (D'Souza *et al.*, 2010; Le Borgne, 2006). D'autre part, l'endocytose des ligands serait nécessaire à l'activation des récepteurs NOTCH. En effet, il a été proposé que, suivant l'interaction ligand-récepteur, l'endocytose du ligand génère une force mécanique permettant de découvrir le site de clivage S2 des récepteurs NOTCH pour ainsi favoriser leur activation (Bray, 2006; D'Souza *et al.*, 2010).

Que ce soit pour l'endocytose des ligands suite à leur ubiquitination par NEURALIZED ou MINDBOMB ou suivant leur interaction avec un récepteur NOTCH, l'internalisation des ligands serait médiée par l'EPSIN 15 suggérant un mécanisme clathrine-dépendant, un des types d'endocytose majoritaire. Cependant, la dynamine, qui sert au relargage de l'endosome de manière clathrine-dépendante et -indépendante dans le cytoplasme, a été également montré pour y jouer un rôle (Bray, 2006; Le Borgne, 2006; Kopan & Ilagan, 2009; D'Souza *et al.*, 2010). Malgré un possible rôle de l'endocytose dans la régulation de la signalisation NOTCH, les mécanismes impliqués demeurent passablement peu connus.

Jusqu'ici, l'endocytose des récepteurs NOTCH et des ligands permettait de réguler leur disponibilité à la membrane plasmique soit par recyclage soit par dégradation lysosomale. Bien que les endosomes aient tout d'abord été caractérisés comme un moyen de transport de divers cargos, de plus en plus d'études montrent que les endosomes ne sont pas que de simples transporteurs vésiculaires. En effet, ils peuvent participer à de nombreux processus cellulaires comme activer certaines voies de signalisation (Gould & Lippincott-Schwartz, 2009). Tout comme les récepteurs à activité tyrosine kinase comme EGFR ou les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs NOTCH ont été proposés pour être activés dans les endosomes. Cependant, les mécanismes moléculaires ne sont pas connus ou encore sujet à controverse. Chez la drosophile, certains ont proposé que l'endocytose de dNotch est nécessaire pour son activation ligand-dépendante (Schweisguth, 2004; Baron, 2012). En effet, suite à la liaison de dNotch à son ligand et au clivage au site S2 par la famille ADAM, il a été suggéré que le récepteur doit être internalisé pour pouvoir être clivé au site S3 par le complexe γ -sécrétase. Chez les mammifères, la première étude sur l'activation

ligand-dépendante de Notch1 dans les endosomes a montré que Notch1 est mono-ubiquitiné sur la lysine K1759. Cette mono-ubiquitination ferait suite au clivage au site S2 du récepteur et permettrait l'endocytose de Notch1. Il a été suggéré que l'endocytose du récepteur favoriserait la localisation de Notch1 près du complexe γ -sécrétase pour son clivage en S3 et ainsi libérer Nic1 (Gupta-Rossi *et al.*, 2004).

Une autre étude a montré que la déubiquitination par eiF3F contribuerait à l'activation de NOTCH1 dans les endosomes (Moretti *et al.*, 2010). En effet, une fois que NOTCH1, clivé en S2, est mono-ubiquitiné et internalisé, DELTEX1 interagirait avec le récepteur et recruterait eiF3F pour déubiquitiner NOTCH1. Cette déubiquitination de NOTCH1 au niveau des endosomes permettrait le clivage en S3 de NOTCH1 par le complexe γ -sécrétase afin de libérer NIC1 pour qu'il transloque au noyau et fonctionne comme un facteur de transcription. Malgré ces études qui suggèrent une activation des récepteurs NOTCH au niveau des endosomes, d'autres soutiennent que le clivage des récepteurs NOTCH se ferait strictement à la membrane plasmique (Struhl & Adachi, 2000; Sorensen & Conner, 2010). En effet, la perte de la dynamine, bloquant ainsi l'endocytose, ne prévient pas le clivage de dNotch par le complexe γ -sécrétase (Struhl & Adachi, 2000). Ainsi, suite à la liaison du ligand au récepteur, il demeure controversé à savoir si le clivage des récepteurs NOTCH se fait au niveau de la membrane plasmique ou si l'endocytose est nécessaire pour leur activation (Moretti & Brou, 2013).

D'autres études révèlent que les récepteurs NOTCH pourraient être activés dans les endosomes, indépendamment de leur liaison au ligand (Baron, 2012; Hori *et al.*, 2012). En effet, le récepteur dNotch est constitutivement internalisé pour son recyclage ou sa dégradation lysosomale ce qui éviterait une activation ligand-indépendante de dNotch. Cependant, un défaut dans le trafic vésiculaire, particulièrement au niveau des corps multivésiculaires, pourrait mener au clivage ligand-indépendant de dNotch (Vaccari *et al.*, 2008). Cette activation aberrante de la voie NOTCH pourrait être dépendante de l'ubiquitination médiée par Deltex dans les corps multivésiculaires. Cette modification post-traductionnelle mènerait à l'activation de la signalisation sans avoir recours à la liaison de dNotch avec un ligand (Hori *et al.*, 2012). Cette voie d'activation du récepteur dNotch dans les endosomes ne serait toutefois pas universelle et dépendrait du contexte qui est

encore mal compris. Des évidences montrent qu'un défaut dans le trafic vésiculaire pourrait être une caractéristique du cancer tel que les cancers du sein, du colon et de l'ovaire (Mosesson *et al.*, 2008; Mellman & Yarden, 2013). Par exemple, GEP100, un facteur d'échange de nucléotides guanyliques (GEF) de la petite GTPase ARF6, est surexprimé, avec ARF6 dans le cancer du sein invasif (Morishige *et al.*, 2008). GEP100 et ARF6 sont connus pour jouer un rôle dans l'endocytose (D'Souza-Schorey *et al.*, 1995; Someya *et al.*, 2001). Le récepteur de l'EGF, EGFR, est activé suite à sa liaison au facteur de croissance épidermique comme EGF et TGF α . Une fois activé, EGFR interagit avec GEP100 et ARF6 pour internaliser la E-cadhérine et pour favoriser l'invasion des cellules du cancer du sein. Une diminution d'expression de GEP100 inhibe la formation de métastases par les cellules cancéreuses du sein chez les souris (Morishige *et al.*, 2008). De plus, l'endocytose des récepteurs à activité tyrosine kinase permettrait de diminuer le signal en aval en envoyant les récepteurs à la dégradation lysosomale. Cependant, plusieurs cellules tumorales adoptent ce concept à l'inverse. Par exemple, l'association du récepteur EGFR à son ligand TGF α est peu stable dans le milieu acide des endosomes. Cette faible association entraîne une hypo-ubiquitination du récepteur favorisant ainsi son recyclage plutôt que sa dégradation lysosomale (Mosesson *et al.*, 2008). Par conséquent, un défaut dans le trafic vésiculaire pourrait expliquer une activation aberrante de la voie NOTCH sans avoir besoin de la liaison du récepteur NOTCH avec un de ses ligands dans de nombreux cancers. Cependant, ce mécanisme alternatif d'activation de la voie NOTCH n'a pas été validé chez les mammifères (Moretti & Brou, 2013).

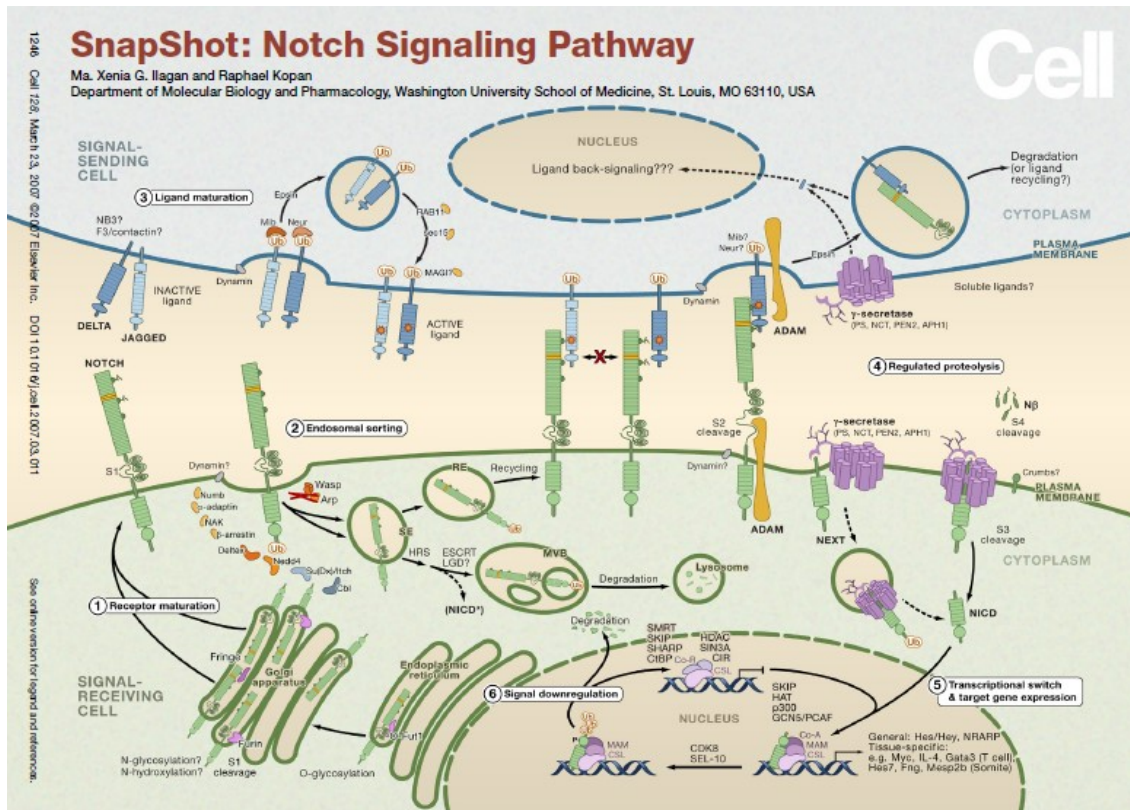


Figure 4 : La complexité de la voie NOTCH.

Le récepteur NOTCH serait constitutivement internalisé soit pour le recyclage à la surface cellulaire soit pour l'envoyer à la dégradation lysosomale. L'activation de la voie NOTCH suivant la liaison du ligand au récepteur permet le clivage de ce dernier soit à la membrane plasmique soit au niveau des endosomes. Des modifications post-traductionnelles du récepteur dans les corps multivésiculaires permettraient de diriger les récepteurs soit à la dégradation lysosomale soit au recyclage soit à l'activation du récepteur de manière ligand-indépendante. (Ilagan & Kopan, 2007) (Autorisation : 4105010292195).

1.2.5. Assemblage du complexe transcriptionnel

Le modèle classique d'activation de la voie NOTCH est certainement représentatif des NIC issus des quatre récepteurs NOTCH. Cependant, la plupart des études qui ont tenté d'élucider les mécanismes de régulation du complexe transcriptionnel ont été réalisées avec NIC1/Nic1. Ainsi, dans les sections suivantes, nos connaissances sur la régulation du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML seront décrites.

1.2.5.1. Complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1

L'activation de la voie NOTCH1, représentée par 2 clivages successifs du récepteur, libère un fragment intracellulaire appelé NIC1. Ce fragment protéique est alors capable de transloquer dans le noyau pour former le complexe transcriptionnel ternaire composé des protéines NIC1/CSL/MAML (Figure 5) (Kopan & Ilagan, 2009). Des co-régulateurs comme des histones acétyltransférases sont recrutés au niveau de ce complexe ternaire pour activer la transcription des gènes cibles de la voie NOTCH1. Il a été suggéré que l'arrêt de la signalisation NOTCH1 fait suite à une phosphorylation de NIC1 par le complexe CYCLINE C/CDK8 ce qui permet le recrutement de l'ubiquitine ligase FBW7, l'ubiquitination de NIC1 et s'ensuit la dégradation protéasomale de NIC1 qui met fin à la transcription NOTCH-dépendante (Fryer *et al.*, 2004; Oberg *et al.*, 2001; Gupta-Rossi *et al.*, 2001; G. Wu *et al.*, 2001).

NIC1 n'étant pas capable de se lier directement à l'ADN, la protéine CSL assure la liaison à l'ADN par la reconnaissance de séquence consensus GTGGGAA qui se retrouve au niveau des promoteurs cibles (Kovall & Hendrickson, 2004). Dans le modèle classique, CSL lie constitutivement l'ADN. En absence de NIC1, CSL recrute différents partenaires tels que les protéines KyoT2 et RITA (RBP-J Interacting and Tubulin Associated) pour former un complexe répresseur (Borggreffe & Oswald, 2009; Contreras-Cornejo *et al.*, 2016). Lorsque NIC1 est libéré, celui-ci déplace les co-répresseurs pour pouvoir se lier par ses domaines RAM et ANK à CSL avec une stœchiométrie de 1 :1 (Lubman *et al.*, 2007; Nam *et al.*, 2006; Wilson & Kovall, 2006). L'interaction NIC1/CSL crée un site de liaison pour MAML (MASTERMIND-LIKE) dont l'association permet de stabiliser NIC1/CSL pour ainsi former un complexe de transcription actif (Friedmann *et al.*, 2008).

MAML est un co-facteur important puisqu'en son absence, la transcription des gènes cibles du complexe NIC1/CSL est inhibée (Jeffries *et al.*, 2002; Nam *et al.*, 2003; Friedmann *et al.*, 2008). En effet, l'expression d'un dominant négatif de MAML1 dans les cellules de T-ALL (leucémies lymphoblastiques aiguës à cellules T) prévient la transcription des gènes cibles de la voie NOTCH et corrèle avec une réduction de la croissance et de la survie des cellules (L. Wu *et al.*, 2000; Weng *et al.*, 2003). Il existe trois isoformes de MAML (MAML1-3) qui sont capables d'interagir avec les fragments intracellulaires des 4

récepteurs NOTCH. Les protéines MAML sont majoritairement nucléaires et elles ne sont pas exprimées dans tous les tissus suggérant que leur rôle n'est pas redondant. Bien que leur structure soit très conservée, seulement leur séquence en N-terminal est homologue. La partie en N-terminale sert d'interaction avec des protéines tandis que la partie C-terminale est nécessaire pour activer la transcription (L. Wu & Griffin, 2004). Il semble que MAML3 soit moins apte à interagir avec NIC1. MAML3 médierait une réponse transcriptionnelle plus efficace lorsqu'il est lié à NIC4. MAML1 et MAML2 sont capables de former un complexe avec les différents NIC pour activer la transcription d'*HES1* (L. Wu *et al.*, 2002). MAML1 étant l'isoforme la plus étudiée, le complexe transcriptionnel ternaire sera identifié avec MAML1 soit NIC1/CSL/MAML1 dans la suite de la thèse.

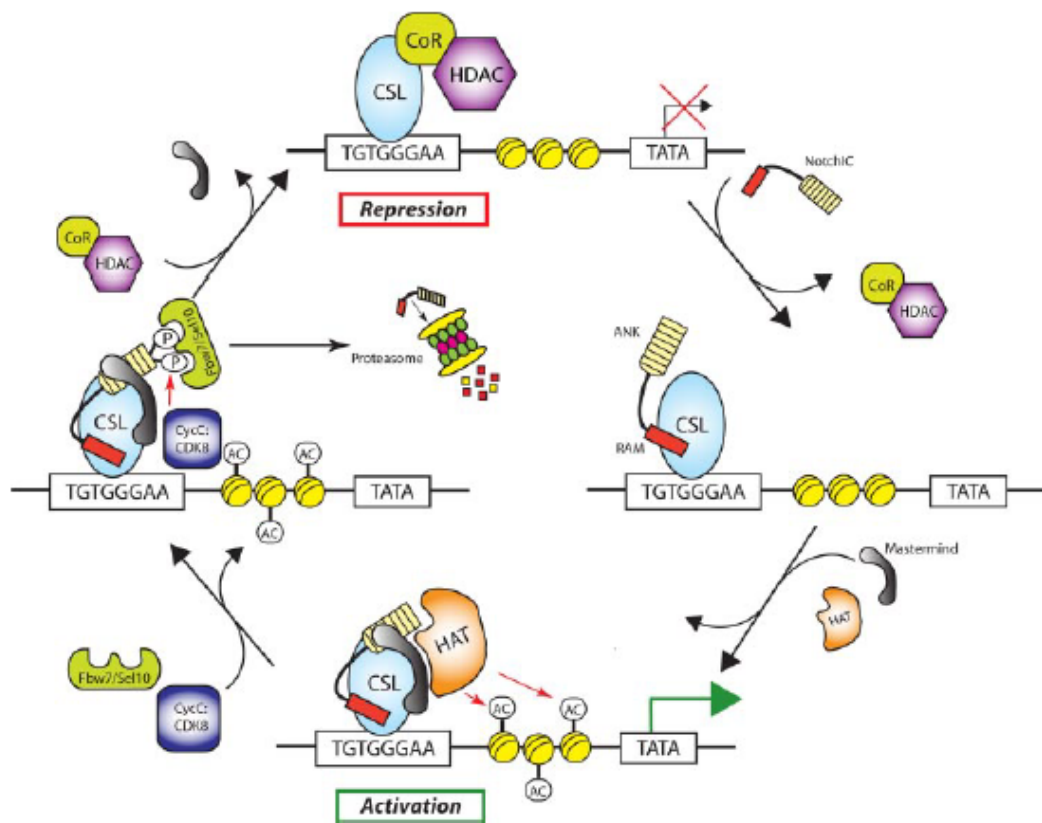


Figure 5 : Modèle classique de l'assemblage et du désassemblage du complexe transcriptionnel ternaire.

Lorsque la voie NOTCH1 n'est pas active, CSL est lié à l'ADN et forme un complexe répresseur pour réprimer la transcription des gènes cibles. La libération de NIC1 permet sa liaison à CSL pour former un complexe actif NIC1/CSL/MAML. Le recrutement d'autres co-activateurs permet d'activer la transcription des gènes cibles du complexe

transcriptionnel. La CYCLINE C/CDK8 phosphorylerait NIC1 dans son domaine PEST afin que l'ubiquitine ligase FBW7 reconnaisse NIC1 et l'ubiquitine avant de l'envoyer à la dégradation protéasomale.

CoR = Co-répresseur

HDAC = Histone désacétylase

NotchIC = NIC1

RAM = Domaine RAM (RBP-J Kappa-associated module)

ANK = Domaine ANK

HAT = Histone acétylase

Ac = Acétylation

CycC/CDK8 = CYCLINE C/CDK8

P = Phosphorylation

(Friedmann *et al.*, 2008) (pas besoin d'autorisation).

Précédemment, la voie classique d'assemblage du complexe transcriptionnel a été décrite. Cependant un modèle d'assemblage alternatif a été proposé. Ce modèle suggère qu'avant l'association de NIC1 avec ses partenaires CSL et MAML1, NIC1 serait sous forme multimérique (Vasquez-Del Carpio *et al.*, 2011). Cette multimérisation de NIC1 en tête-bêche serait nécessaire pour l'assemblage d'un complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1.

Une autre preuve qui vient appuyer le modèle alternatif d'assemblage du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 est l'affinité de CSL pour ses différents partenaires (Figure 5). En effet, une étude a montré que le corépresseur Kyot2 s'associe à CSL avec la même affinité que NIC1 (Collins *et al.*, 2014), ce qui n'explique plus comment NIC1 arrive à désassembler/déplacer le complexe répresseur pour former un complexe actif avec CSL et MAML1. Il a été proposé que dans certaines circonstances, le complexe répresseur empêche la liaison NIC1/CSL par un mécanisme impliquant la désacétylase SIRT1 (Guarani *et al.*, 2011). En effet, SIRT1, qui est associé au complexe répresseur, pourrait désacétyler NIC1 ce qui entraînerait la dégradation de NIC1 et l'empêcherait de lier CSL pour former un complexe actif. Il y aurait donc une compétition entre NIC1 et les co-répresseurs permettant de réguler l'activation de la transcription. Ainsi, l'expression de NIC1 ne signifierait pas forcément une activation de la transcription car NIC1 doit pouvoir s'assembler dans un complexe transcriptionnel pour moduler l'expression génique.

D'autres études remettent en cause le modèle classique de l'assemblage du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 et notamment la liaison constitutive de CSL à l'ADN. En effet, lors de l'activation de la voie NOTCH, il y aurait une augmentation de l'occupation des promoteurs des gènes cibles par CSL suggérant que la liaison de CSL à l'ADN est un évènement beaucoup plus dynamique qu'initialement proposé (Krejci & Bray, 2007; Castel *et al.*, 2013). La répression active par CSL ne concernerait pas tous les gènes cibles de la voie NOTCH, excluant ainsi une répression par défaut de CSL (Castel *et al.*, 2013). Cependant, cette activité répressive de CSL serait importante pour maintenir l'homéostasie cellulaire puisque la perte d'expression de CSL promeut la tumorigenèse (Castel *et al.*, 2013; Kulic *et al.*, 2015). Cette dynamique de CSL pour sa liaison à l'ADN suggère qu'il y aurait un échange de complexes entiers sur l'ADN plutôt qu'un simple échange de co-répresseurs en co-activateurs en association avec CSL (Bray, 2016). Il se pourrait alors que la formation du complexe répresseur ou activateur se forme avant sa liaison à l'ADN voire même dans le cytoplasme puisque celui-ci a déjà été observé dans ce compartiment cellulaire (Jeffries *et al.*, 2002). De plus, l'activation de la voie NOTCH permet la translocation de CSL du cytoplasme au noyau (Krejci & Bray, 2007). De manière intéressante, RITA, un co-répresseur associé à CSL, permet l'export de CSL du noyau au cytoplasme, diminuant la transcription médiée par NOTCH (Wacker *et al.*, 2011). Ainsi, les mécanismes expliquant la dynamique d'assemblage du complexe transcriptionnel actif NIC/CSL/MAML1 demeurent peu compris.

1.2.5.2. Partenaires du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1

Bien que le complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 soit crucial pour l'activité transcriptionnelle de la voie NOTCH1, d'autres facteurs doivent être recrutés au complexe pour activer la transcription.

1.2.5.2.1. p300

Les histones acétylases jouent un rôle important dans l'activité du complexe NIC1/CSL/MAML1. En plus de favoriser l'acétylation des histones H3 et H4, le recrutement de l'histone acétylase p300 au complexe NIC1/CSL/MAML1 permet

l'acétylation de MAML1 sur 2 paires de lysines (K188/189 et plus faiblement K138/139). (Fryer *et al.*, 2002; Saint Just Ribeiro *et al.*, 2007). L'interaction de MAML1 avec p300 permet de potentialiser l'auto-acétylation de p300 afin d'augmenter son potentiel co-activateur (Hansson *et al.*, 2009). L'intégration de p300 au complexe ternaire permet également de recruter d'autres histones acétylases comme PCAF et possiblement GCN5. Ces dernières s'associent à NIC1 et p300 et ne sont pas capables de promouvoir la transcription en l'absence de p300. Le recrutement d'autant d'histones acétylases suggèrent qu'elles participent à la régulation du complexe NIC1/CSL/MAML1 (Kurooka & Honjo, 2000; Wallberg *et al.*, 2002). De plus, p300 a été montré pour acétyler NIC1, sujet qui sera abordé dans la section 1.4.2.

1.2.5.2.2. SKIP

Un autre facteur important qui interagit avec CSL et NIC1 est SKIP (Ski interacting protein) (Zhou *et al.*, 2000). Son recrutement au complexe NIC1/CSL/MAML1 permettrait de promouvoir l'activité transcriptionnelle (Fryer *et al.*, 2004). Une étude propose que SKIP facilite le recrutement des partenaires du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 (Vasquez-Del Carpio *et al.*, 2011). SKIP se lierait au multimère de NIC1 (décrit dans la section 1.2.5.1) pour créer un site de liaison à MAML1 et ainsi pouvoir charger NIC1/MAML1 sur CSL. Cependant, ce modèle n'est pas en accord avec les études qui montrent que MAML1 stabiliserait l'interaction NIC1/CSL du modèle classique d'assemblage du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1. De plus, SKIP a été montré pour être dans le complexe transcriptionnel actif mais aussi dans le complexe répresseur (Zhou & Hayward, 2001). Le rôle complexe de SKIP dans la régulation du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1 n'est pas encore élucidé.

1.2.5.2.3. CDK8

CDK8 est un autre partenaire recruté par MAML1. Il est considéré comme régulateur positif ou négatif de la transcription dépendamment de la protéine qu'il phosphoryle (activateur ou répresseur) (Nemet *et al.*, 2014). CDK8 est surtout reconnu pour son rôle de régulateur négatif de la voie NOTCH. En effet, le complexe CYCLINE C/CDK8 phosphoryle des résidus dans le domaine PEST de NIC1, ce qui favoriserait la dégradation

protéasomale de NIC1 suite à son ubiquitination par FBW7 (Fryer *et al.*, 2004). Il serait toutefois possible que CDK8 ait un double rôle (positif et négatif). CDK8 a plusieurs sites potentiels de phosphorylation sur NIC1 à la fois dans le domaine de transactivation et dans le domaine PEST (Fryer *et al.*, 2004). Il est recruté au promoteur des gènes cibles de NOTCH avec le complexe ternaire NIC1/CSL/MAML1 suite à l'activation de la voie NOTCH, ce qui pourrait appuyer son rôle de régulateur positif (Fryer *et al.*, 2004).

1.2.5.2.4. Autres partenaires transcriptionnels

Pendant une longue période de temps, peu de co-régulateurs transcriptionnels du complexe NIC1/CSL/MAML1 avaient été identifiés et étudiés. Cependant, une étude récente a exploité la spectrométrie de masse ce qui a permis de trouver de nombreux partenaires d'interaction du complexe NIC1/CSL/MAML1 dont des potentiels co-facteurs transcriptionnels et des facteurs régulant la chromatine (Yatim *et al.*, 2012). Parmi ces protéines, il y a la déméthylase LSD1 qui se lierait à CSL indépendamment de la présence ou non de NIC1 dans le complexe. En effet, LSD1 fait à la fois partie du complexe répresseur et du complexe activateur. En absence de NIC1, LSD1 agirait préférentiellement sur la H3K4me2 (Lysine 4 di-méthylée de l'histone H3) et contribuerait à la répression médiée par CSL. En présence de NIC1, LSD1 déméthyle plutôt la H3K9me2 pour favoriser la transcription.

Yatim *et al.* ont découvert que la protéine AF4p12, un potentiel co-régulateur transcriptionnel très conservé dans l'évolution (Hayette *et al.*, 2005), pourrait être un partenaire du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1. En effet, AF4p12 s'associe à MAML1 qui le recrute au complexe NIC1/CSL/MAML1 (Yatim *et al.*, 2012). Cependant, l'inhibition de la voie NOTCH ne diminue que légèrement l'interaction de MAML1 à AF4p12 suggérant que AF4p12 est déjà associé à MAML1 que NIC1 soit libéré ou non du récepteur. Toutefois, il s'associe au complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1, une fois que NIC1 y est présent, pour recruter l'ARN polymérase II et activer la transcription de certains gènes cibles de la voie NOTCH. Les auteurs ont ainsi mis en évidence le rôle de co-activateur transcriptionnel d'AF4p12.

Dans l'ensemble, les données de la littérature confirment que le complexe NIC1/CSL/MAML1 représente le noyau de la plateforme transcriptionnelle impliquée dans la régulation des gènes suite à l'activation de la voie de signalisation NOTCH1. Cependant, il est de plus en plus évident que d'autres protéines s'y joignent afin de coordonner l'assemblage d'un complexe transcriptionnel actif qui sera démantelé suite à la transcription des gènes cibles.

1.2.6. Gènes cibles du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1

Bien que les récepteurs NOTCH médient différentes fonctions selon le contexte cellulaire, la fonction du récepteur NOTCH1 est la plus étudiée. Cependant, peu de gènes cibles ont été identifiés (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Les mieux caractérisés sont les gènes canoniques de la voie NOTCH qui appartiennent à la famille HES (Hairy Enhancer of Split) avec *HES1*, 5, 7 et à la famille HEY avec *HEY1*, 2 et *L* (Iso *et al.*, 2003). Ce sont des répresseurs transcriptionnels de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix) qui s'associent soit en hétérodimères soit en homodimères. Ils ont 2 mécanismes d'action pour réprimer la transcription : une répression active ou une répression passive. La répression active consiste en la liaison d'HES et/ou HEY sous forme de dimères au promoteur des gènes cibles, ce qui permet le recrutement de co-répresseur tel GROUCHO/TLE. Par exemple, Hes1 a été montré pour inhiber la *Neurogenine3* (*Ngn3*), inhibant ainsi la différenciation des cellules souches pancréatiques en cellules endocrine (J. C. Lee *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2013). Les protéines de la famille HES sont également connues pour réprimer leur propre transcription. Finalement, Hes1 est connue pour réprimer la transcription d'inhibiteurs de cycle cellulaire comme p21, p27 et p57 (Fischer & Gessler, 2007). La répression passive consiste en l'association d'une protéine de la famille HES ou HEY avec un activateur transcriptionnel pour former un dimère et l'empêcher de se lier au promoteur. Par exemple, il a été montré qu'Hes1 lie E47. E47 n'est alors plus disponible pour dimériser avec Mash1 et favoriser la différenciation neuronale (Kageyama *et al.*, 2007).

Une des difficultés pour identifier des cibles de la signalisation NOTCH est que cette voie de signalisation possède de nombreuses fonctions suggérant qu'il y a de nombreuses cibles selon le contexte cellulaire. À cela s'ajoute le fait que la signalisation NOTCH peut promouvoir l'expression d'une protéine et de son inhibiteur endogène. Il s'agit de la

« logique incohérente » décrite par Krejci *et al.*. Chez la drosophile, cette logique incohérente est illustrée par le fait que l'activation de la voie NOTCH conduit à l'expression d'*E(spl)* (*Enhancer of split complex*) et *twi* (*twist*). Or, *E(spl)* inhibe l'expression de *twi* (Krejci *et al.*, 2009).

La dernière difficulté pour l'identification des cibles du complexe NIC1/CSL/MAML1 est le profil temporel et l'amplitude de la réponse transcriptionnelle (Housden *et al.*, 2013). Cette étude montre que les gènes de NOTCH ne sont pas exprimés tous en même temps suite à l'activation du signal NOTCH suggérant une transcription dynamique. Les auteurs les ont classés en 3 grandes catégories selon leur profil temporel : 1) les gènes exprimés tôt tels que ceux de la famille HES ou responsable de l'apoptose, 2) les gènes exprimés tardivement comme ceux impliqués dans le développement et 3) les gènes régulés négativement parmi lesquels les gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle ou dans le métabolisme. Cette étude montre également que certaines cibles peuvent en réguler d'autres, faisant ainsi certains gènes cibles de la voie NOTCH des cibles indirectes. Par exemple, *HES1* qui est un gène cible exprimé tôt suite à l'activation de la signalisation peut inhiber des gènes cibles issus de la troisième catégorie. Il a également été montré que la durée du signal de NOTCH était importante car elle peut moduler l'expression de certains gènes cibles.

En plus d'avoir des gènes cibles nombreux et variés, l'organisation des promoteurs cibles du complexe NIC1/CSL/MAML1 jouerait également un rôle important (Figure 6). En effet, la disposition des sites de liaison de CSL à l'ADN et la distance de ces sites de liaison au site d'initiation de la transcription sont 2 critères importants. Certains promoteurs comme celui d'*HES5*, présente plusieurs sites simples de liaison de CSL à l'ADN répartis au niveau du promoteur. D'autres promoteurs, dont celui d'*HES1* ont, en plus des sites simples réparties le long du promoteur, des sites pairés de liaison de CSL à l'ADN, orienté dans le sens « tête à tête » et séparés de 15-19 nucléotides. Ces sites de liaison de CSL à l'ADN sont appelés sites SPS (Su(H) Paired Sites) et sont situés proches du promoteur proximal (dans les 5kb du site d'initiation de la transcription). Les promoteurs qui possèdent les sites SPS sont considérés comme des promoteurs forts puisqu'ils ont besoin de faibles doses de NIC1 pour activer la transcription. De plus, ceci permet de dimériser le

complexe NIC1/CSL/MAML1 par le domaine ANK de NIC1. La perte de dimérisation sur ces promoteurs diminue la capacité du complexe NIC1/CSL/MAML1 d'activer la transcription (Ong *et al.*, 2006; Nam *et al.*, 2007; Arnett *et al.*, 2010).

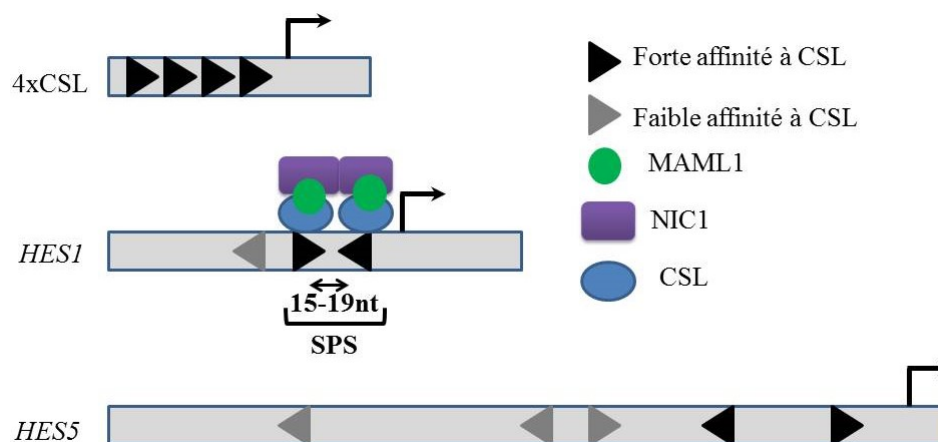


Figure 6 : Disposition des sites de liaison de CSL à l'ADN de différents promoteurs.

4xCSL est un promoteur synthétique, avec 4 sites de liaison à l'ADN de forte affinité à CSL disposés en tête à queue. Le promoteur endogène d'*HES1* est composé du site SPS comprenant 2 sites de liaison à l'ADN de forte affinité à CSL, séparés de 15-19 nucléotides (nt) et disposés en tête à tête permettant la dimérisation du complexe NIC1/CSL/MAML1 via NIC1. Le promoteur endogène d'*HES5* est composé de sites simples de liaison à l'ADN de CSL.

1.2.6.1. Gènes cibles de la signalisation NOTCH dans les cellules tumorales

Le gène cible *C-MYC* est une cible directe de NOTCH1 (Palomero *et al.*, 2006). L'inhibition de la voie NOTCH diminue l'expression protéique de C-MYC dans les cellules de T-ALL (Weng *et al.*, 2006). À l'inverse, l'activation de la voie NOTCH augmente l'expression protéique de C-MYC dans les cellules pancréatiques tumorales humaines (Tremblay *et al.*, 2013). Le promoteur de *C-MYC* contient les sites SPS permettant la dimérisation du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 (H. Liu *et al.*, 2010). L'abolition de la dimérisation de ce complexe NIC1/CSL/MAML1 au promoteur de *C-MYC* prévient l'expression de *C-MYC* dans les cellules de leucémies. Cette

perte d'expression de *C-MYC* bloque la croissance des cellules T-ALL et sa ré-expression permet un sauvetage phénotypique (H. Liu *et al.*, 2010). L'axe NOTCH1/*C-MYC* est donc très important dans les T-ALL puisqu'il régule entre autres l'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et la croissance cellulaire (Sanchez-Martin & Ferrando, 2017).

Le gène *CCND1* codant pour la protéine CYCLINE D1 est une autre cible directe du complexe transcriptionnel formé par NIC1 (Ronchini & Capobianco, 2001). L'expression de CYCLINE D1 est aussi souvent augmentée dans certains cancers (Fu *et al.*, 2004). La CYCLINE D1 est responsable de la progression du cycle cellulaire en régulant la phase G1. Il a été montré qu'une augmentation d'expression de la CYCLINE D1 par l'activation de la voie NOTCH1 promeut la prolifération contribuant ainsi à la transformation cellulaire (Cohen *et al.*, 2010).

Un autre gène cible direct de la voie NOTCH, encore peu étudié, est le répresseur transcriptionnel *SLUG*. Dans le cancer du sein, l'activation de la voie NOTCH1 contribuerait à l'expression de *SLUG* qui inhibe l'expression de l'*E-CADHÉRINE*. La perte d'expression de la protéine d'adhésion cellule-cellule *E-CADHÉRINE* induit la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) dans les cellules épithéliales de glandes mammaires (Leong *et al.*, 2007).

Une étude récente montre que la convertase de type furine, *ADAM10*, est un gène cible direct d'un complexe transcriptionnel comprenant le domaine intracellulaire de NOTCH1, NIC1 (H. Qiu *et al.*, 2015). *ADAM10* étant impliqué dans le clivage au site S2 du récepteur NOTCH1 (voir section 1.2.3), cela pourrait laisser suggérer un rétrocontrôle positif par la signalisation NOTCH.

1.3. Signalisation NOTCH CSL-indépendante

Suite à la libération du NIC, nous avons décrit que ce dernier s'intégrait à une plateforme transcriptionnelle (NIC/CSL/MAML1) pour réguler l'expression génique. Puisque NIC ne peut lier directement l'ADN, il requiert CSL pour la reconnaissance des

promoteurs cibles. Ainsi, on dit que la voie NOTCH canonique médie une réponse transcriptionnelle CSL-dépendante. Or, il a été suggéré que l'interaction de NIC1 avec d'autres protéines appartenant à d'autres voies de signalisation pourrait médier une réponse CSL-indépendante, caractérisant une voie NOTCH non canonique. Certains exemples démontrent cette réponse CSL-indépendante et NIC1-dépendante, mais en général, cette signalisation NOTCH non canonique demeure peu documentée (Martinez Arias *et al.*, 2002; Sanalkumar *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2016).

1.3.1. Cibles potentielles de la signalisation NOTCH CSL-indépendante

Chez les embryons de poulet, une étude montre que l'activation de la voie NOTCH inhibe l'expression de *Slug*. La surexpression d'un dominant négatif de CSL, capable d'interagir avec Nic1 mais ne liant plus l'ADN, n'affecte pas l'inhibition de *Slug* suite à l'activation de la voie NOTCH. Cette étude suggère que la signalisation NOTCH inhibe *Slug* de façon CSL-indépendante (Endo *et al.*, 2002).

Dans des cellules tumorales de glandes mammaires dont p53 est muté ou perdu, NIC1 est capable d'augmenter l'expression d'IL6. Les mécanismes sont encore inconnus mais mettrait en jeu IKK, membre de la voie NFκB. Encore une fois, la surexpression d'un dominant négatif de CSL (CSL R218H), interagissant avec NIC1 mais ne se liant plus à l'ADN, a permis de supporter une régulation NOTCH1-dépendante CSL-indépendante d'IL6 (S. Jin *et al.*, 2013).

Il a été montré que NIC1 est capable d'interagir avec LEF1 de façon à activer la transcription LEF1-dépendante mais indépendante de CSL et de β-CATÉLINE (Ross & Kadesch, 2001). Cette étude suggère donc que NIC1 pourrait interagir avec d'autres facteurs de transcription pour influencer l'expression génique, et donc la réponse cellulaire, de manière CSL-indépendante.

Chez les mammifères, une étude suggère que la régulation génique médiée par NOTCH pourrait être DELTEX-dépendante lorsqu'elle est indépendante de CSL. Il a été montré que l'interaction Nic1-Deltex1, indépendamment de l'interaction Nic1-CSL, prévient le recrutement de p300 au promoteur de SRG3 ce qui résulte par une répression de la transcription de SRG3 (Jang *et al.*, 2006).

D'autres travaux chez la drosophile supportent une possible signalisation NOTCH CSL-indépendante et Deltex-dépendante. En effet, il a été observé que Dishevelled, connu pour son rôle régulateur de la signalisation WNT, s'associe avec le domaine C-terminal de dNic et favorise l'interaction de dNic avec CSL pour promouvoir une activité transcriptionnelle CSL-dépendante (Axelrod *et al.*, 1996; Romain *et al.*, 2001). Or, la délétion du domaine C-terminal de dNic empêche le recrutement de Dishevelled, réduit l'interaction dNic-CSL mais favorise l'association de dNic avec Deltex. Il en résulte une signalisation NOTCH-dépendante, CSL-indépendante et Deltex-dépendante. En résumé, CSL et Deltex sont en compétition pour lier dNic au niveau de son domaine ANK. Dishevelled, en liant dNic en C-terminal, favorise la formation du complexe dNic-CSL au détriment de dNic-Deltex. Le ratio de complexes dNic-CSL vs. dNic-Deltex permettrait d'établir un gradient de réponses cellulaires CSL-dépendantes et CSL-indépendantes. L'interaction de dNic avec Deltex permettrait également de favoriser une localisation cytoplasmique de dNic, suggérant que la localisation subcellulaire de dNic est importante pour établir un ratio de signal CSL-dépendant et -indépendant. Il faut remarquer que cette étude suggère également que le domaine C-terminal de dNic jouerait un rôle dans l'établissement d'un gradient de signalisation NOTCH CSL-dépendante et -indépendante (Romain *et al.*, 2001).

1.3.2. Rôles potentiels de la signalisation NOTCH-dépendante CSL-indépendante

La signalisation NOTCH CSL-indépendante Deltex-dépendante permettrait aux cellules T d'acquérir une résistance à l'apoptose induite par les glucocorticoïdes, une étape importante dans la maturation des cellules T (Jang *et al.*, 2006).

Des évidences ont montré que Nic1 prévient la différenciation myogénique des cellules C2C12. Puisque l'expression d'un Nic1 incapable de lier CSL dans ces cellules inhibe toujours la myogenèse, les auteurs ont suggéré un rôle négatif de la signalisation NOTCH CSL-indépendante dans la myogenèse (Shawber *et al.*, 1996; Nofziger *et al.*, 1999).

Une étude dans les cellules endothéliales montre que le signal NOTCH est capable d'inhiber l'apoptose à la fois de manière CSL-dépendante et CSL-indépendante.

L'apoptose est une mort cellulaire programmée, déclenchée par différentes voies dites pro-apoptotiques telles que la voie JNK. Elles sont contrebalancées par des mécanismes anti-apoptotiques comme la voie gouvernée par la famille BCL2. D'une part, l'activation de la voie NOTCH inhibe la voie pro-apoptotique JNK de manière CSL-dépendante. D'autre part, l'activation de la voie NOTCH promeut l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL2 de manière CSL-indépendante (MacKenzie *et al.*, 2004). Ceci montre que le signal NOTCH peut assurer une même fonction - ici l'inhibition de l'apoptose - par 2 mécanismes distincts: CSL-dépendant et CSL-indépendant.

Une équipe montre que l'activation de la signalisation NOTCH1, en médiant une cascade d'activation de la voie mTORC2-AKT qui est indépendante de CSL, prévient l'apoptose induite par l'absence de nutriments (Perumalsamy *et al.*, 2009). En effet la kinase mTOR est un senseur de l'état nutritionnel de la cellule et, avec la protéine RICTOR, forme le complexe mTORC2. Ce dernier active AKT par phosphorylation afin de médier une signalisation de survie cellulaire.

La contribution de la signalisation AKT dans la réponse cellulaire CSL-indépendante médiée par NOTCH est également supportée par une étude de Veeraraghavalu *et al.*. Les auteurs ont montré que l'activation de la voie NOTCH par le ligand JAG1 activerait la voie PI3K/AKT de façon CSL-indépendante mais DELTEX-dépendante pour favoriser la motilité des cellules du cancer du col utérin et la formation de colonies en agar mou (Veeraraghavalu *et al.*, 2005).

Les évidences d'une signalisation NOTCH indépendante de CSL apportent un nouveau niveau de complexité à cette voie de signalisation d'apparence simpliste.

1.4. Rôles des modifications post-traductionnelles dans la régulation du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1

Les modifications post-traductionnelles, réversibles ou non, régulent la transduction du signal. Considérant l'absence d'intermédiaires entre le récepteur NOTCH et son fragment intracellulaire agissant comme régulateur transcriptionnel, il n'est pas surprenant que NIC1

soit sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles qui participent à la régulation de l'intensité et de la durée du signal NOTCH. Plusieurs études suggèrent de nombreuses modifications post-traductionnelles réversibles de NIC1 telles que l'hydroxylation (ajout d'un groupement hydroxyle par une hydroxylase), l'acétylation (ajout d'un groupement acétyle par une acétyltransférase), l'ubiquitination (ajout d'une ubiquitine par une ubiquitine ligase), la phosphorylation (ajout d'un groupement phosphate par une kinase) et la méthylation (ajout d'un groupement méthyle par une méthyltransférase) (Figure 7) (Andersson *et al.*, 2011; Borggreffe *et al.*, 2016).

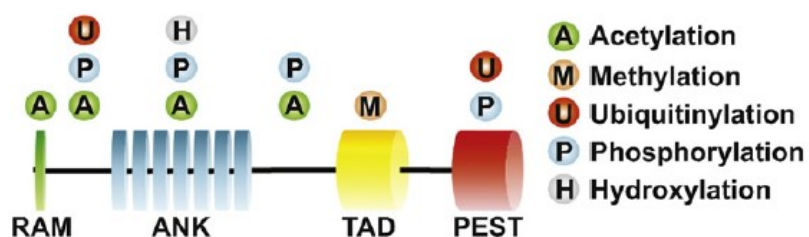


Figure 7 : Les modifications post-traductionnelles suggérées de NIC1.

Représentation des domaines de NIC1. Quelques modifications post-traductionnelles de NIC1 sont répertoriées.

RAM = Domaine RAM (RBP-J Kappa-associated module)

ANK = Domaine ANK

TAD = Domaine de transactivation

PEST = Domaine riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T) (Borggreffe *et al.*, 2016) (pas besoin d'autorisation).

1.4.1. Hydroxylation

Des travaux montrent qu'en normoxie, l'hydroxylase FIH (Factor Inhibiting HIF1 (Hypoxia Inducible Factor)) agit sur deux asparagines dans le domaine ANK de Nic1 (N1945 et N2012) (Coleman *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2008). FIH hydroxyle Nic1-3 mais pas Nic4, ce qui pourrait contribuer à une diversité de signal (Wilkins *et al.*, 2009). Il a été montré que FIH serait un régulateur négatif de la signalisation NOTCH en diminuant l'expression des ARNm des cibles de NOTCH ou en diminuant l'activité transcriptionnelle

(Gustafsson *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2008). Une autre étude confirme la diminution de la transcription globale de la voie NOTCH par l'expression de FIH. De plus, ils montrent que l'hydroxylation de Nic1 ne modifie pas son interaction avec ses partenaires CSL, SKIP et DELTEX. À noter qu'ils utilisent seulement le domaine ANK pour observer l'effet de l'hydroxylation de NIC1 sur ces interactions (Coleman *et al.*, 2007). Ainsi, les mécanismes par lesquels l'hydroxylation de Nic1 par FIH interfère avec la signalisation NOTCH demeurent inconnus.

1.4.2. Acétylation

L'acétylation pourrait jouer un rôle important dans la régulation du complexe NIC1/CSL/MAML1. Tel que mentionné précédemment dans la section 1.2.5.2.1, l'acétyl transférase p300 est recruté au niveau de ce complexe et plusieurs évidences supportent un rôle positif de p300 dans la régulation de la plateforme NIC1/CSL/MAML1 (Oswald *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2002; Fryer *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2015). D'une part, l'acétylation de MAML1 par p300 corrèle avec une augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 ainsi qu'avec une promotion de l'activité transcriptionnelle du complexe NIC1/CSL/MAML1 (Saint Just Ribeiro *et al.*, 2007). D'autre part, NIC1 pourrait être régulé directement par acétylation. Dix lysines de NIC1 ont été identifiées pour être acétylées par p300 (K2150/2156/2157/2160/2164/2171/2174/2177/2181/2182) et la mutation de ces 10 lysines prévient l'acétylation de NIC1 par p300 (Popko-Scibor *et al.*, 2011). À noter que l'expression de MAML1 favorise le niveau d'acétylation de NIC1 en présence de p300 et corrèle inversement avec le niveau d'ubiquitination de NIC1 suggérant une compétition entre acétylation et ubiquitination de NIC1. Ces observations supportent une promotion de l'activité transcriptionnelle de NIC1/CSL/MAML par acétylation et suggèrent également que l'acétylation pourrait jouer un rôle positif dans la stabilité du complexe NIC1/CSL/MAML1.

À l'inverse, la désacétylase SIRT1 a été associée à une régulation négative du signal NOTCH (Guarani *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012). En effet, SIRT1 a été montré pour être membre du complexe répresseur formé par CSL et LSD1. En absence de NIC1, SIRT inhiberait l'acétylation des histones (H1.4K26ac et H4K16ac) afin d'accompagner CSL dans son activité répressive de la transcription (Mulligan *et al.*, 2011). Lorsque NIC1 est

présent, la liaison et désacétylation de celui-ci par SIRT1 conduit à une déstabilisation de NIC1 et une diminution de la transcription des gènes cibles de la voie NOTCH (Guarani *et al.*, 2011).

1.4.3. Méthylation

Une étude montre que Nic1 peut être méthylé par la méthyltransférase CARM1 sur 5 arginines situées en C-terminal de la protéine (R2263/2272/2313/2327/2371) (Hein *et al.*, 2015). Il a été montré qu'un mutant Nic1 qui n'est plus méthylé sur ces 5 arginines est plus stable que Nic1 mais n'est pas plus compétent que Nic1 pour activer la transcription des gènes cibles.

1.4.4. Ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui jouerait également un rôle dans la régulation du complexe NIC1/CSL/MAML1. Entre autres, l'ubiquitine ligase FBW7 reconnaît NIC1 préalablement phosphorylé dans son domaine C-terminal par le complexe CYCLINE C/CDK8. La reconnaissance de NIC1 par FBW7 entraînerait l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de NIC1 pour médier l'arrêt de la transcription par le complexe NIC1/CSL/MAML1 (Oberg *et al.*, 2001; Gupta-Rossi *et al.*, 2001; G. Wu *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2004).

Une autre étude montre que l'ubiquitination de NIC1 ne corrèle pas toujours avec sa dégradation. En effet, l'ubiquitine ligase MDM2 interagit directement avec NIC1 sur ses domaines RAM et ANK. MDM2 peut ensuite ubiquitiner NIC1 pour favoriser la transcription NOTCH-dépendante (Pettersson *et al.*, 2013).

Des travaux de spectrométrie de masse pour explorer à grande échelle les protéines ubiquitinées ont permis d'identifier les lysines K1795 et K1821 de NOTCH1 comme des sites de régulation par ubiquitination. Cependant, les ubiquitines ligases en jeu et la fonction de ces ubiquitinations n'ont pas été explorées (Wagner *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2011).

1.4.5. Phosphorylation

NIC1 n'échapperait pas à une régulation par phosphorylation (Andersson *et al.*, 2011; Borggreffe *et al.*, 2016; H. J. Lee *et al.*, 2015). Tel que mentionné précédemment, le complexe CYCLINE C/CDK8 phosphorylerait NIC1 dans son domaine C-terminal, particulièrement au niveau d'un phosphodegron reconnu subséquentement par FBW7 (Welcker & Clurman, 2008). Dans ce phosphodegron se trouve les sites T2511, S2513 et S2516 qui seraient phosphorylés potentiellement par différentes kinases, dont le complexe CYCLINE C/CDK8. La phosphorylation de NIC1 sur T2511 est particulièrement intéressante car elle est également reconnue par la prolyl-isomérase PIN1 (Rustighi *et al.*, 2014). Alors que la reconnaissance par FBW7 de la T2511 phosphorylée semble associée à la dégradation protéasomale de NIC1 (O'Neil *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2007), la reconnaissance par PIN1 de la T2511 phosphorylée est associée à une stabilisation de NIC1 (Rustighi *et al.*, 2014).

Le domaine C-terminal de NIC1 contient également une séquence régulatrice négative (séquence WSSSSP aux résidus 2520-2525) qui pourrait être phosphorylée par des kinases qui restent à être identifiées (Chiang *et al.*, 2006). Cette étude par Chiang *et al.* montre que la délétion de la séquence WSSSSP ou l'abolition de phosphorylation sur les 4 sérines permet de stabiliser NIC1 et d'augmenter la transcription NOTCH-dépendante. La phosphorylation sur cette séquence WSSSSP a donc été proposée pour restreindre la force du signal NOTCH en diminuant la stabilité de NIC1 (Chiang *et al.*, 2006).

Parmi les kinases démontrées pour phosphoryler NIC, il y a GSK3 β . Il a été rapporté que cette sérine/thréonine kinase phosphoryle Nic1, ce qui protège Nic1 de la dégradation protéasomale et augmente sa stabilité (Foltz *et al.*, 2002). Un autre groupe a montré que la phosphorylation de Nic1 sur 2 séquences S/T-p-S/T (T2132/T2134 et S2136/T2138) par GSK3 β permettrait la translocation nucléaire de Nic1 et favoriserait son activité transcriptionnelle (Han *et al.*, 2012). GSK3 β est aussi capable de phosphoryler Nic2 mais contrairement à Nic1, la phosphorylation de Nic2 diminuerait son potentiel transcriptionnel (Espinosa *et al.*, 2003). Ces travaux suggèrent donc une modulation différente du signal NOTCH1 et NOTCH2 par phosphorylation par une même kinase GSK3 β , contribuant à une diversité du signal NOTCH.

Il a été suggéré que GSK3 β puisse également moduler l'activité transcriptionnelle de MAML1. En effet, la phosphorylation de MAML1 par GSK3 entraînerait une diminution de l'activité de MAML1 en diminuant l'acétylation globale des histones favorisée par MAML1 (Saint Just Ribeiro *et al.*, 2009). Une autre étude suggère aussi que MAML1 est une protéine régulée par phosphorylation. Les sites ainsi que la kinase impliquée n'ont toutefois pas été identifiés (Jeffries *et al.*, 2002).

Un autre exemple de kinase phosphorylant NIC1 : la caséine kinase 2 (CK2) a été montrée pour être un régulateur négatif de la voie NOTCH. Avant son intégration dans un complexe transcriptionnel, NIC1 serait phosphorylé sur la S1901, dans son domaine ANK, par la CK2. Une fois en complexe avec CSL et MAML1, NIC1 serait subséquentement phosphorylé par la CK2 sur sa T1898. La phosphorylation de NIC1 par la CK2 diminuerait l'association du complexe NIC1/CSL/MAML1 à l'ADN et conséquemment aurait un impact négatif sur l'activité transcriptionnelle du complexe. Il faut souligner que dans cette étude, malgré une dissociation de NIC1/CSL/MAML1 de l'ADN favorisée par la phosphorylation de NIC1 par CK2, les trois protéines demeurent associées suggérant que l'interaction de NIC1, CSL et MAML1 n'est pas suffisante pour soutenir une activité transcriptionnelle (Ranganathan *et al.*, 2011).

Finalement, des résultats du laboratoire ont montré que l'activation de la voie MEK/ERK promeut la phosphorylation de NIC1 et favorise l'expression des gènes cibles de la voie NOTCH (Tremblay *et al.*, 2013). Cependant, les sites de phosphorylation ERK-dépendant sur NIC1 restent à être identifiés.

1.4.6. Sumoylation

Il a été démontré que MAML1 pouvait être sumoylé sur ces lysines K217 et K299. La SUMO E2 ligase UBC9 ainsi que la SUMO E3 ligase PIAS1 pourrait être impliquées dans la sumoylation de MAML1 alors que la protéase SENP1 en assurerait la réversibilité. Il a été suggéré que la sumoylation de MAML1 permettrait son association avec l'histone désacétylase HDAC7, ce qui engendrerait une répression de la transcription (Lindberg *et al.*, 2010). À noter que jusqu'à présent, aucune étude n'a démontré une régulation de NIC1 par sumoylation.

Dans leur ensemble, ces travaux montrent que les modifications post-traductionnelles peuvent participer à la régulation du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1. En effet, bien que les mécanismes aient été peu documentés, les données de la littérature suggèrent que diverses modifications post-traductionnelles régulent l'assemblage du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1, assurent le recrutement de partenaires transcriptionnels, promeuvent l'activité de la plateforme transcriptionnelle NIC1/CSL/MAML1 et permettent une régulation contrôlée de celle-ci en assurant son démantèlement. Une coordination inappropriée de ces modifications post-traductionnelles pourraient contribuer à la régulation aberrante du signal NOTCH dans les cellules tumorales.

1.5.Hypothèse et objectifs

Étant donné les rôles soupçonnés de la signalisation NOTCH au cours du développement et dans l'homéostasie tissulaire chez l'adulte (Radtke & Raj, 2003; Leong & Karsan, 2006; Guo *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2008; Aster *et al.*, 2008; Bray, 2006; Borggrefe & Oswald, 2009; Edlund, 2002; Dontu *et al.*, 2004), des souris transgéniques ont été générées afin d'explorer plus en détails l'impact de l'activation de la voie Notch1 au cours du développement et dans des processus de carcinogenèse (Srinivas *et al.*, 2001; Murtaugh *et al.*, 2003). Ces souris transgéniques présentent une insertion de la séquence *Nic1* dans le locus ubiquitaire GT(ROSA)26Sor et ont été nommées ROSA^{Nic1}. L'expression de *Nic1* peut être induite suite à une recombinaison médiée par la Cre, une Cre-recombinase souvent sous le contrôle d'un promoteur spécifique de façon à restreindre l'expression de *Nic1* dans un tissu ou un type cellulaire spécifique. Jusqu'à ce jour, plus de 100 articles rapportant des phénotypes obtenus à l'aide des souris ROSA^{Nic1} ont été publiés. Il est cependant à noter que la séquence du *Nic1* murin exprimé dans la souris ROSA^{Nic1} suite à la recombinaison comprend les acides aminés 1749 à 2293. Il s'agit d'un *Nic1* auquel il manque les derniers 238 acides aminés produisant une protéine tronquée de son domaine C-terminal (*Nic1dC*). Les auteurs n'ont pas fourni d'explication sur la raison de cette délétion. La conséquence est donc que toutes les études utilisant les souris ROSA^{Nic1} observent l'impact de l'expression d'un *Nic1dC* et non *Nic1*. À noter qu'une protéine *Nic1* tronquée correspondant au *Nic1dC* n'est ni observée dans les tissus au cours du

développement ni détectée en condition physiologique chez l'adulte. De plus, tel que souligné dans la section 1.4, le domaine C-terminal de NIC1/Nic1 présente plusieurs sites potentiels pouvant être régulés par diverses modifications post-traductionnelles. Ces modifications ayant été associées à des effets variés tels que la stabilisation et la dégradation de la protéine, il est difficile d'envisager l'impact global d'une délétion importante du domaine C-terminal sur la signalisation médiée par Nic1. Ainsi, comme les mécanismes de régulation du complexe Nic1/CSL/Maml1 demeurent peu compris, nous pouvons nous demander si Nic1dC est compétent à récapituler les signaux émis par Nic1.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons voulu explorer davantage les mécanismes pouvant être impliqués dans la régulation fine et contrôlée de la signalisation NOTCH1, de la régulation du récepteur NOTCH1 à la libération du NIC1 et son intégration dans une plateforme transcriptionnelle. Nous avons émis l'**hypothèse** que les modifications post-traductionnelles sur NIC1, particulièrement dans son domaine C-terminal, assure une régulation fine des signaux contrôlés par NIC1. Afin de valider notre hypothèse, nous nous sommes fixés 3 objectifs.

Objectif 1 : Déterminer l'impact de la délétion du domaine C-terminal de NIC1 sur l'activité du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1,

Objectif 2 : Identifier des mécanismes de régulation post-traductionnelle du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1 influencés par la perte du domaine C-terminal de NIC1,

Objectif 3 : Évaluer la participation des processus endocytiques dans la régulation de NOTCH1

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Culture cellulaire et agents pharmacologiques

Les expériences ont été réalisées à l'aide de 3 modèles cellulaires. Les cellules pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2 (ATCC : CRL-1420) ont été utilisées pour étudier la régulation endogène de la signalisation NOTCH. Les cellules de rein embryonnaire de rein HEK293T (gracieuseté du Pr Jean-Luc Parent, département de médecine, Université de Sherbrooke, Canada) ont été utilisées pour des transfections transitoires. Enfin, les cellules d'ostéosarcome humain U2OS Flp-In™ T-REX™ (gracieuseté du Pr François-Michel Boisvert, département d'anatomie et de biologie cellulaire, Université de Sherbrooke, Canada) ont servi pour générer les lignées cellulaires stables U2OS GFP-NIC1 et U2OS GFP-NIC1dC.

Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (319-005-CL, Wisent bioproducts) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (095150, Wisent bioproducts), 10mM d'HEPES (330-050-EL, Wisent bioproducts) et 2mM de Glutamax™ (35050-06, life Technologies). Le milieu des cellules U2OS Flp-In™ T-REX™ (U2OS FT) a également été supplémenté avec de l'hygromycine B et de la zéocine (Tableau 1). La culture cellulaire a été faite dans un environnement humide à 37°C, en présence de 5% CO₂. Le milieu de culture a été changé tous les 2 jours et les cellules ont été trypsinisées (Trypsine 0.25% avec EDTA 2.21mM (325-043-CL, Wisent bioproducts)) à l'atteinte de 90% de confluence. Lorsque spécifié, les cellules ont été traitées par divers agents pharmacologiques répertoriés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Agents pharmacologiques utilisés

Nom	Concentration finale utilisée	Fonction	Numéro	Compagnie
EGTA	4mM	Chélateur de Ca ²⁺	E4378	Sigma-Aldrich
DAPT	25µM	Inhibiteur du complexe γ-sécrétase	208255-80-5	Calbiochem

Cycloheximide	25µg/ml	Inhibiteur de synthèse protéique	01810	Sigma-Aldrich
MG132	10µM	Inhibiteur de protéasome	C2211	Sigma-Aldrich
NH ₄ Cl	25mM	Inhibiteur de la dégradation lysosomale	A0171	Sigma-Aldrich
U0126	10µM	Inhibiteur de MEK1/2	9903	Cell signaling technology
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	100nM	Active les PKC conventionnelles	P8139	Sigma-Aldrich
Concanavaline A	50µg/ml	Inhibiteur d'endocytose	C5275	Sigma-Aldrich
Calyculine A	10nM	Inhibiteur de sérine/thréonine phosphatases	9902	Cell signaling technology
SB203580	20µM	Inhibiteur de p38 MAPK	559389	Calbiochem
SP600125	25µM	Inhibiteur de JNK	420128	Calbiochem
CHIR99021	5µM	Inhibiteur des GSK3	S2924	Selleckchem
SCH772984	500nM	Inhibiteur des ERK1/2	S7101	Selleckchem
H89	10µM	Inhibiteur de PKA	371963	Calbiochem
Ku55933	10µM	Inhibiteur d'ATM	S1092	Selleckchem
Nu7441	10µM	Inhibiteur de DNAPK	S2638	Selleckchem
Roscovitine	50µM	Inhibiteur de CDC2/CDK5	S1153	Selleckchem
Staurosporine	1µM	Inhibiteur de PKC	S1421	Selleckchem

DMSO	Variable	Véhicule dans lequel a été resuspendu plusieurs inhibiteurs. A été utilisé pour traiter des cellules contrôles	BP231	Fischer
Doxycycline	1µg/ml	Agent d'induction	ALX-380-273	Enzo life sciences
Zéocine	100µg/ml	Agent de sélection	R25001	ThermoFisher scientific
Blasticidine S.HCl	5µg/ml	Agent de sélection	450-190-XL	Wisent bioproducts
Hygromycine B	100µg/ml	Agent de sélection	540-141-XL	Wisent bioproducts

2.2. Constructions d'ADN

Le vecteur donneur pDONR-NIC1 (résidus de NIC1 humain : 1754 à 2555) a été préalablement généré dans le laboratoire (voir mémoire de Maureen Thompson, Université de Sherbrooke, 2015) et a été utilisé pour générer un vecteur donneur qui encode pour un NIC1 tronqué de son domaine C-terminal : pDONR-NIC1dC. La séquence codante pour NIC1dC (résidus 1754 à 2301 de NIC1 humain) a été amplifiée par PCR (voir section 2.9) avec les oligonucléotides décrits dans le tableau 2. La séquence NIC1dC amplifiée a par la suite été purifiée par extraction sur gel (28704, Qiagen) et clonée dans le vecteur donneur pDONR221 à l'aide de la BP Clonase™ Enzyme Mix (11789020, Gateway® Technology, Invitrogen). Les inserts codants pour NIC1 (résidus 1754-2555) et NIC1dC ont ensuite été recombinés dans différents vecteurs de destination comprenant une étiquette GFP en N-terminal (pDEST53 et pGLAP1) avec la LR Clonase™ Enzyme Mix (11791-020, Gateway® Technology, Invitrogen). Les constructions utilisées sont énumérées dans le tableau 3.

Tableau 2 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour NIC1dC

Nom	Sens (5' -> 3')	Anti-sens (5' -> 3')
<i>NIC1dC</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTTCGAAGGAGATA GAACCATGGTGCTGCTGTCCC GCAAGCGCCGGCGGCAGC	GGGGACCACTTTGTA CAAGAAAGCTGGGTC GGACCCGCCACAGT GAAATTCAGGGCCCCTCC

Tableau 3 : Vecteurs et gènes-rapporteurs utilisés

Plasmide	Caractéristique	Fournisseur
pDONR221-NIC1	Vecteur d'entrée qui possède la forme sauvage de NIC1 humain correspondant aux résidus 1754 à 2555	Construction maison
pDONR221-NIC1dC	Vecteur d'entrée qui possède la forme tronquée de NIC1 humain correspondant aux résidus 1754 à 2301	
pDEST53	Vecteur d'expression eucaryote possédant une étiquette GFP en N-terminal	Grâceuseté Pr François-Michel Boisvert
pDEST53-NIC1	Vecteur d'expression eucaryote possédant la forme sauvage de NIC1 humain (résidus 1754 à 2555)	Construction maison
pDEST53-NIC1dC	Vecteur d'expression eucaryote possédant la forme tronquée NIC1dC humain (résidus 1754 à 2301)	
pgLAP1	Vecteur d'expression eucaryote possédant une étiquette GFP en N-terminal (sélection blastocidine et hygromycine)	Grâceuseté Pr François-Michel Boisvert
pgLAP1-NIC1	Vecteur d'expression eucaryote possédant la forme sauvage de NIC1 humain (résidus 1754 à 2555)	Construction maison
pgLAP1-	Vecteur d'expression eucaryote possédant la	Construction

NIC1dC	forme tronquée NIC1dC humain (résidus 1754 à 2301)	maison
pOG44	Vecteur exprimant la Flp recombinase	Invitrogen
CSL-4x-luciférase	Quatre répétitions du site de liaison de CSL en amont du gène de la luciférase de mouche à feu	Addgene 41726
Hes1-luciférase	Région promotrice de 1270pb d' <i>Hes1</i> murin (-1046 à +224) en amont du gène de la luciférase de mouche à feu	Gracieuseté Pre Ruth S. Slack (U. Ottawa)
pRL-TK	Gène de la luciférase de Renilla régulé par le promoteur de la thymidine kinase	Gracieuseté Pr François Boudreau (U.Sherbrooke)

2.3. Transfections transitoires et stables

Les cellules MIA PaCa-2 et HEK293T ont été transfectées transitoirement tandis que les populations U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été générées par transfections stables.

Pour les transfections transitoires dans les cellules HEK293T, la Lipofectamine 2000 (11668-027, Invitrogen) a été utilisée. Les cellules ont étéensemencées dans un pétri afin d'obtenir 50-70% de confluence le lendemain et transfectées avec la Lipofectamine 2000 selon les recommandations du manufacturier. Brièvement, la Lipofectamine 2000 a été incubée 5 min dans l'OPTI-MEM (31985-070, Gibco) (solution A) (Tableau 4). Pendant ce temps, de l'ADN du vecteur vide pDEST53, pDEST53-NIC1 ou pDEST53-NIC1dC a été dilué dans l'OPTIMEM (solution B). Puis, les solutions A et B ont été combinées et incubées pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules ont été lavées avec de l'OPTI-MEM et un volume d'OPTI-MEM a été ajouté selon la taille du pétri (Tableau 4). Le mélange des solutions A et B a été ajouté aux cellules goutte à goutte et incubé pendant 4h. Ce mélange a été retiré puis remplacé par du DMEM frais. Les cellules ont été lysées 24h à 48h suivant la transfection.

Tableau 4 : Conditions de transfection à la Lipofectamine 2000

	24 puits	35mm	60mm	100mm
Solution A	2µl de Lipofectamine 2000/µg d'ADN dans 50 µl d'OPTI-MEM	2µl de Lipofectamine 2000/µg d'ADN dans 100 µl d'OPTI-MEM	2µl de Lipofectamine 2000/µg d'ADN dans 200 µl d'OPTI-MEM	2µl de Lipofectamine 2000/µg d'ADN dans 500 µl d'OPTI-MEM
Solution B	Quantité d'ADN indiqué dans 50 µl d'OPTI-MEM	Quantité d'ADN indiqué dans 100 µl d'OPTI-MEM	Quantité d'ADN indiqué dans 200 µl d'OPTI-MEM	Quantité d'ADN indiqué dans 500 µl d'OPTI-MEM
Volume d'OPTI-MEM ajouté par puits/pétri	500µl	800µl	1.5ml	5ml

Les cellules MIA PaCa-2 ont été transfectées transitoirement avec le jetPRIME[®] (114-07, Polyplus transfection) suivant les recommandations du manufacturier. Brièvement, les ADN (vecteur vide pDEST53, pDEST53-NIC1 ou pDEST53-NIC1dC) ont été dilués dans le tampon jetPRIME[®] (Tableau 5). Le réactif jetPRIME[®] a été ajouté au mélange ADN + jetPRIME[®] avant d'être incubé 10 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, le milieu des cellules a été remplacé par du milieu frais. Le mélange, ADN + jetPRIME[®], a ensuite été déposé goutte à goutte.

Pour chacune des expériences de transfection, le vecteur vide pDEST53 a été utilisé pour assurer des quantités équivalentes d'ADN entre les différentes conditions. Des cellules transfectées seulement avec le vecteur vide pDEST53 ont servi de contrôle. Les cellules ont été lysées 24 à 48h suivant la transfection.

Tableau 5 : Conditions de transfection au jetPrime®

	24 puits	35mm	60mm	100mm
Réactif jetPrime®	2µl de Réactif jetPrime®/µg d'ADN dans 50 µl de tampon jetPrime®	2µl de Réactif jetPrime®/µg d'ADN dans 100 µl de tampon jetPrime®	2µl de Réactif jetPrime®/µg d'ADN dans 200 µl de tampon jetPrime®	2µl de Réactif jetPrime®/µg d'ADN dans 500 µl de tampon jetPrime®
ADNc	Quantité d'ADN indiqué dans 50 µl d'OPTI-MEM	Quantité d'ADN indiqué dans 100 µl d'OPTI-MEM	Quantité d'ADN indiqué dans 200 µl d'OPTI-MEM	Quantité d'ADN indiqué dans 500 µl d'OPTI-MEM
Volume de milieu de culture	500µl	800µl	1.5ml	5ml

Les populations stables U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été générées à l'aide des cellules U2OS Flp-In™ T-REX™ (U2OS FT). Les cellules U2OS Flp-In™ T-REX™ ont étéensemencées dans 2 pétris de 100mm pour atteindre 80% de confluence le lendemain de l'ensemencement. Les transfections stables ont été réalisées avec l'Effectene® Transfection Reagent (301425, Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. La quantité totale d'ADN était de 2µg. Brièvement, 200ng de pgLAP1-NIC1 ou de pgLAP1-NIC1dC combinés à 1800ng de pOG44 (voir Tableau 3 pour une description des vecteurs) ont été dilués dans 300µl de tampon EC auxquels 8µl d'Enhancer ont été ajoutés. Après incubation de 5 minutes, 24µl d'Effectene® Transfection Reagent ont été ajoutés à ce mélange. Le ratio ADN : Effectene® était donc de 1 : 12. Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante avant d'y ajouter 3ml de milieu frais. Pendant ce temps, le milieu de culture des cellules à transférer a été remplacé par 7ml de milieu frais ne contenant aucun agent de sélection. La solution ADN + Effectene® a été ajoutée aux cellules et incubée pendant 48 heures. Les cellules ont ensuite été cultivées dans du DMEM supplémenté en 10% FBS, 10mM HEPES, 2mM Glutamax ainsi qu'en hygromycine B et blasticidine

(Tableau 1) afin de sélectionner des populations stables de cellules exprimant GFP-NIC1 (U2OS GFP-NIC1) ou GFP-NIC1dC (U2OS GFP-NIC1dC). Pour chacune des protéines d'intérêt (GFP-NIC1, GFP-NIC1dC), 2 populations stables ont été générées de façon indépendante et les résultats étaient similaires entre les 2 populations. Les résultats obtenus à l'aide d'une de ces populations stables sont présentés. L'hygromycine B et la blasticidine ont été maintenues dans le milieu de culture de ces populations stables.

2.4. Préparation des extraits protéiques

2.4.1. Extraction des protéines totales : lyse triton

Les cellules ont été rincées 2 fois au PBS froid puis lysées dans du tampon de lyse triton (1% triton X-100, 50mM tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 5mM EDTA pH8.0, 40mM β -glycérophosphate, 50mM NaF, 10% glycérol, 200 μ M de sodium orthovanadate, 1mM PMSF, 0.5 μ g/ml aprotinine, 0.5 μ g/ml leupeptine et 0.7 μ g/ml pepstatine) pendant 10 minutes sur glace. Ensuite, les extraits ont été centrifugés 10 minutes à 10 000rpm à 4°C et le surnageant a été récupéré. Les échantillons ont été dosés en triplicata à l'aide de la méthode BCA (23225, Pierce) pour déterminer la concentration protéique. Une courbe standard a été établie avec l'albumine de sérum bovin (BSA), réalisée en parallèle à chaque dosage. Les extraits protéiques ont été conservés à -20°C.

2.4.2. Fractionnement subcellulaire

Les cellules ont été rincées 2 fois au PBS froid avant d'être récupérées dans du PBS froid et centrifugées à 10 000rpm à 4°C pendant 5 minutes. Le culot a été resuspendu dans du tampon A (10mM Hepes pH 7.9, 10mM KCl, 0.1mM EDTA pH8.0, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 10mM NaF, 10mM β -glycérophosphate, 200 μ M de sodium orthovanadate, 1mM PMSF, 0.5 μ g/ml aprotinine, 0.5 μ g/ml leupeptine et 0.7 μ g/ml pepstatine) puis incubé 15 minutes sur glace. Ensuite, 0.625% de Nonidet P-40 (9016-45-9, Bio Basic Canada) a été ajouté et le mélange a été vortexé pendant 15 secondes avant d'être centrifugé pendant 30 secondes à 12 000g à 4°C. Le surnageant, contenant les protéines cytosoliques, a été récupéré. Le culot a été resuspendu dans du tampon B (20mM Hepes pH 7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA pH8.0, 1mM EGTA, 1mM DTT, 10mM NaF, 10mM β -glycérophosphate, 5% glycérol, 200 μ M de sodium orthovanadate, 1mM PMSF, 0.5 μ g/ml aprotinine, 0.5 μ g/ml

leupeptine et 0.7µg/ml pepstatine). L'extrait a été centrifugé 10 minutes à 10 000rpm à 4°C et le surnageant enrichi en protéines nucléaires a été récupéré. La concentration des protéines a été déterminée avec la méthode BCA et les extraits protéiques ont été conservés à -20°C.

2.5.Immunobuvardage et densitométrie

Des quantités équivalentes d'échantillon ont été préparées avant d'être déposées sur gel SDS-PAGE. Les protéines et un marqueur de poids moléculaire maison (0.35mg/ml phosphorylase B (94kDa), 0.15mg/ml BSA (66kDa), 1mg/ml ovalbumine (45kDa), 0.2mg/ml carbonic anhydrase (32kDa), 0.3mg/ml trypsinogène (24kDa), 0.2mg/ml β -lactoglobuline (18kDa) et 0.3mg/ml lysosyme (14kDa) dans du Laemmli 2X) ont été dénaturées en ajoutant du Laemmli (1X : 62.5mM tris-HCl pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glycérol, 1mM PMSF, 0.005% bleu de bromophénol et 5% β -mercaptoéthanol). Les échantillons préparés ont été chauffés 5 minutes à 95°C et séparés sur gel SDS-PAGE (acrylamide/bis 37.5 :1, 375mM tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% ammonium persulfate, 0.033% TEMED). La migration des gels a été effectuée à 20mA/gel pendant 4h à température ambiante dans un tampon de migration (25mM tris, 192mM glycine, 0.1% SDS). Ensuite, les protéines ont été électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose (162-0115, Bio-RAD) ou PVDF (polyvinylidene fluoride ; NEF1002001PK, Perkin Elmer) dans un tampon de transfert (25mM tris, 192mM glycine, 10% éthanol) à 110mA pendant 16h à 4°C. Pour s'assurer de l'uniformité du transfert et de la quantité de protéines séparées, les membranes ont été colorées au rouge de Ponceau (0.2% Ponceau S, 3% acide trichloroacétique) puis décolorées dans de l'eau avant d'être bloquées 1h à température ambiante dans une solution de blocage (PBS 1X, 0.05% Tween-20, 5% lait en poudre). Ensuite, les membranes ont été incubées avec agitation pendant 2h à température ambiante ou pendant toute une nuit à 4°C à l'aide d'anticorps primaires (Tableau 6) dilués dans la solution de blocage. Les membranes ont ensuite été lavées 3 fois pendant 10 minutes avec agitation dans une solution de PBS-T (PBS 1X, 0.05% de Tween-20) avant d'être incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (Tableau 7) conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) dilué dans la solution de blocage. Enfin, les membranes ont été lavées 3 fois pendant 10 minutes dans du PBS-T et 10 minutes dans du PBS avant d'être

incubées 1 minute dans la solution de révélation (0.1M tris pH 8.5, 225 μ M acide coumarique, 1.25mM luminol, 0.009% peroxide d'hydrogène). Les protéines ont été détectées par chemiluminescence en utilisant les films HyBlot CL (E3012, Denville scientific inc.). Les immunobuvardages présentés sont représentatifs d'une expérience.

Les films ont été numérisés afin de pouvoir quantifier les variations d'expression protéique par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ version 1.48d. Les variations d'expression ont été calculées par le ratio de l'expression de la protéine d'intérêt sur l'expression de la GAPDH ou de l'ACTINE. Une représentation graphique des variations d'expression protéique d'au moins 3 expériences (ou tel que précisé dans la légende) est montrée.

Tableau 6 : Anticorps primaires utilisés

Anticorps	Espèce	Dilution	# de référence	Compagnie
ACTINE	Souris	1 :20 000	MAB1501R	Millipore
CSL	Lapin	1 :3 000	5313	Cell Signaling Technology
CYCLINE D1	Lapin	1 :1 000	Sc-753	Santa Cruz Technology
ERKt	Lapin	1 :1 000	Sc-93	Santa Cruz Technology
p-ERK	Lapin	1 :2 000	9101	Cell Signaling Technology
GAPDH	Lapin	1 :30 000	2118	Cell Signaling Technology
GFP	Souris	1 : 1000	Sc-9996	Santa Cruz Technology
HES1	Lapin	1 :1 000	11988	Cell Signaling Technology
Lamine B	Chèvre	1 :1 000	Sc-6217	Santa Cruz Technology
NIC1	Lapin	1 :1 000	4147	Cell Signaling Technology
NOTCH1	lapin	1 :1 000	Sc-6014	Santa Cruz Technology
MAML1	Lapin	1 :1 000	4608	Cell Signaling Technology
MPM2	Souris	1 : 1000	05-368	Millipore
c-MYC	Souris	1 :1 000	Sc-40	Santa Cruz Technology

Tableau 7 : Anticorps secondaires utilisés

Anticorps	Espèce	Dilution	# de référence	Compagnie
IgG lapin (couplé à la HRP)	Chèvre	1 :2 500	111-035-003	Jackson immuno-research laboratories
IgG souris (couplé à la HRP)	Chèvre	1 :2 500	115-035-003	
IgG chèvre (couplé à la HRP)	Poulet	1 :2 500	Sc-2953	Santa Cruz Technology

2.6. Immunoprécipitation

Des immunoprécipitations ont été réalisées soit à l'aide des billes GFP-Trap_A[®] (Chromotek gta-20) ou avec des anticorps couplés à des billes de protéine-G-sépharose magnétiques ou non (161-4023, BIORAD ; 17-0618-01, GE Healthcare).

Pour immunoprécipiter des protéines endogènes, les billes de protéine-G-sépharose ont été utilisées. Les billes ont d'abord été lavées 3 fois avec du tampon triton et resuspendues dans du tampon triton (voir section 2.4.1). Un pré-lavage des échantillons a été fait avec les billes de protéine-G-sépharose pour réduire les interactions non spécifiques. Pour ce faire, 1mg d'extraits protéiques, dont le volume a été complété à 500-1000µl avec du tampon triton, a été incubé 30 minutes à 4°C sous agitation avec 15µl de billes de protéine-G-sépharose lavées. Les billes ont ensuite été retirées de l'échantillon par centrifugation à 2 000 rpm pendant 1 minute à 4°C ou par magnétisme avant de réaliser l'immunoprécipitation. Quatre microlitres d'anticorps (tableau 6) ont été ajoutés par échantillon avant d'être incubé 3 heures à 4°C sous agitation. Puis, 40-50µl de billes de protéine-G-sépharose lavées ont été ajoutées à l'échantillon qui a été incubé 1 heure à 4°C sous agitation. Les immunocomplexes ont été lavés 3 fois avec du tampon triton avant d'être resuspendus dans 40µl de Laemmli 4X.

Pour l'immunoprécipitation de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC, les billes GFP-Trap_A[®] ont été utilisées. Les billes ont d'abord été lavées 3 fois avec du tampon triton et resuspendues dans du tampon triton. Puis, 10µl de billes ont été ajoutés pour 1mg

d'échantillon. Les échantillons avec les billes ont été incubés 1 heure à 4°C sous agitation. Les immunocomplexes ont été lavés 3 fois avec du tampon triton et resuspendus dans 40µl de Laemmli 4X.

Avant leur séparation sur gel SDS-PAGE, les immunocomplexes ont été chauffés 5 minutes à 95°C (section 2.5) avec en parallèle un extrait protéique du lysat cellulaire ayant servi à l'immunoprécipitation.

2.7. Essais phosphatase

Suivant l'immunoprécipitation (voir section 2.6), les immunocomplexes ont été lavés 2 fois avec du tampon triton sans inhibiteur de phosphatases puis 2 fois dans du tampon phosphatase PMP (B0761, NEB). Les immunocomplexes ont par la suite été séparés en 2 fractions équivalentes. Ces dernières ont été incubées avec ou sans 200U de Lambda (λ) phosphatase (P0753, NEB) pendant 30 minutes à 30°C. Enfin, les immunocomplexes ont été resuspendus dans 40µl de Laemmli 4X, chauffés 5 minutes à 95°C et séparés par SDS-PAGE (section 2.5) avec en parallèle un extrait protéique du lysat cellulaire ayant servi à l'immunoprécipitation.

2.8. Essais luciférase

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits afin d'obtenir 70% de confluence le lendemain. Le lendemain de l'ensemencement, les cellules HEK293T et Mia PaCa-2 ont été transfectées (section 2.3) avec les vecteurs d'expression pDEST53, pDEST53-NIC1 et pDEST53-NIC1dC. Toutes les cellules ont été transfectées avec un gène-rapporteur de l'activité NOTCH (CSL- ou HES1-luciférase de mouche à feu) et un gène-rapporteur agissant comme contrôle interne couplé à l'activité luciférase de Renilla (tableau 3). Au moment de la transfection, les cellules U2OS FT, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites ou non à la doxycycline pendant 24h. À noter que chaque transfection a été fait en triplicata. Les échantillons ont été préparés avec un ensemble d'essai luciférase (E1910, Promega) selon les recommandations du manufacturier. Brièvement, 24 heures après la transfection, les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS froid avant d'être lysées dans 200µl du tampon de lyse passif froid. Ensuite, elles ont été incubées 15 minutes à température ambiante avec agitation. Finalement, 100µl de lysat

cellulaire par échantillon ont été utilisés pour mesurer l'activité luciférase grâce à un luminomètre (Berthold detection system) selon la manière suivante : ajout de 50µl de réactif pour essai luciférase, lecture de l'activité luciférase de mouche à feu (10 secondes), ajout de 50µl de tampon Stop and Glow[®], lecture de l'activité luciférase de Renilla (10 secondes).

2.9.Extraction d'ARN et réaction de polymérisation en chaîne

Les ARN des cellules ont été isolés avec la trousse RNeasy (74134, Qiagen) en suivant les instructions du manufacturier. Brièvement, les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS froid puis lysées dans 350µl de tampon RLT contenant 1% de β-mercaptoéthanol en vortexant jusqu'à obtention d'une solution homogène. L'ADN génomique (ADNg) a été éliminé à l'aide des colonnes d'élimination d'ADNg et les échantillons ont été centrifugés à 13 000rpm pendant 30 secondes. Ensuite, 600µl d'éthanol 70% ont été ajoutés à l'éluat avant d'être appliqué sur une colonne RNeasy et centrifugé 15 secondes à 13 000rpm. La colonne RNeasy a été lavée avec d'abord 700µl puis 500µl des tampons fournis, suivis d'une centrifugation de 15 secondes à 13 000rpm. Un dernier lavage de 500µl de la colonne RNeasy a été réalisé suivi d'une centrifugation de 2 minutes à 13 000rpm. Enfin, les ARN totaux ont été élués dans un tube collecteur neuf avec 30µl d'eau sans ARNase puis conservé à -80°C.

La transcription inverse (RT) a été exécutée avec la trousse de Transcription Inverse Quantitect (205311, Qiagen). Brièvement, 1µg d'ARN a été incubé pendant 2 minutes à 42°C avec 12µl d'eau stérile et 2µl de tampon fourni pour éliminer l'ADN génomique. Au terme du 2min d'incubation ont été ajouté à ce 14µl, 1µl de l'enzyme RT, 4µl de tampon pour l'enzyme RT 5X et 1µl du mélange d'oligonucléotides RT. Le tout a été incubé pendant 30 minutes à 42°C afin d'obtenir des ADNc. Enfin, la réaction a été arrêtée suite à une incubation pendant 3 minutes à 95°C et l'ADNc obtenu a été conservé à 4°C.

Pour amplifier la séquence d'ADNc voulue, une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée sur 1µg d'ADNc avec l'aide de 0.02unités/µl de l'ADN polymérase iproof (172-5301, BIO-RAD), de 200µM dNTP (dGTP : 28406521V, dATP : 28406501V, dCTP : 28406511V, dTTP : 28406531V, GE Healthcare), de 0.2µM d'oligonucléotides

sens et anti-sens (Tableau 8, IDT) (Tableau 2 pour NIC1dC) et du tampon de réaction iproof HF. Les détails pour les réactions PCR sont mentionnés dans le tableau 9.

Tableau 8 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour la réaction en chaîne

Nom	Sens (5' -> 3')	Anti-sens (5' -> 3')
<i>HEY2</i>	AGGCTACTTTGACGCACACG	CAAGTGCTGAGATGAGACACAAG
<i>NOTCH4</i>	ACTTGGTCCGTAGACTTGGC	TCTGCTCTGGTGGGCATACAT
<i>GAPDH</i>	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TGCTGATGATCTTGAGGCTG

Tableau 9 : Cycles pour les réactions de polymérase en chaîne

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	98°C	30 secondes	1
Dénaturation	98°C	10 secondes	30
Hybridation : <i>HEY2</i>	61°C	30 secondes	
<i>NOTCH4</i>	63°C		
<i>GAPDH</i>	58°C		
<i>NICdC</i>	77°C		
Élongation	72°C	30 secondes	
Élongation finale	72°C	10 minutes	1

Pour vérifier les réactions d'amplification par PCR, le dixième des ADNc amplifiés par PCR a été séparé sur gel 1.5% agarose (11685660001, Roche), TBE 1X (89mM tris, 89 mM acide borique, 2mM EGTA) en utilisant une coloration avec le GelRed 1X (41003, Biotium) pour révéler la présence des ADNc avec un appareil projetant des Ultra-Violets (Montreal Biotech Inc). Le gel a migré a 110V pendant 30 minutes dans du tampon TBE 1X. L'expression de chaque ADNc amplifié est comparée à la référence soit GAPDH.

2.10. Test de croissance cellulaire

Les cellules U2OS FT, U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont étéensemencées au nombre de 300 000 dans des pétris de 35mm. Les cellules U2OS FT ont été cultivées dans leur milieu de culture (sans doxycycline) tandis que les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été cultivées dans leur milieu de culture contenant de la doxycycline. Le

nombre de cellules pour chacune des populations a été compté à chaque jour post-ensemencement pendant 4 jours à l'aide d'un hémacytomètre (BrightLine, Canada). Une courbe du nombre moyen de cellules par pétri en fonction du temps a été réalisée pour les 3 populations avec le logiciel GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Quatre expériences ont été réalisées, chacune en duplicata.

2.11. Croissance en agar mou

Le fond des puits de plaques 6 puits non traitées pour la culture cellulaire a été couvert de 2ml d'un mélange (1 : 1) de DMEM 2X sans rouge de phénol (219-065-XK, Wisent bioproducts) et d'agarose de type VII 1.4% (A9045, Sigma-Aldrich). Une fois l'agarose figé, 100 000 cellules provenant des populations U2OS GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC ont été resuspendues dans 2ml/puits du mélange (1 : 1) DMEM-agarose puis déposées par-dessus l'agarose figé. Une fois solidifié, 1ml de DMEM sans rouge de phénol supplémenté en FBS 10%, hygromycine B, blasticidine, pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent bioproducts), et doxycycline lorsqu'indiqué a été ajouté à la surface de l'agarose et changé tous les 2 jours. Après 3-4 semaines, les colonies ont été colorées en incubant les cellules pendant 5h à 37°C, 5% CO₂ avec 500µl de PBS contenant 0.5mg/ml de MTT (475989, Calbiochem). Des images ont été prises et les colonies ont été dénombrées avec le logiciel CellProfiler 2.2.0.

2.12. Spectrométrie de masse

2.12.1. Préparation des échantillons

L'approche protéomique quantitative « Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture » (SILAC) d'analyse par spectrométrie de masse a été utilisée. Cette méthode repose sur l'incorporation d'acides aminés marqués avec différents isotopes dans les protéines de cellules en culture. Une fois les acides aminés marqués incorporés dans les protéines, elles peuvent être distinguées en fonction des isotopes lors de l'analyse par spectrométrie de masse.

Les cellules U2OS ont été maintenues pendant au moins 5 passages dans du milieu DMEM sans arginine et lysine (A14431-01, Life technologies) supplémenté avec 10% de

sérum dialysé (26400-044, Life technologies), 2mM L-Glutamax, 100U/ml pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent), et de l'arginine et de la lysine soit légère (L) (Arg0, Lys0 ; A5006 et L5501, Sigma), moyenne (M) (Arg6, Lys4; CNM-2265 et DLM-2640, Cambridge Isotope Laboratories) ou lourde (H) (Arg10, Lys8; CNLM-539 et CNLM-291, Cambridge Isotope Laboratories). À noter que les cellules U2OS GFP-NIC1 non induites (sans doxycycline) ont été cultivées dans le milieu léger (L) et moyen (M) et les cellules U2OS GFP-NIC1dC non induites dans le milieu lourd (H). Pour l'expérience d'analyse par spectrométrie de masse, les cellules ont été ensemencées dans des pétris de 15cm. Puis, 4h avant la lyse, les cellules U2OS GFP-NIC1 dans le milieu M et les cellules U2OS GFP-NIC1dC dans le milieu H ont été induites à la doxycycline. Donc, la condition L représente les cellules U2OS GFP-NIC1 non induites qui servent de contrôle. Les cellules ont été lysées dans du tampon triton pour la préparation d'extraits totaux (voir section 2.4.1) ou récoltées dans du PBS avant de procéder au fractionnement subcellulaire (voir section 2.4.2).

2.12.2. Préparation des peptides

Les protéines étiquetées GFP (GFP-NIC1 et GFP-NICdC) ont été immunoprécipitées (Section 2.6) à l'aide de billes GFP-Trap à partir des différents lysats cellulaires préparés en 2.12.1. En ce qui concerne les cellules qui ont été fractionnées, l'immunoprécipitation a été effectuée dans la fraction nucléaire pour enrichir les partenaires nucléaires puisque NIC1 est un facteur de transcription. Les immunocomplexes isolés à partir des échantillons des conditions L, M et H ont été combinés dans un ratio de 1:1:1. Afin de préparer les peptides, une digestion sur gel a été effectuée avec de la trypsine. Brièvement, les protéines immunoprécipitées ont été réduites dans 10mM DTT, chauffées à 95°C et alkylées dans 50mM d'iodoacétamide avant d'être séparées sur un gel SDS-PAGE (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, Novex, NP0321BOX, Thermo Fisher Scientific Inc). Le gel a été coloré au SimplyBlue SafeStain (46-5034, Invitrogen Life Technologies) pour vérifier la présence de protéines puis le gel a été décoloré à l'eau toute une nuit. La ligne de gel contenant les protéines des immunocomplexes a été découpée en huit bandes de gel et chacune des bandes placées dans des tubes LoBind (13-698-794, Eppendorf). Chaque bande a été soumise à une digestion de 16h à 30°C avec la Trypsine Gold (V5280, Promega) diluée

dans 20mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO). L'extraction des peptides a été faite par l'ajout d'acétonitrile (CH_3CN) pour 30 minutes à 30°C et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube LoBind. Les bandes ont été réhydratées dans un volume d'acide formique 1% équivalent au volume de Trypsine Gold et incubées pendant 20 minutes. Le surnageant a été transféré dans les nouveaux tubes LoBind et l'étape a été répétée une autre fois. Les morceaux de gel ont été déshydratés dans du CH_3CN et les peptides lyophilisés à l'aide d'un Speed Vac. Les peptides lyophilisés ont été resuspendus dans 20 μl de 0.1% acide trifluoroacétique (TFA). Le protocole de Zip tip® (ZTC18S960, EMD Millipore) a été utilisé pour enlever toutes traces de détergents et de sels dans les échantillons. Les échantillons ont été resuspendus dans 25 μl d'acide formique 1%. Les échantillons ont été envoyés pour analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à la Plateforme de protéomique de l'Université de Sherbrooke.

2.12.3. LC-MS/MS

Les peptides digérés ont été séparés par chromatographie en phase liquide à haute performance (nanoHPLC) grâce au système Dionex Ultimate 3000. Brièvement, 10 μl d'échantillon (environ 2 μg de peptides) dans 1% (vol/vol) d'acide formique a été injecté avec un flux de 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ sur une colonne Acclaim PepMap100 C18 (0.3mm id x 5mm, Dionex Corporation, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Après l'enrichissement, les peptides ont été élués sur une colonne PepMap C18 (75 μm x 50cm, Dionex Corporation, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) avec un gradient linéaire de 5-35% de solvant B (90% acétonitrile avec 0.1% acide formique) pendant 240 minutes avec un flux de 200nl/min. Le système de HPLC est associé à un spectromètre de masse Orbitrap QExactive (Thermo Fisher Scientific Inc, Burlington, ON, Canada) via une source EasySpray. Le voltage du vaporisateur a été ajusté à 2.0 kV et la température de la colonne a été ajustée à 40°C. L'acquisition des spectres en mode de balayage complet (m/z 350-1600) a été enregistrée par l'Orbitrap avec une résolution de 70 000, après l'accumulation de 1.000.000 ions. Les dix ions peptidiques les plus intenses de l'analyse précédente de l'Orbitrap ont été fragmentés par dissociation induite par collision (l'énergie de collision normalisée à 35% et la résolution de 17,500) après l'accumulation de 50 000 ions. Le temps

de remplissage était de 250ms pour l'analyse complète et 60 ms pour l'analyse du MS/MS. L'ion précurseur de dépistage de l'état de charge a été activé et tous les états de charge non affectés ainsi que les ions ayant une charge de +1, +7 et +8 ont été rejetés. La liste d'exclusion dynamique a été restreinte à un maximum de 500 entrées avec un maximum de temps de rétention de 40 secondes et une possibilité de masse relative de 10 ppm. L'option de verrouillage des masses a été activée pour l'analyse afin d'améliorer la précision de la masse. Les données ont été obtenues avec l'utilisation du logiciel Xcalibur 2.1.

2.12.4. Quantification et analyse bio-informatique

Les données ont été quantifiées avec le logiciel MaxQuant version 1.4.1.2 et les données recherchées dans la banque de données Human Uniprot (16/07/2013, 88,354 entrées). Les paramètres d'analyse MaxQuant comprenaient: deux mauvaises coupures acceptées, la carboamidométhylation des cystéines comme modification non variable, la digestion avec la trypsine (K/R avant P), l'oxydation des méthionines et l'acétylation des protéines en N-terminale comme modifications variables, une tolérance de masse de 7 ppm pour l'ion précurseur et une tolérance de 20 ppm pour les fragments d'ion. L'option de requantification (re-quantify) a été sélectionnée pour calculer le ratio isotopique lorsque les paires d'isotope n'avaient pas été identifiées, ce qui est souvent observé dans des expériences d'immunoprécipitation à cause de l'absence de la protéine d'intérêt dans le contrôle. Pour obtenir une identification fiable, toutes les protéines ont été acceptées sur le critère que le nombre de protéines identifiées dans la base de données est 100 fois plus grand par rapport au nombre de protéines identifiées dans une base de données dont les séquences ont été inversées, conduisant ainsi à un taux de fausse découverte de moins de 1 %. Un minimum de 2 peptides a été quantifié pour chaque protéine. Une expérience d'analyse en spectrométrie de masse a été réalisée à partir d'immunoprécipitats de lysats totaux. Une expérience d'analyse en spectrométrie de masse à l'aide d'immunoprécipitats provenant d'extraits nucléaires a également été réalisée. Les peptides avec un ratio supérieur ou égal à 2 sont présentés. Les peptides identifiés ont été catégorisés en cherchant leur fonction grâce à la banque de données Uniprot.

2.13. Analyses statistiques

Toutes les statistiques ont été calculées avec soit le logiciel Microsoft Excel ou GraphPad Prism7 à l'aide du t-test ou du test ANOVA. Un $p \leq 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

3. RÉSULTATS

3.1. **Objectif 1 : Déterminer l'impact de la délétion du domaine C-terminal de NIC1 sur l'activité du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1**

3.1.1. La délétion du domaine C-terminal de NIC1 influence la stabilité du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1

Pour évaluer le rôle du domaine C-terminal de NIC1, nous avons supprimé les derniers 255 acides aminés de la séquence humaine du NIC1 pour produire une version tronquée NIC1dC (acides aminés 1754 à 2301). Ce NIC1dC correspond à la version du Nic1 (acides aminés 1749-2293) exprimé par les souris Rosa^{Nic1} générées par Murtaugh *et al.* et utilisées pour évaluer les effets d'une activation constitutive de la voie NOTCH1 (Murtaugh *et al.*, 2003). Pour générer des cellules exprimant NIC1 ou NIC1dC, nous avons utilisé la lignée cellulaire U2OS Flp-In™ T-REx™ (U2OS FT) qui a l'avantage de permettre une insertion ciblée d'une seule copie de NIC1 à un site d'intégration transcriptionnellement actif. Ainsi, nous avons pu générer des lignées stables, inductibles à la doxycycline, de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC. Pour confirmer l'expression de GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC dans nos populations stables, nous les avons traitées à la doxycycline. Contrairement aux cellules parentales U2OS FT, les lignées U2OS GFP-NIC1 et U2OS GFP-NIC1dC expriment une protéine fusionnée à la GFP suite au traitement à la doxycycline (Figure 8A). Les partenaires transcriptionnels de NIC1, CSL et MAML1, sont exprimés à des niveaux comparables dans toutes les populations cellulaires U2OS bien que nous observons régulièrement une forme retardée de MAML1 sur SDS-PAGE dans les cellules U2OS GFP-NIC1 induites (Figure 8A).

Nous avons également utilisé un autre système pour exprimer NIC1 et sa forme tronquée NIC1dC soit les cellules pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2 dans lesquelles nous avons exprimé transitoirement GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC (Figure 8B). Nous observons que les cellules transfectées expriment GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC

contrairement aux cellules qui sont transfectées avec le vecteur vide pDEST53. Les formes endogènes de CSL et MAML1, les partenaires de NIC1 formant le complexe transcriptionnel ternaire, sont exprimés à des niveaux comparables dans les différentes populations de cellules MIA PaCa-2 transfectées.

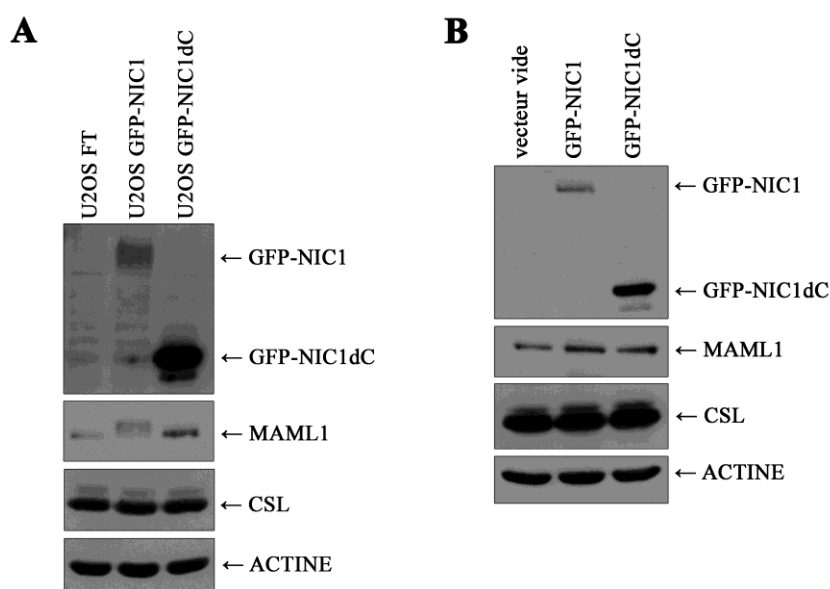


Figure 8 : Génération de lignées cellulaires exprimant GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC.

A) Les lignées U2OS FT, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites à la doxycycline (1µg/ml) pendant 24h. **B)** Les cellules MIA PaCa-2 ont été transfectées avec la même quantité d'ADN (6µg) de vecteur vide (pDEST53), GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC avant d'être lysées (24h post-transfection) et les protéines analysées par immunobuvardage. **A, B)** L'expression de NIC1, MAML1, CSL et ACTINE a été évaluée par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques. L'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC a été évaluée à l'aide de l'anticorps anti-GFP. (n=3)

Dans les cellules MIA PaCa-2, nous avons constaté que GFP-NIC1dC est plus fortement exprimé que GFP-NIC1 malgré des quantités égales d'ADN (Figure 8B). Malgré le site unique et ciblé d'intégration du NIC1 ou NIC1dC dans les cellules U2OS FT, nous avons également remarqué une plus forte expression de GFP-NIC1dC comparativement à GFP-NIC1 suite à un traitement prolongé à la doxycycline (Figure 8A). Pour mieux détailler le profil d'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC, nous avons traité les cellules

U2OS à la doxycycline pendant différentes périodes de temps. Nous observons que l'expression de GFP-NIC1 atteint un plateau suivant 5-6h d'induction à la doxycycline tandis que l'expression de GFP-NIC1dC continue d'augmenter au cours du temps de traitement à la doxycycline (Figure 9A). Nous pouvons apprécier la différence significative d'expression entre GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC à 24h de traitement à la doxycycline grâce au graphique (Figure 9B). En effet, l'expression de GFP-NIC1dC est environ 4 fois plus élevée que celle de GFP-NIC1 après 24h d'induction à la doxycycline.

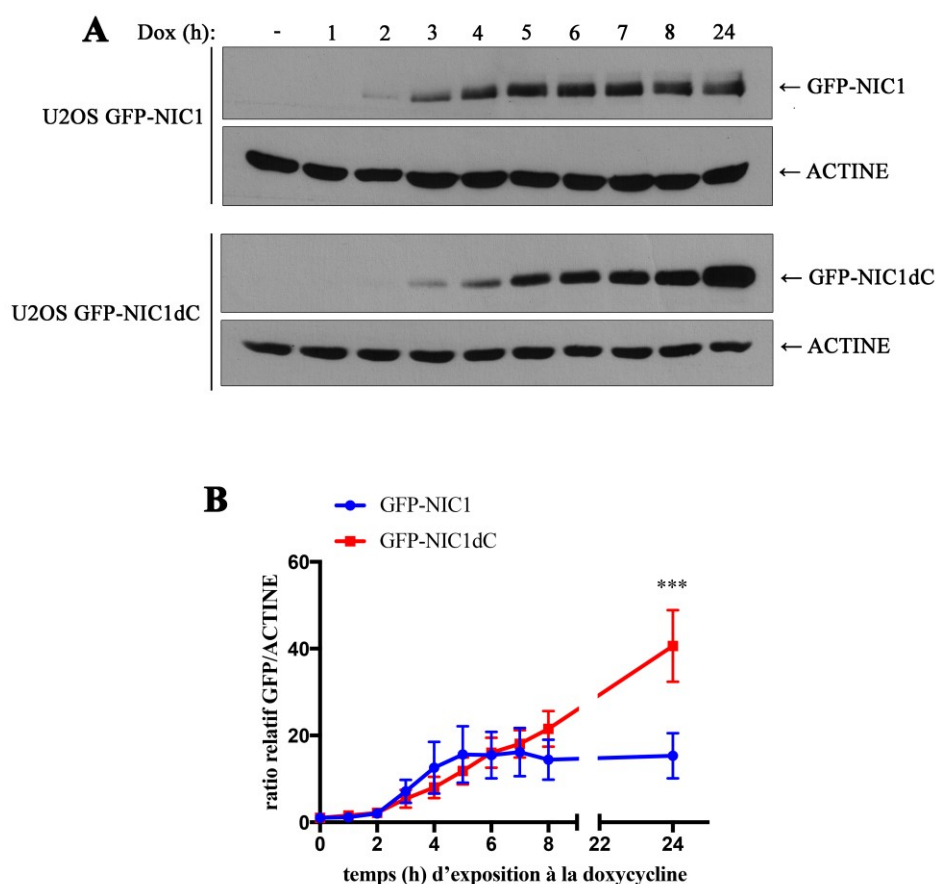


Figure 9 : Cinétique d'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC.

A) Les lignées U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites ou non (-) à la doxycycline (Dox ; 1 μ g/ml) pendant les périodes de temps indiquées. L'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC a été évaluée par immunobuvardage en utilisant l'anticorps anti-GFP. L'expression endogène de l'ACTINE a été évaluée en utilisant un anticorps spécifique. Un immunobuvardage représentatif est présenté en **A** et la représentation graphique de 5 expériences est montrée en **B**. **B)** Le niveau d'expression de GFP est

normalisé par rapport à l'ACTINE et le ratio GFP/ACTINE des cellules non induites a été rapporté à 1. *** $p < 0.001$ comparé à GFP-NIC1 des cellules induites pendant 24h. (n=5)

Pour tenter d'expliquer cette constante augmentation d'expression de GFP-NIC1dC suite à l'exposition à la doxycycline dans les cellules U2OS, nous avons voulu vérifier la stabilité de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC en effectuant une cinétique de temps de traitement au cycloheximide (CHX), un inhibiteur de synthèse protéique. Les cellules U2OS GFP-NIC1 montrent une expression de GFP-NIC1 qui disparaît très rapidement dans le temps en réponse au cycloheximide alors que les cellules U2OS GFP-NIC1dC montrent une expression de GFP-NIC1dC qui diminue légèrement (Figure 10A). En effet, l'expression de GFP-NIC1 diminue dès la première heure de traitement pour atteindre des niveaux presque indétectables après 4h de traitement à la cycloheximide tandis que l'expression de GFP-NIC1dC n'est pas significativement modulée par 8h de traitement au cycloheximide. Ceci se traduit par une différence significative de l'expression de GFP-NIC1 comparée à celle de GFP-NIC1dC dès la première heure de traitement au cycloheximide (Figure 10B). Grâce au graphique, nous pouvons estimer la demi-vie de GFP-NIC1 à environ 1h tandis que celle de GFP-NIC1dC est à plus de 8h (Figure 10B).

Nous avons voulu vérifier la demi-vie de NIC1 endogène dans les cellules MIA PaCa-2. Pour cette expérience, nous n'avons pas utilisé la cycloheximide. Puisque NIC1 est issu du clivage du récepteur NOTCH1, nous avons plutôt traité les cellules au DAPT (inhibiteur du complexe γ -sécrétase) afin de prévenir tout nouveau clivage des récepteurs NOTCH endogènes dont NOTCH1 et nous avons évalué la disparition du NIC1 dans le temps. Nous remarquons que l'expression de NIC1 endogène diminue progressivement au cours du traitement au DAPT (Figure 10C). La diminution de l'expression de NIC1 endogène est significativement différente après 2h de traitement au DAPT par rapport au contrôle (sans traitement) (Figure 10D). La demi-vie de NIC1 dans les cellules MIA PaCa-2 peut être estimée à 2h (Figure 10D).

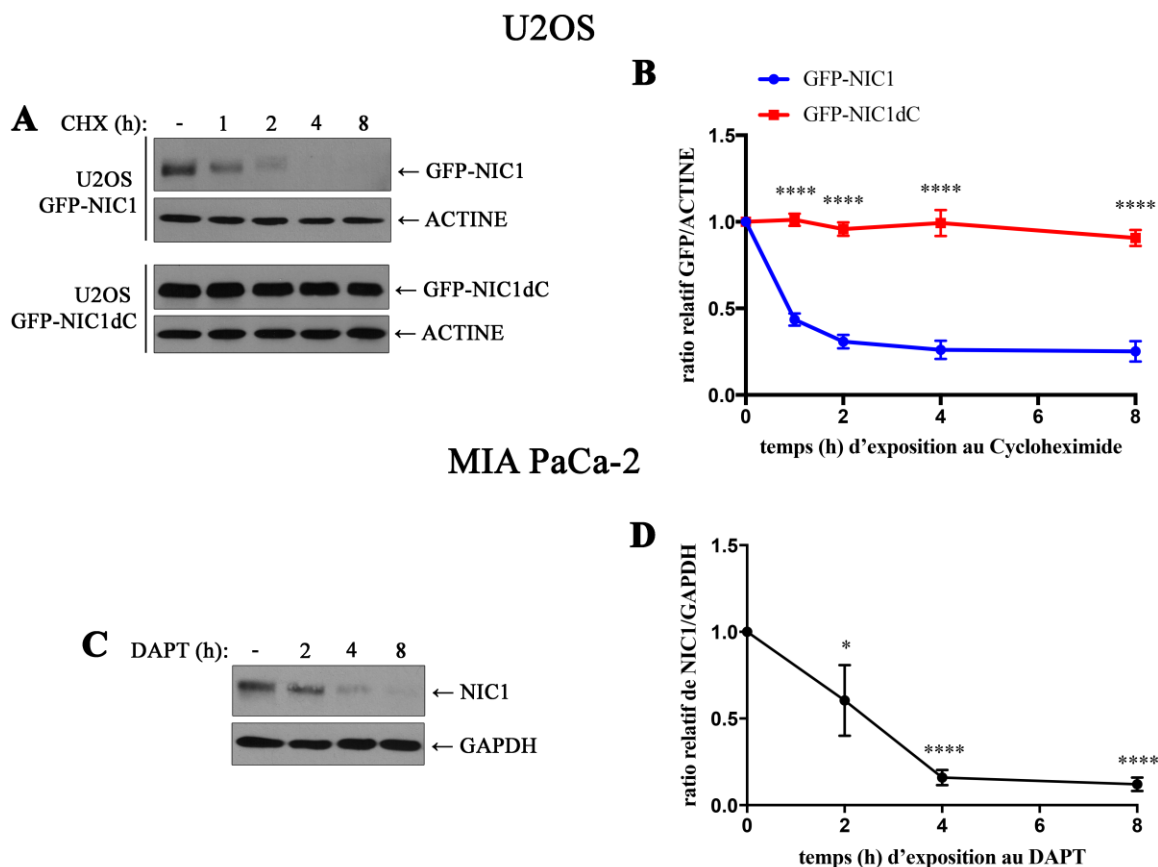


Figure 10 : Stabilité de NIC1.

A) Les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites pendant 24h à la doxycycline (1µg/ml) avant l'ajout ou non (-) du cycloheximide (CHX, 25µg/ml) pendant les périodes de temps indiquées. **B)** Une représentation graphique de 5 expériences (décrites en A) est montrée. Le niveau d'expression de GFP est normalisé par rapport à l'ACTINE et le ratio GFP/ACTINE des cellules non traitées au cycloheximide a été mis à 1. **** p < 0.0001 comparé au GFP-NIC1 au temps correspondant. **C)** Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées ou non (-) avec le DAPT (25µM) pendant les périodes de temps indiquées. **D)** Une représentation graphique de 5 expériences (décrites en C) est montrée. Le niveau d'expression de NIC1 est normalisé par rapport à la GAPDH et le ratio NIC1/GAPDH des cellules non traitées au DAPT a été mis à 1. * p < 0.05, **** p < 0.0001 comparé au contrôle (cellules non traitées). **A, C)** L'expression de MAML1, CSL, NIC1 et ACTINE a été analysée par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques. L'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC a été évaluée avec l'anticorps anti-GFP. (n=5)

Puisque la perte du domaine C-terminal de NIC1 semble jouer un rôle dans la stabilité de NIC1, nous nous sommes ensuite demandé si la stabilité de MAML1 et de CSL était également modulée par la perte de ce domaine de NIC1 puisqu'ils forment un complexe

transcriptionnel ternaire. Nous avons donc réalisé une cinétique de temps au cycloheximide dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC. MAML1 endogène a son expression qui diminue progressivement de 75% seulement dans les cellules U2OS GFP-NIC (Figure 11A). L'expression de MAML1 dans les cellules U2OS GFP-NIC1dC est constante au cours du temps de traitement au cycloheximide. Nous observons une différence significative de l'expression de MAML1 entre les cellules U2OS GFP-NIC1 et U2OS GFP-NIC1dC dès 2h de traitement au cycloheximide (Figure 11B). Nous pouvons estimer la demi-vie de MAML1 à environ 4h dans les cellules U2OS GFP-NIC1. À noter que le cofacteur transcriptionnel de NIC1, CSL, a une expression endogène qui ne varie pas lors de la cinétique au cycloheximide dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC (Figure 11A).

Nous avons également vérifié la stabilité de MAML1 et CSL dans des cellules qui expriment du NIC1 endogène soit les MIA PaCa2. L'expression de CSL ne varie pas suite au traitement au cycloheximide tandis que celle de MAML1 semble commencer à diminuer au bout de 8h de traitement au cycloheximide (Figure 11C).

Ces résultats suggèrent que la perte du domaine C-terminal de NIC1 stabilise à la fois NIC1 et MAML1, mais ne semble pas jouer un rôle sur la stabilité de CSL. Il semble donc que les différentes protéines du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1 soient régulées différemment : NIC1 a une demi-vie estimée à 1h, MAML1 en a une de 4h alors que CSL est stable pendant au moins 8h.

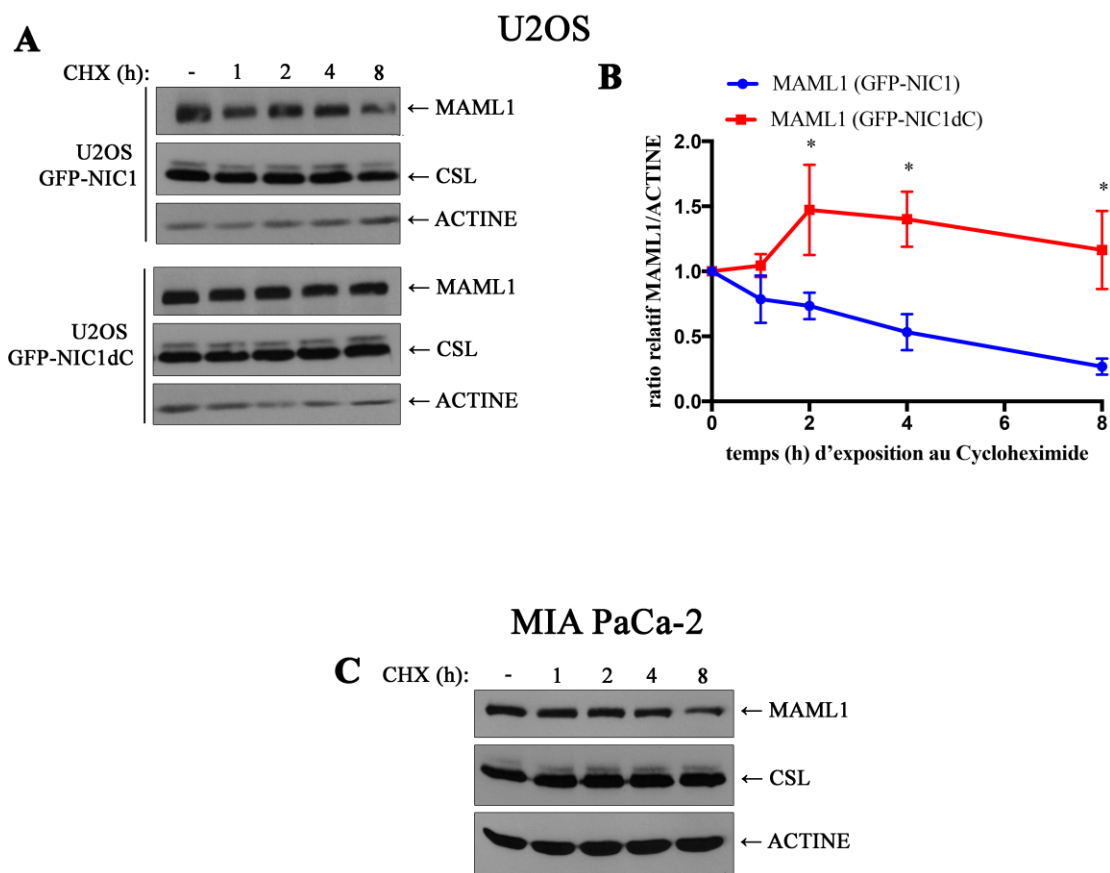


Figure 11 : Stabilité des partenaires de NIC1, CSL et MAML1.

A) Les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites pendant 24h à la doxycycline (1 μ g/ml) avant l'ajout ou non (-) du cycloheximide (CHX, 25 μ g/ml) pendant les périodes de temps indiquées. **B)** Une représentation graphique de 3 expériences (décrites en **A**) est montrée. Le niveau d'expression de MAML1 est normalisé par rapport à l'ACTINE et le ratio MAML1/ACTINE des cellules non traitées au cycloheximide a été mis à 1. * $p < 0.05$ comparé au MAML1 dans les cellules U2OS GFP-NIC1 au temps indiqué. **C)** Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées ou non (-) au cycloheximide (CHX, 25 μ g/ml) pendant les périodes de temps indiquées. **A, C)** L'expression endogène de MAML1, CSL et ACTINE a été analysée par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques. (n=3)

Sachant que le domaine PEST dans la partie C-terminale de NIC1 a été rapporté pour jouer un rôle dans la dégradation protéasomale de NIC1 (Rechsteiner & Rogers, 1996; Oberg *et al.*, 2001; Gupta-Rossi *et al.*, 2001; G. Wu *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2004) et que nos résultats précédents montrent une plus grande stabilité de GFP-NIC1dC comparativement à GFP-NIC1, nous avons voulu évaluer la dégradation protéasomale de

GFP-NIC1dC. Nous avons donc effectué une cinétique au MG132, un inhibiteur de protéasome. Dans les cellules U2OS, nous observons une augmentation d'expression de GFP-NIC1 au cours du temps de traitement au MG132 tandis que l'expression de GFP-NIC1dC n'augmente pas de façon significative (Figures 12A, B et C). Le graphique présenté dans la Figure 12B nous montre une augmentation de l'expression de GFP-NIC1 de presque de 7 fois après 4h de traitement au MG132 par rapport au contrôle (sans traitement) alors que l'expression de GFP-NIC1dC n'augmente pas significativement au même temps de traitement. Nos résultats appuient donc ceux de la littérature qui suggèrent une régulation de NIC1 par le protéasome et le domaine C-terminal de NIC1 est important pour cette régulation.

Nous avons également utilisé un anticorps qui détecte spécifiquement NIC1 afin d'évaluer si l'expression endogène de NIC1 était modulée par l'expression de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC. Il est à noter que l'anticorps anti-NIC1 ne permet pas de reconnaître les protéines GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC probablement dû à un masquage de l'épitope (en N-terminal de NIC1) par le GFP. Le niveau d'expression basal de NIC1 étant faible dans les 3 populations U2OS, nous les avons traités au MG132 pendant différentes périodes de temps. La figure 12C nous permet de constater que le traitement au MG132 mène à une augmentation de NIC1 endogène, mais seulement dans les cellules U2OS GFP-NIC1. Ce résultat suggère que l'expression de GFP-NIC1 permet possiblement de favoriser l'expression de NOTCH1 et/ou le clivage de NOTCH1 pour mener à un certain niveau de NIC1 particulièrement détectable suite à l'inhibition du protéasome.

Nous avons également vérifié la dégradation protéasomale de NIC1 endogène dans les cellules MIA PaCa-2 (Figure 12D). Nous observons une augmentation de l'expression de NIC1 endogène après 2h de traitement au MG132, augmentation d'expression maintenue jusqu'à la fin du traitement.

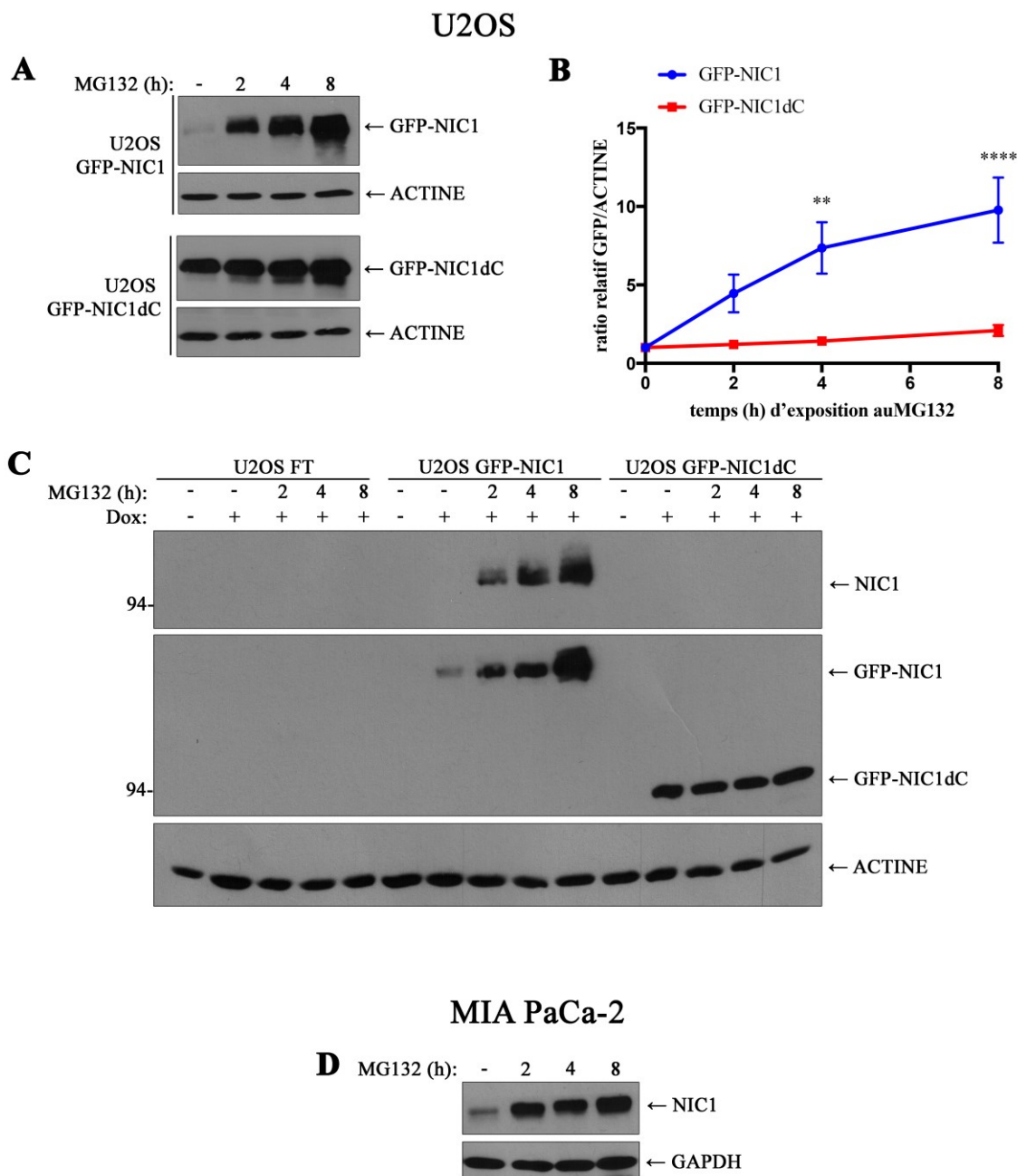


Figure 12 : Dégradation protéasomale de NIC1.

A) Les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites à la doxycycline (1µg/ml) pendant 24h avant d'être traitées ou non (-) au MG132 (10µM) pendant les périodes de temps indiquées. **B)** Une représentation graphique de 4 expériences (décrites en **A)** est montrée. Le niveau d'expression de GFP est normalisé par rapport à l'ACTINE et le ratio GFP/ACTINE des cellules non induites a été mis à 1. ** p < 0.01, **** p < 0.0001 par rapport au GFP-NIC1dC au temps indiqué. **C)** Les lignées U2OS FT, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites (+) ou non (-) à la doxycycline (1µg/ml) pendant 24h avant d'être traitées ou non (-) au MG132 (10µM) pendant les périodes de temps indiquées. **D)** Les

cellules MIA PaCa-2 ont été traitées ou non (-) au MG132 (10 μ M) pendant les périodes de temps indiquées. **A, C, D**) L'expression endogène de MAML1, CSL, NIC1 et ACTINE a été évaluée par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques. L'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC a été évaluée avec l'anticorps anti-GFP. (n=3-4)

Afin de mieux comprendre la régulation du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1, nous avons évalué si l'expression endogène des partenaires d'interaction de NIC1, CSL et MAML1, était influencée par l'inhibition du protéasome. L'expression de CSL ne varie pas en réponse au MG132 ni dans les cellules U2OS GFP-NIC1 ni dans les cellules U2OS GFP-NIC1dC (Figure 13A). De manière intéressante, malgré que nous ayons évalué la demi-vie de MAML1 à environ 4h dans les cellules U2OS GFP-NIC1 (Figure 11B), l'expression de MAML1 n'augmente pas significativement suite au traitement au MG132 dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC suggérant que l'expression de MAML1 n'est pas significativement régulée par le protéasome (Figures 13A et B). De façon similaire, l'expression endogène de CSL et MAML1 n'est pas modulée significativement en réponse au MG132 dans les MIA PaCa-2 (Figure 13C).

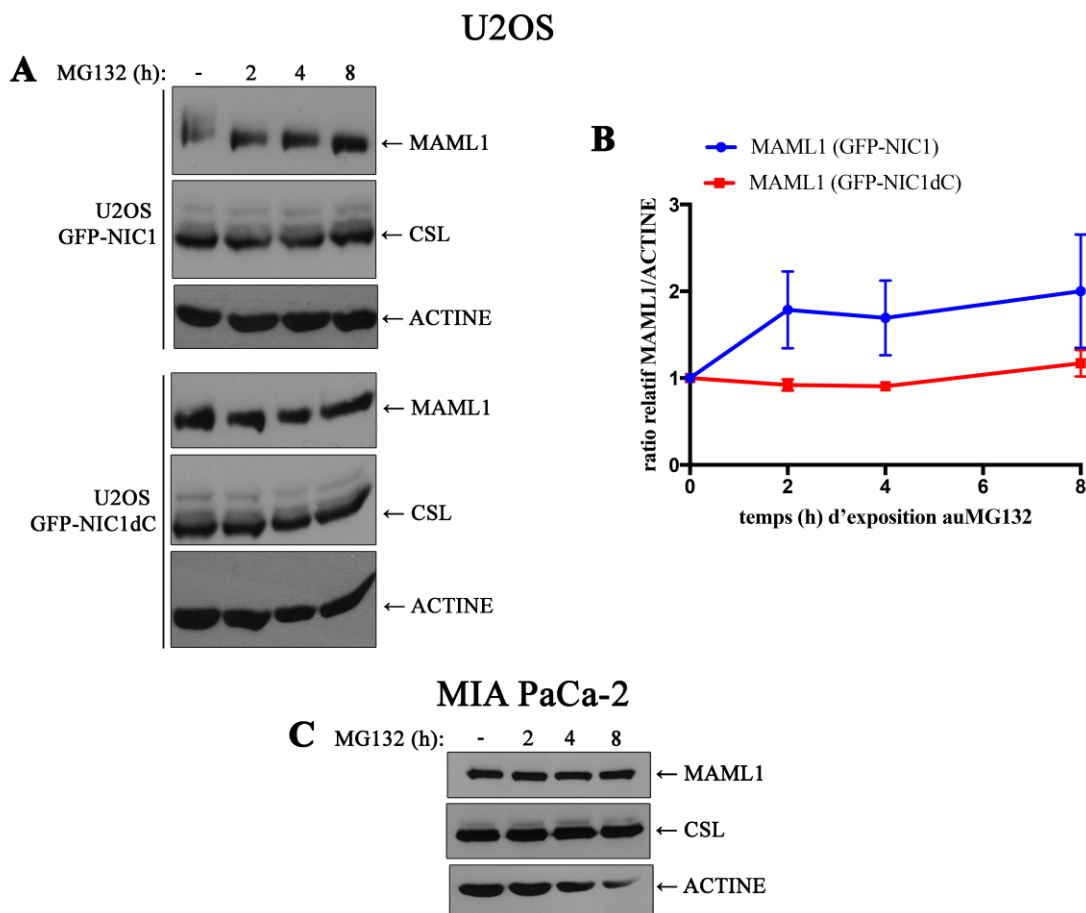


Figure 13 : L'inhibition du protéasome n'altère pas significativement l'expression des partenaires transcriptionnels de NIC1 : CSL et MAML1.

A) Les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites à la doxycycline (1 μ g/ml) pendant 24h avant d'être traitées ou non (-) au MG132 (10 μ M) pendant les périodes de temps indiquées. **B)** Une représentation graphique de 4 expériences (décrites en **A)** est montrée. Le niveau d'expression de GFP est normalisé par rapport à l'ACTINE et le ratio GFP/ACTINE des cellules non traitées au MG132 a été mis à 1. **C)** Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitée ou non (-) au MG132 (10 μ M) pendant les périodes de temps indiquées. **A, C)** L'expression endogène de MAML1, CSL et ACTINE a été évaluée par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques. (n=3-4)

3.1.2. La délétion du domaine C-terminal de NIC1 modifie son pouvoir transcriptionnel

Nos résultats précédents montrent que NIC1 tronqué de son domaine C-terminal est plus fortement exprimé que la forme entière de NIC1 probablement du fait qu'il soit plus stable et qu'il soit peu dégradé par le protéasome. NIC1 étant un facteur transcriptionnel,

nous avons voulu déterminer l'impact de cette délétion en C-terminal de NIC1 sur son potentiel transcriptionnel. Pour ce faire, nous avons réalisé des essais luciférase à l'aide d'un gène-rapporteur spécifique au promoteur d'HES1 (HES1-luciférase) ainsi qu'un gène rapporteur de l'activité transcriptionnelle globale de la voie NOTCH (CSL-luciférase). Dans les cellules U2OS, nous pouvons observer que GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC sont capables de promouvoir l'activité HES1-luciférase de 1.8 et 1.5 fois respectivement (Figure 14A). Nous n'observons pas de différence significative entre la capacité de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC à promouvoir l'activité HES1-luciférase. De manière intéressante, nous observons une différence significative entre GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC dans la promotion de l'activité CSL-luciférase dans les cellules U2OS (Figure 14B). En effet, GFP-NIC1 est capable d'induire d'environ 7 fois l'activité CSL-luciférase tandis que GFP-NIC1dC ne module pas significativement l'activité CSL-luciférase. Ceci résulte en une différence significative sur la capacité de GFP-NIC1 à promouvoir l'activité transcriptionnelle globale de la voie NOTCH comparée à celle de GFP-NIC1dC.

Nous avons également testé l'impact de l'expression de GFP-NIC1 ou de GFP-NIC1dC sur l'activité des gènes rapporteurs HES1-luciférase et CSL-luciférase dans un autre système soit les MIA PaCa-2. La transfection de GFP-NIC1 dans ces cellules montre une promotion significative de l'activité HES1-luciférase d'un peu plus de 3 fois par rapport aux cellules contrôles transfectées avec le vecteur vide pDEST53 (Figure 14C). En ce qui concerne les cellules MIA PaCa-2 transfectées avec GFP-NIC1dC, nous n'observons pas d'augmentation significative de l'activité HES1-luciférase comparée aux cellules contrôles (vecteur vide). Le potentiel de GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC à induire l'activité HES1-luciférase n'est cependant pas significativement différent. Pour ce qui est de l'activité CSL-luciférase, nous observons que GFP-NIC1 est capable d'induire de manière significative la transcription globale de la voie NOTCH puisqu'elle est environ 9 fois plus élevée que dans les cellules contrôles (vecteur vide) (Figure 14D). Suivant l'expression de GFP-NIC1dC, l'activité CSL-luciférase est augmentée significativement d'à peu près 1.5 fois. Le pouvoir de GFP-NIC1 à promouvoir l'activité CSL-luciférase est significativement plus élevé que celui de GFP-NIC1dC. Ces résultats montrent que la perte du domaine C-terminal de NIC1 n'affecte pas significativement sa capacité à induire l'activité transcriptionnelle au promoteur d'HES1, mais celle de promouvoir l'activité

transcriptionnelle globale de la voie NOTCH. Ceci suggère un potentiel transcriptionnel différent entre GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC.

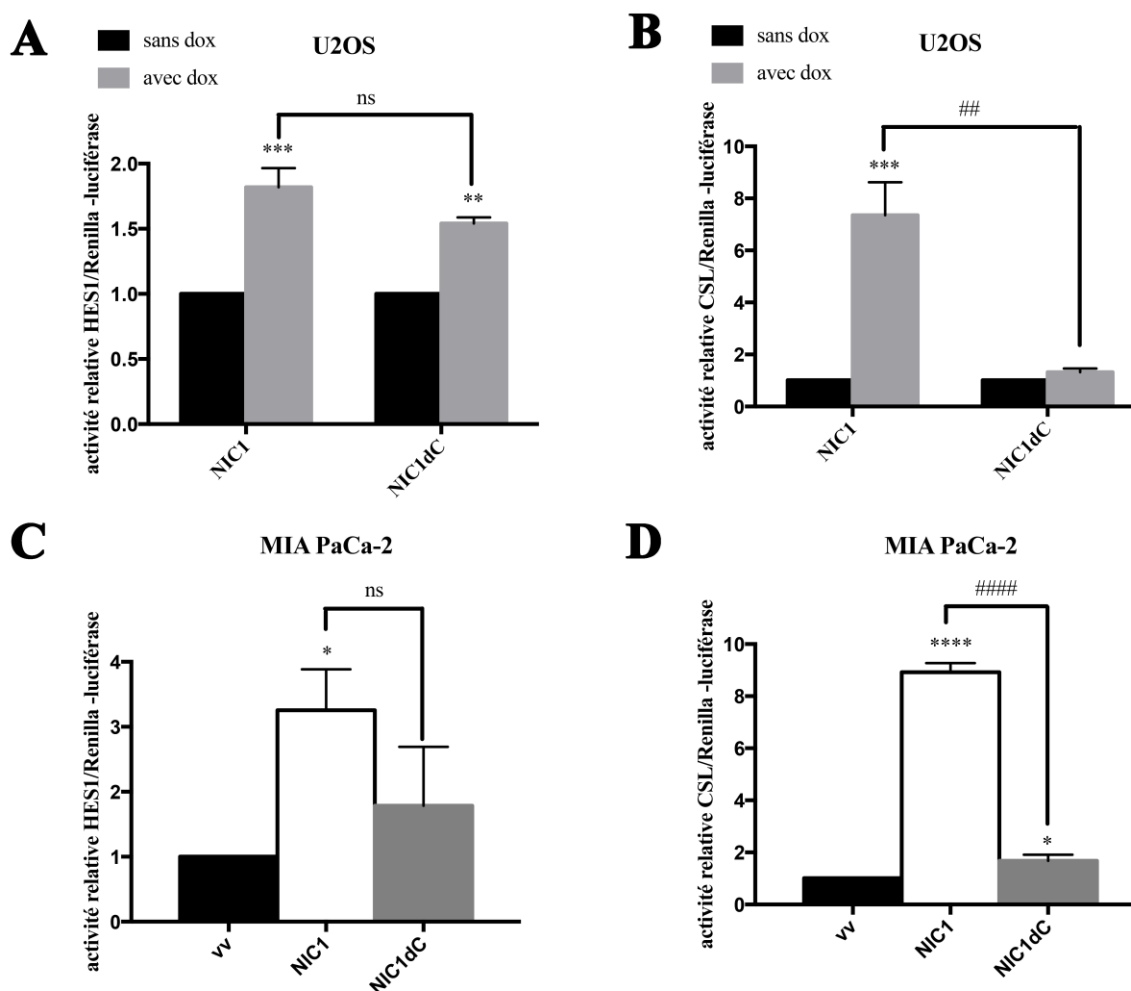


Figure 14 : Mesure de l'activité transcriptionnelle de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC.

A, B Les cellules U2OS GFP-NIC1 (NIC1) et GFP-NIC1dC (NIC1dC) ont été transfectées transitoirement avec 100ng/chacun des gènes rapporteurs Renilla-luciférase et HES1-Luciférase (**A**) ou CSL-luciférase (**B**). Au moment de la transfection, les cellules ont été induites ou non (sans dox) à la doxycycline (avec dox ; 1µg/ml) pendant 24h. **C, D** Les cellules MIA PaCa-2 ont été transfectées transitoirement avec 100ng/chacun des gènes rapporteurs Renilla-luciférase et HES1-luciférase (**C**) ou CSL-luciférase (**D**) en combinaison avec un vecteur vide (vv) pDEST53, GFP-NIC1 (NIC1) ou GFP-NIC1dC (NIC1dC). **A - D** L'activité luciférase a été mesurée 24h après transfection. La représentation graphique de 2 expériences effectuées en triplicata pour l'activité HES1-luciférase (**A**), de 4 expériences faites en triplicata pour l'activité CSL-luciférase (**B**) dans les cellules U2OS, et de 3 expériences effectuées en triplicata pour l'activité HES1-

luciférase (C) et CSL-luciférase (D) dans les cellules MIA PaCa-2 est montrée. L'activité HES1-luciférase ou CSL-luciférase a été normalisée par rapport à l'activité Renilla-luciférase. L'activité relative d'HES1-luciférase ou CSL-luciférase/Renilla-luciférase des cellules non induites (A, B) ou transfectées avec pDEST53 (vv) (C, D) a été rapporté à 1. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ comparé aux cellules U2OS non induites à la doxycycline ou aux cellules MIA PaCa-2 transfectées avec pDEST53 (vv). ## $p < 0.01$ et #### $p < 0.0001$. ns = non significatif.

Nous avons par la suite voulu regarder si la différence dans la capacité transcriptionnelle de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC telle que mesurée par essais luciférase se reflétait au niveau de transcrits de cibles de la voie NOTCH. Nous avons ainsi réalisé des PCR semi-quantitatifs afin de déterminer les niveaux d'expression de l'ARNm de gènes cibles (*HEY2*, *NOTCH4*) de la voie NOTCH dans les cellules U2OS induites 24h à la doxycycline. L'expression d'*HEY2* semble être augmentée suite à l'expression de GFP-NIC1 et non de GFP-NIC1dC (Figures 15A et B). Cependant, cette augmentation d'expression d'*HEY2* induit par GFP-NIC1 n'est pas significative par rapport au contrôle (sans doxycycline), probablement parce que la différence d'induction est trop grande entre les 2 expériences donnant un écart-type trop élevé. De manière intéressante, nous observons que seul GFP-NIC1 est capable d'augmenter significativement l'expression du récepteur *NOTCH4* d'un peu plus de 2 fois (Figures 15A et C). L'induction de l'expression de *NOTCH4* par GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC n'est cependant pas significativement différente.

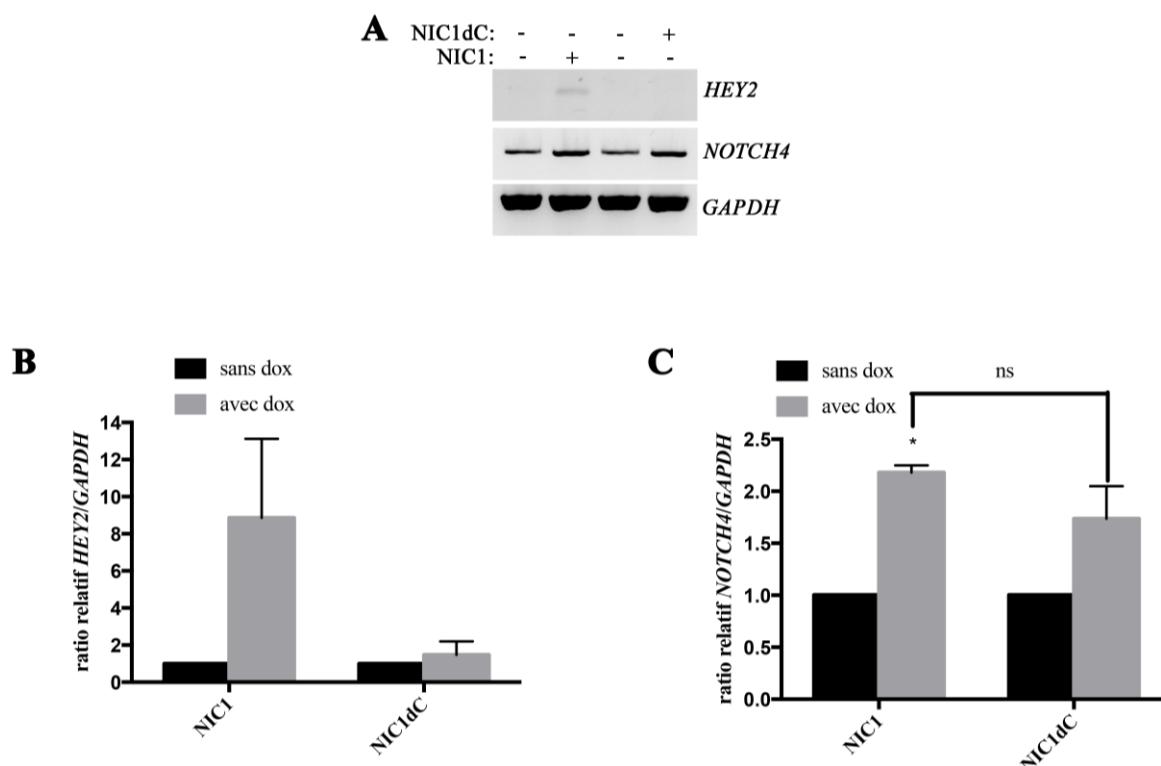


Figure 15 : Expression de transcrits de différents composants de la voie NOTCH en présence de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC.

A) Les cellules U2OS GFP-NIC1 (NIC1) et GFP-NIC1dC (NIC1dC) ont été induites (+) ou non (-) à la doxycycline (1 μ g/ml) pendant 24h. Les cellules ont été lysées, les ARN ont été extraits et dosés. L'expression d'*HEY2* et de *NOTCH4* a été analysée par PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques. Une représentation graphique de 2 expériences d'*HEY2* (**B**) et de *NOTCH4* (**C**) est montrée. Le niveau d'expression des transcrits est normalisé par rapport à la *GAPDH* et le ratio transcrit/*GAPDH* dans les cellules non induites a été rapporté à 1. * $p < 0.05$ comparé aux cellules non induites. ns = non significatif.

Enfin, nous avons vérifié si nos observations précédentes (activité transcriptionnelle et expression des transcrits) se traduisaient au niveau protéique. Pour cela, nous avons effectué dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC, une cinétique à la doxycycline pour mieux détailler le profil d'expression d'HES1 (Figure 16A). Dans les cellules U2OS GFP-NIC1, nous observons une augmentation d'expression d'HES1 qui atteint rapidement un plateau vers 2h d'induction à la doxycycline. Quant aux cellules U2OS GFP-NIC1dC, l'expression d'HES1 augmente également au cours du temps en réponse à la doxycycline mais semble atteindre un plateau vers 4h d'induction à la doxycycline. Bien que l'expression protéique d'HES1 semble se stabiliser plus tardivement dans les cellules

U2OS GFP-NIC1dC comparativement aux cellules U2OS GFP-NIC1, l'expression d'HES1 dans ces deux lignées cellulaires est comparable au bout de 8h d'induction à la doxycycline. De plus, nous n'observons pas de différence significative dans l'expression d'HES1 à aucun moment de la cinétique à la doxycycline entre les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC (Figure 16B).

Dans les cellules MIA PaCa-2, nous avons également observé l'expression d'HES1 après transfection de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC (Figure 16C). GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC sont capables tous les deux d'induire significativement l'expression d'HES1 (Figure 16D). Dans ce modèle cellulaire, nous avons également analysé l'expression d'autres gènes cibles connus de la voie NOTCH tels que C-MYC et CYCLINE D1 (Tremblay *et al.*, 2013), ce que nous avons tenté de faire avec les cellules U2OS mais leur niveau d'expression basal était trop faible pour observer des modulations d'expression. Nous observons que dans les cellules MIA PaCa-2, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ne sont pas capables d'induire significativement l'expression de C-MYC et CYCLINE D1 (Figure 16C).

Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que, dépendamment du contexte cellulaire, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont un pouvoir transcriptionnel distinct ; certains promoteurs pourraient être influencés de façon similaire par GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC (ex. HES1 dans les cellules U2OS) alors que d'autres pourraient être influencés seulement par GFP-NIC1 tel que suggéré par les essais luciférase en utilisant le gène rapporteur CSL-luciférase. Il faut cependant souligner que malgré les niveaux d'expression supérieurs de GFP-NIC1dC par rapport à GFP-NIC1 (Figure 9), cela ne se traduit par une plus grande activité au niveau des promoteurs cibles (Figures 14 et 15).

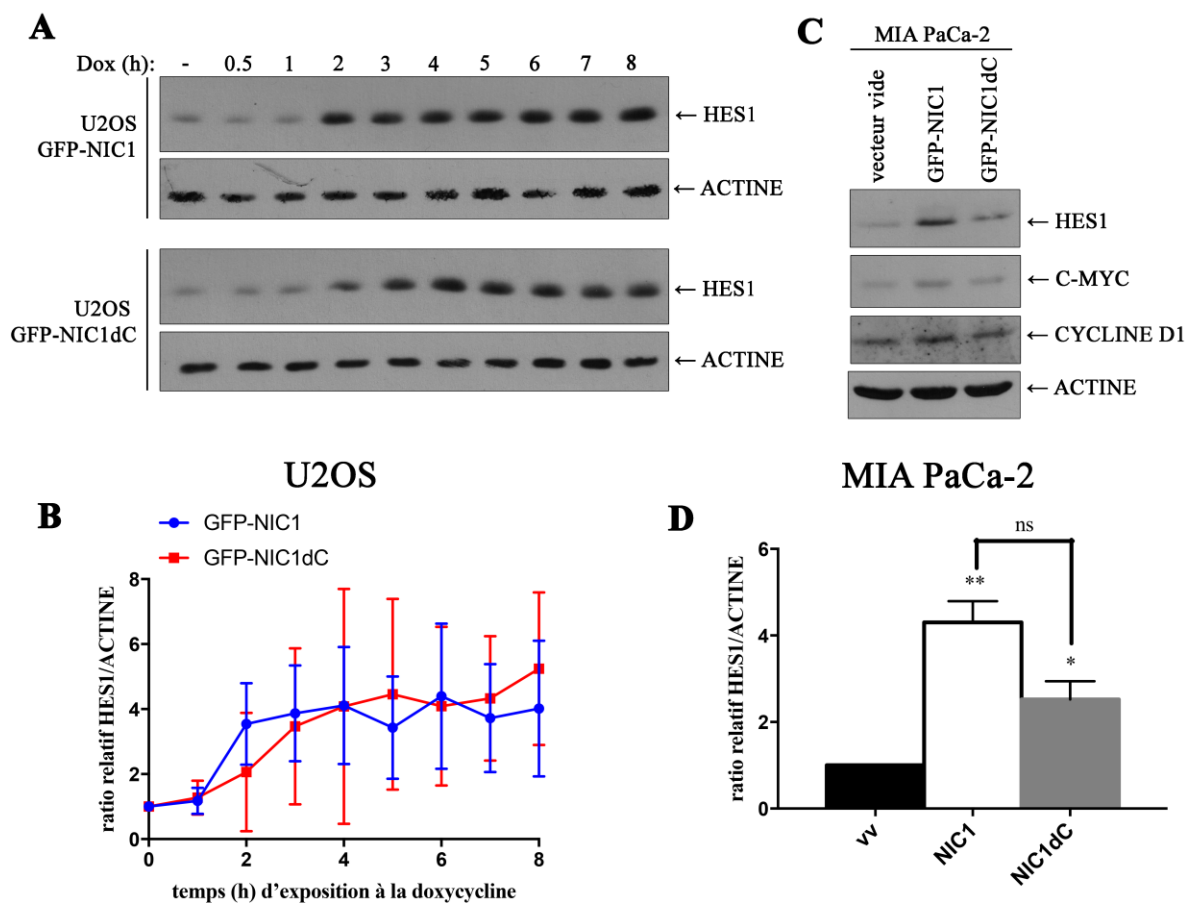


Figure 16 : Expression protéique des cibles de la voie NOTCH suivant l'expression de GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC.

A) Les lignées U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites ou non (-) à la doxycycline (dox ; 1µg/ml) pendant les périodes de temps indiquées. Un immunobuvardage représentatif est présenté en **A** et la représentation graphique de 3 expériences est montrée en **B**. Le niveau d'expression d'HES1 est normalisé par rapport à l'ACTINE et le ratio HES1/ACTINE des cellules non induites a été rapporté à 1. **C)** Les cellules MIA PaCa-2 ont été transfectées avec la même quantité d'ADN (6µg) de vecteur vide (pDEST53) ou d'un vecteur d'expression GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC. Un immunobuvardage représentatif est présenté en **C** et la représentation graphique de 3 expériences est montrée en **D**. Le niveau d'expression d'HES1 est normalisé par rapport à l'ACTINE et le ratio HES1/ACTINE des cellules transfectées avec le vecteur vide (vv) pDEST53 a été rapporté à 1. ** p < 0.01 et * p < 0.05 comparé aux cellules MIA PaCa-2 transfectées avec pDEST53 (vv). ns = non significatif. **A, C)** L'expression endogène d'HES1, C-MYC, CYCLINE D1 et de l'ACTINE a été analysée par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques. (n=3)

3.1.3. La perte du domaine C-terminal de NIC1 n'influence pas l'interaction de NIC1 avec ses partenaires CSL et MAML1

Afin d'influencer l'expression génique, NIC1 doit transloquer au noyau et interagir avec ses partenaires CSL et MAML1 pour former un complexe transcriptionnel. Suite à nos résultats précédents montrant que le domaine C-terminal de NIC1 joue un rôle dans son pouvoir transcriptionnel, nous nous sommes interrogés si une diminution de la localisation nucléaire de GFP-NIC1dC pouvait expliquer cet effet. Pour y répondre, nous avons réalisé un fractionnement subcellulaire dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC induites 24h ou non à la doxycycline. Nous avons observé l'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC dans la fraction nucléaire (Figure 17A). Une faible proportion de GFP-NIC1 se retrouve au cytoplasme alors qu'une plus grande proportion de GFP-NIC1dC est retrouvée au cytoplasme. En effet, 70% de GFP-NIC1 se localise dans le noyau et seulement 30% dans le cytoplasme tandis que 40% de GFP-NIC1dC est retrouvé dans le noyau contre 60% dans le cytoplasme (Figure 17B). Cette différence de distribution de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC est significative. Cependant, malgré une distribution subcellulaire différente de GFP-NIC1dC comparativement à GFP-NIC1, un niveau d'expression de GFP-NIC1dC comparable à GFP-NIC1 se retrouve dans la fraction nucléaire (résultats non montrés) suggérant qu'une diminution de la quantité de GFP-NIC1dC au noyau ne peut expliquer les impacts sur l'activité transcriptionnelle. À noter que la distribution de CSL et MAML1 n'est pas modifiée dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC (Figures 17A et C). CSL et MAML1 sont majoritairement localisés dans le noyau.

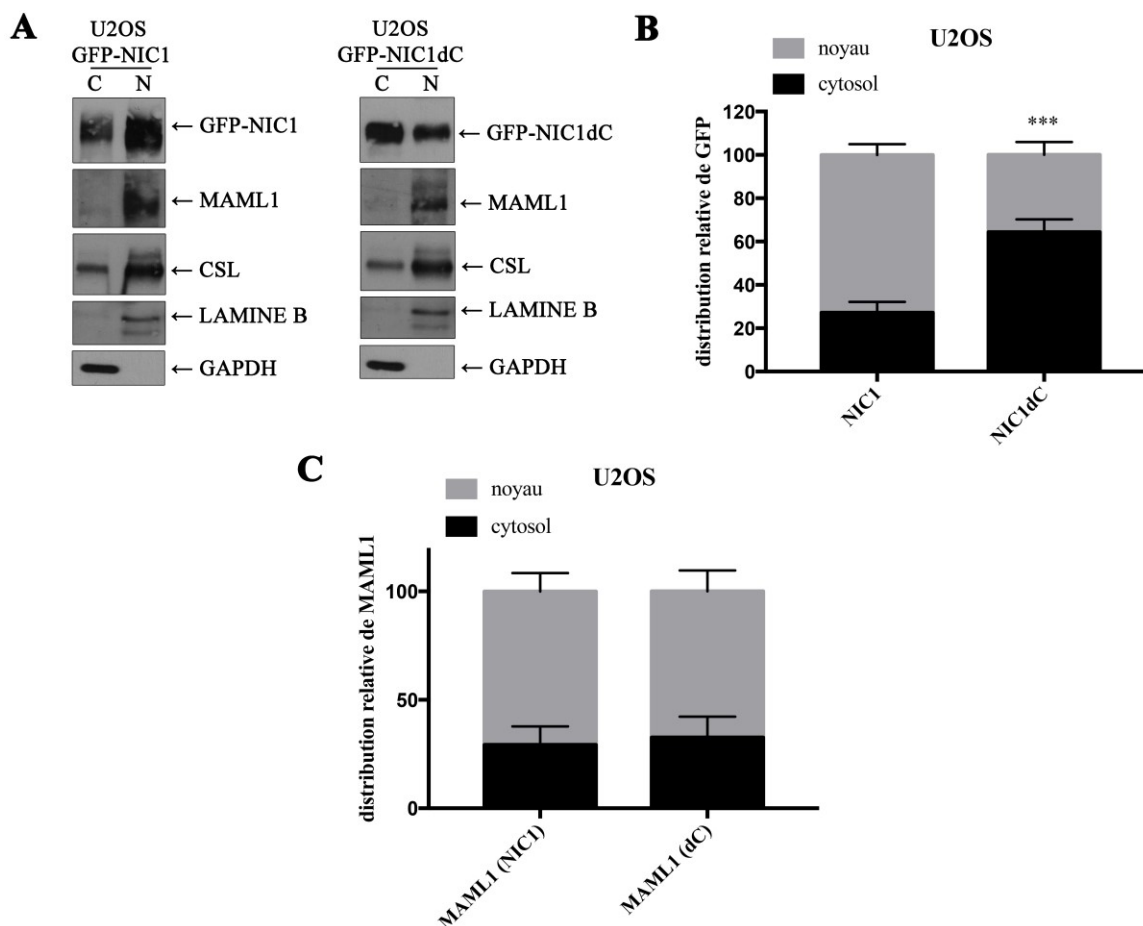


Figure 17 : Distribution subcellulaire des membres du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 dans les cellules U2OS.

A) Les lignées U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites à la doxycycline (1µg/ml) pendant 24h. Les cellules ont été lysées pour obtenir des extraits protéiques cytosoliques (C) ou nucléaires (N). L'expression protéique a été analysée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. L'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC a été évaluée avec l'anticorps anti-GFP. **B)** La représentation graphique de la distribution subcellulaire de GFP (NIC1 et NIC1dC) de 5 expériences est montrée. La distribution moyenne de GFP entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire est présentée en %. *** $p < 0.001$ comparativement à la distribution de GFP correspondante dans les cellules U2OS GFP-NIC1. **C)** Une représentation graphique de la distribution subcellulaire de MAML1 des 2 populations U2OS GFP-NIC1 (NIC1) et GFP-NIC1dC (dC) de 5 expériences est montrée. La distribution moyenne de MAML1 entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire est présentée en %. (n=5)

Nous avons également évalué la distribution subcellulaire de NIC1, CSL et MAML1 dans les cellules MIA PaCa-2 où la signalisation NOTCH a été activée par l'EGTA. En effet, le traitement à l'EGTA permet d'engendrer le clivage des récepteurs NOTCH endogènes et assure une libération massive et synchronisée de NIC1 qui corrèle avec une activation de la voie NOTCH (Tremblay *et al.*, 2013). Suite à l'ajout d'EGTA pendant 15min, le milieu de culture des cellules a été remplacé par du milieu frais et les cellules ont été lysées après 30min de recouvrement pour analyser des extraits protéiques par immunobuvardage (Figure 18A) afin d'avoir une expression protéique de NIC1 plus importante qu'en condition contrôle (sans EGTA) (Tremblay *et al.*, 2013). Ce temps de recouvrement de 30min a été choisi puisqu'il corrèle avec une augmentation de l'ARNm d'*HES1* (résultat non montré). Ainsi, il est attendu que ce temps de recouvrement corrèle avec une activité du complexe NIC/CSL/MAML1 au niveau de ses promoteurs cibles. En accord avec les résultats observés dans les cellules U2OS GFP-NIC1, le NIC1 endogène dans les cellules MIA PaCa-2 est majoritairement (à 80%) localisé dans la fraction nucléaire (Figure 18B). Quarante pourcent des protéines MAML1 sont également observées dans la fraction nucléaire (Figure 18C). À noter que CSL est également majoritairement dans le noyau (Figure 18A).

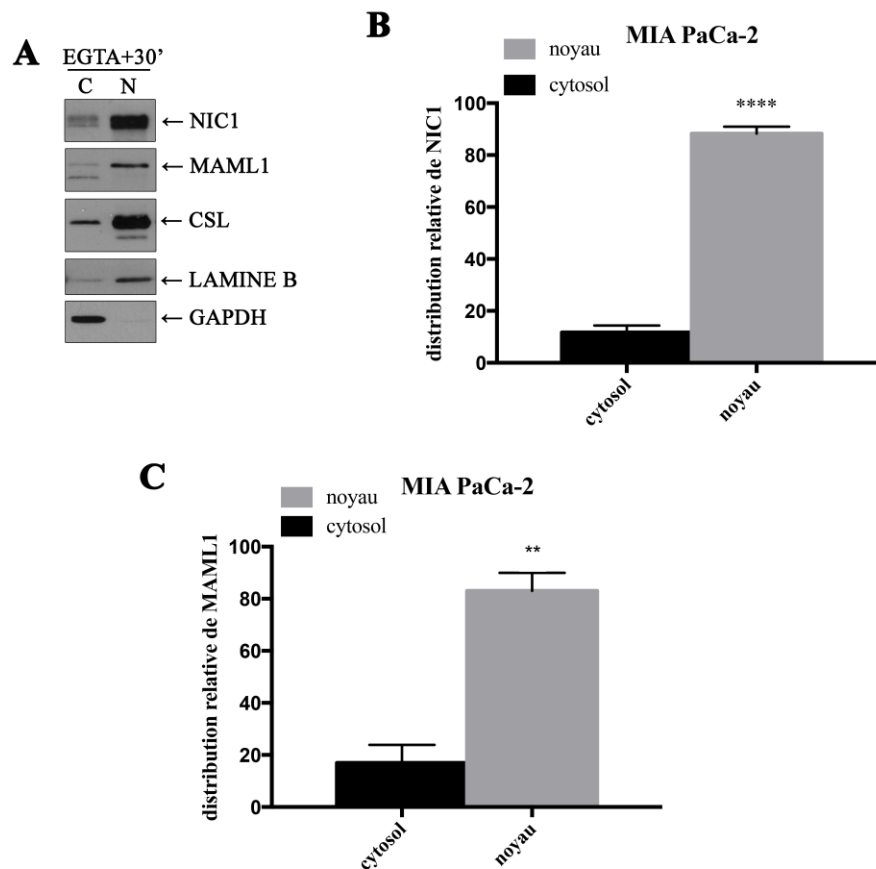


Figure 18 : Distribution subcellulaire du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 dans les cellules MiaPaCa-2.

A) Les cellules ont été traitées à l'EGTA (4mM) pendant 15min et elles ont été lysées après 30min de recouvrement pour obtenir des extraits protéiques cytosoliques (C) ou nucléaires (N). L'expression protéique a été analysée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. La représentation graphique de 3 expériences est montrée pour démontrer la distribution subcellulaire de NIC1 (**B**) et MAML1 (**C**). La distribution moyenne de NIC1 (**B**) ou MAML1 (**C**) entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire est présentée en %. ** $p < 0.01$. **** $p < 0.0001$ comparativement à son niveau d'expression protéique dans la fraction cytoplasmique. (n=3)

Puisque des quantités nucléaires différentielles de GFP-NIC1, GFP-NIC1dC, CSL ou MAML1 ne semblaient pas expliquer le plus faible pouvoir transcriptionnel de GFP-NIC1dC, nous avons testé la capacité de GFP-NIC1dC à interagir avec ses partenaires transcriptionnels connus, MAML1 et CSL. Pour ce faire, nous avons effectué des immunoprécipitations dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC induites ou non à

la doxycycline. Dans un premier temps, nous avons immunoprécipité GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC dans les cellules U2OS induites grâce aux billes GFP-Trap. Nous observons que MAML1 et CSL sont détectés dans les immunoprécipitats de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC (Figure 19A). Nous avons également immunoprécipité MAML1 à l'aide de billes de protéine G-sépharose dans les cellules U2OS induites ou non à la doxycycline. Les analyses en immunobuvardage dans les lysats totaux ont d'abord permis de confirmer l'augmentation d'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC en réponse à la doxycycline (Figure 19B). Comme présenté à la figure 8A, le traitement à la doxycycline n'influence pas l'expression de CSL dans aucune des populations stables U2OS. Quant à MAML1, son expression semble légèrement augmentée en réponse à la doxycycline mais seule la population U2OS GFP-NIC1 traitée à la doxycycline montre un retard de migration de MAML1. Dans la population U2OS FT, on remarque des niveaux comparables de CSL associés à MAML1 dans les cellules traitées ou non à la doxycycline (Figure 19B). Aucun marquage GFP n'est détecté dans les cellules U2OS FT, que ce soit dans les lysats totaux ou suivant l'immunoprécipitation de MAML1, confirmant l'absence de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC. Suivant l'immunoprécipitation de MAML1 à partir d'extraits d'U2OS GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC, nous détectons CSL, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC particulièrement dans les cellules traitées à la doxycycline (Figure 19B). Ces résultats suggèrent que NIC1dC est toujours apte à s'associer à ses partenaires connus MAML1 et CSL et que le complexe transcriptionnel ternaire NIC1dC/CSL/MAML1 se forme malgré la délétion du domaine C-terminal de NIC1.

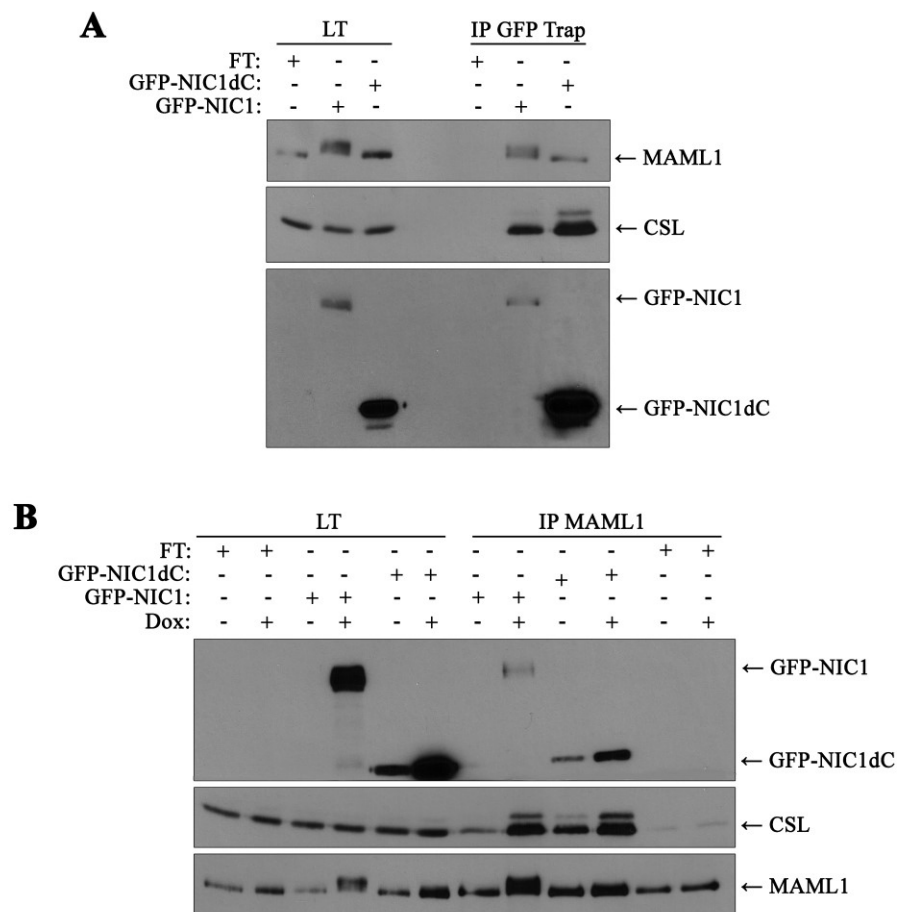


Figure 19 : Interaction de NIC1 et NIC1dC avec ses partenaires connus CSL et MAML1.

A) Les cellules U2OS FT, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites pendant 24h à la doxycycline (1 μ g/ml). La protéine fusionnée à GFP a été immunoprécipitée à l'aide de billes GFP-Trap (IP GFP Trap). **B)** Les cellules U2OS FT, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites (+) ou non (-) à la doxycycline (Dox ; 1 μ g/ml) pendant 24h. MAML1 a été immunoprécipité grâce à l'anticorps anti-MAML1 (IP MAML1). **A, B)** L'expression protéique a été analysée dans les lysats totaux (LT) et dans les immunoprécipitats par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. L'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC a été évaluée à l'aide de l'anticorps anti-GFP. (n=3)

Nous avons poursuivi l'étude en testant si la perte du domaine C-terminal de NIC1 influençait son interaction avec des partenaires autres que CSL et MAML1. Puisque peu d'information est disponible quant à l'ensemble des protéines associées au complexe NIC1/CSL/MAML1 requis pour supporter son activité transcriptionnelle, nous avons comparé les partenaires d'interaction de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC à l'aide d'une

approche protéomique quantitative (SILAC). Les extraits protéiques ont été préparés à partir des cellules U2OS cultivées dans 3 milieux de culture contenant des arginines et lysines différentiellement marquées (SILAC). Les cellules U2OS GFP-NIC1 non induites à la doxycycline ont été cultivées dans du milieu SILAC léger (L) et correspondent à notre condition contrôle i.e. sans expression de la GFP. Les cellules U2OS GFP-NIC1 induites 4h à la doxycycline ont été cultivées dans du milieu SILAC moyen (M). Le milieu lourd (H) correspond aux cellules U2OS GFP-NIC1dC induites 4h à la doxycycline. À partir de ces échantillons, la protéine fusionnée avec GFP a été immunoprécipitée du lysat total à l'aide des billes GFP-Trap (Figure 20A, tableaux 10, 11, 12 et 14). Puisque la fonction transcriptionnelle de NIC1 doit être principalement assumée par le NIC1 nucléaire, nous avons également réalisé un fractionnement subcellulaire et procédé à l'immunoprécipitation de la protéine fusionnée avec GFP à partir de la fraction nucléaire (Figure 20B, tableaux 10, 11, 13 et 14). Les partenaires d'interaction de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été analysés par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Les peptides avec un ratio supérieur ou égal à 2 ont été conservés.

La figure 20 présente en diagramme de Venn le nombre de partenaires de GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC dans le lysat total (Figure 20A) et dans la fraction nucléaire (Figure 20B). De manière générale, nous observons que le nombre de partenaires est plus élevé pour GFP-NIC1dC que pour GFP-NIC1. Cette augmentation de partenaires de GFP-NIC1dC pourrait s'expliquer par la plus forte expression de GFP-NIC1dC (ratio H/L (NIC1dC) plus grand que M/L (NIC1), tableau 10) permettant de révéler plus de partenaires ou des partenaires non spécifiques. Il se pourrait également que les partenaires de GFP-NIC1dC plus nombreux que ceux de GFP-NIC1 soient dus à un changement dans les interactions protéiques causé par la délétion du domaine C-terminal.

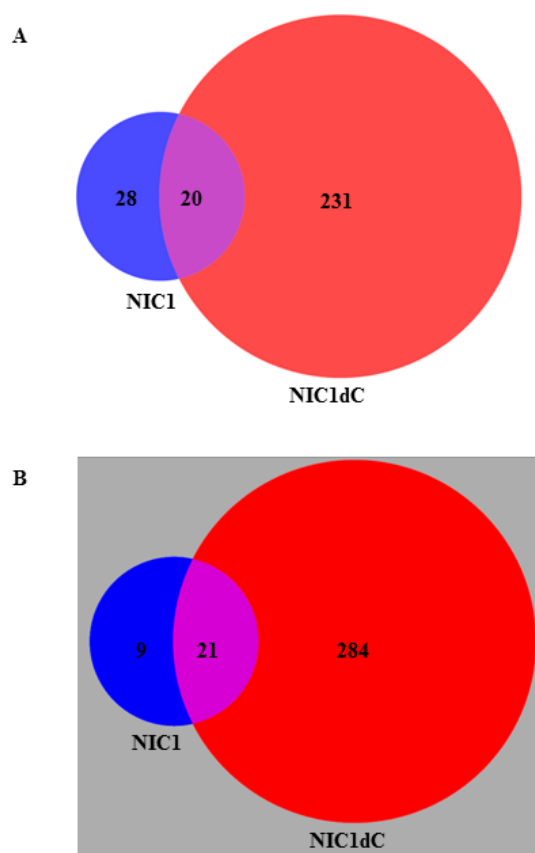


Figure 20 : Diagramme de Venn des partenaires de GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC identifiés par spectrométrie de masse.

A, B) Les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites à la doxycycline pendant 4h. Les protéines GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été immunoprécipitées à l'aide des billes GFP-Trap à partir de lysat total (A) ou à partir d'extrait nucléaire (B). Les partenaires d'interaction de GFP-NIC1 (NIC1) et GFP-NIC1dC (NIC1dC) ont été identifiés à l'aide d'une expérience d'analyse en spectrométrie de masse à l'aide d'immunoprécipitats provenant de lysat total (A) et une provenant de la fraction nucléaire (B). Les peptides identifiés avec un ratio supérieur ou égal à 2 sont répertoriés dans le diagramme.

Bien que le nombre de partenaires diffèrent entre GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC, nous avons observé et répertorié les protéines qui interagissent à la fois avec GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC dans les lysats totaux et dans la fraction nucléaire (Tableau 10). Nous observons que les partenaires de NIC1 du complexe transcriptionnel ternaire CSL et MAML1 sont retrouvés dans les immunoprécipitats GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC à la fois dans les lysats totaux et dans la fraction nucléaire (Tableau 10). De manière intéressante, nous détectons les 2 autres isoformes de MAML1, MAML2 et MAML3 suite à l'immunoprécipitation de

GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC dans les lysats totaux suggérant qu'ils peuvent aussi interagir avec GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC (Tableau 10). À noter que nous n'observons pas MAML3 dans les immunoprécipitats GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC parmi les protéines communes dans la fraction nucléaire (Tableau 10) ni dans les partenaires exclusifs de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC de la fraction nucléaire (résultat non montré). Ce résultat suggère une possible interaction de MAML3 avec GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC dans le cytoplasme ou que MAML3 n'est pas détectable dans la fraction nucléaire, malgré l'enrichissement nucléaire, au moment de l'expérience. Parmi les autres partenaires communs de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC identifiés, autres que les membres de la voie NOTCH, ceux-ci sont différents dépendamment si l'immunoprécipitation GFP a été faite à partir d'un lysat total ou d'extrait nucléaire.

Tableau 10 : Partenaires communs de GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC.

Protéines identifiées dans l'immunoprécipitation (IP) à partir de lysat total ou d'extrait nucléaire de cellules U2OS GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC et qui sont communes à GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC, comme observé dans les diagrammes de Venn de la figure 20. Le ratio M/L représente l'enrichissement de la protéine identifiée dans l'immunoprécipitat GFP des cellules GFP-NIC1 induites (M) vs. des cellules GFP-NIC1 non induites (L). Le ratio H/L représente l'enrichissement de la protéine identifiée dans l'immunoprécipitat GFP des cellules GFP-NIC1dC induites (H) vs. des cellules GFP-NIC1 non induites (L). Les membres de la voie NOTCH sont en **gras**.

	Protéines	Ratio M/L	Ratio H/L
Protéines identifiées dans l'IP à partir de lysat total	NOTCH1	8.0573	27.602
	MAML1	5.455	16.711
	MAML2	9.3982	10.912
	MAML3	8.4218	11.166
	CSL	3.6385	8.1553
	LUZP1	58.034	5.7147
	MACF1	50.376	33.296
	SLK	43.398	2.2648
	MDGA2	40.488	3.4403
	COL6A3	18.707	4.4104
	TMC5	5.6746	2.8517
	CYFIP2	5.3948	2.593
	ABCA2	4.3967	10.005

VPS13A	4.0047	11.127
UBC	3.8676	11.032
MXRA5	3.3526	6.5674
HSPA8	2.5152	2.0509
ABR	2.4022	10.572
DPY19L1	2.285	8.6838
HSPA1A	2.1593	3.1564
NOTCH1	16.355	6.6296
MAML1	3.2997	4.9073
MAML2	3.769	3.6353
CSL	7.8047	6.6353
ST8SIA6	21.013	30.183
ERLIN2	4.072	2.0878
IFNA1	3.8316	19.019
PRPSAP2	3.6305	3.72
CENPN	2.386	4.1524
SDC4	2.3009	2.5777
LACTB	2.2866	2.462
CD86	2.2335	41.354
MSLN	2.2059	2.9149
EXOG	2.1796	2.6059
PACSIN3	2.1794	2.3934
CCT5	2.1556	2.8158
MRPL50	2.13	2.6733
GIGYF2	2.0327	2.8777
SDC2	2.0273	2.0824
RRBP1	2.0178	2.8538
GPC1	2.0148	2.3311

Protéines identifiées dans l'IP à partir d'extrait nucléaire

Lorsque les immunoprécipitations ont été faites à partir de lysat total, 48 protéines interagissent fortement avec GFP-NIC1 (Figure 20A). Parmi ces 48 protéines, 20 sont aussi capables d'interagir avec GFP-NIC1dC dont 5 membres de la voie NOTCH (Figure 20A, tableau 10), donnant 28 protéines capables d'interagir seulement avec GFP-NIC1 (Figure 20A, tableau 11). GFP-NIC1 interagit très fortement avec NOTCH2 contrairement à GFP-NIC1dC (Tableau 11, ratios non montrés). De plus, 2 protéines (UTP3/SAS10 et CNOT1) ont un fort ratio M/L et n'ont pas de ratio H/L, ce qui suggère qu'elles se lient avec GFP-NIC1 mais pas avec GFP-NIC1dC (Tableau 11, ratios non montrés). Quant aux

immunoprécipitats préparés à partir de la fraction nucléaire, 30 protéines interagissent fortement avec GFP-NIC1 (Figure 20B). Parmi celles-ci, 21 protéines sont communes avec GFP-NIC1dC dont 4 membres de la voie NOTCH (Figure 20B, tableau 10), donnant 9 protéines qui interagissent seulement avec GFP-NIC1 (en **gras** dans le tableau 11). À noter qu'il y a seulement 5 partenaires communs de NIC1 entre le lysat total et la fraction nucléaire (NOTCH1, MAML1, MAML2, CSL et DNAH12).

Tableau 11 : Protéines associées exclusivement à GFP-NIC1 et identifiées par spectrométrie de masse.

Protéines identifiées dans l'immunoprécipitation GFP à partir d'un lysat total ou d'extrait nucléaire de cellules U2OS GFP-NIC1 non-induites (L) et U2OS GFP-NIC1 induites (M). Les peptides avec un ratio M/L supérieur ou égal à 2 à partir de lysat total ou d'extrait nucléaire (en **gras** dans le tableau) ont été listés. * protéine commune dans le lysat total et dans l'extrait nucléaire.

Catégories fonctionnelles	Gènes	Protéines
Protéasome	PSMC4	26S protease regulatory subunit 6B
	PSMD6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6
	PSMD14	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14
	PSMD1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1
	PSMC1	26S protease regulatory subunit 4
	PSMD7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7
Cytosquelette	NAV1	Neuron navigator 1
	MYH1	Myosin-1
	DNAH12*	Dynein heavy chain 12, axonemal
	DNAH8	Dynein heavy chain 8, axonemal
	KIF6	Kinesin-like protein KIF6
	SEPT10	Septin-10
	SEPT8	Septin-8
SEPT2	Septin-2	
Régulation transcriptionnelle	NAV2	Neuron navigator 2
	ERCC2	TFIIH basal transcription factor complex helicase XPD subunit
	NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2
	UTP3	Something about silencing protein 10
	CNOT1	CCR4-NOT transcription complex subunit 1
Activité liée au RCPG	RGS20	Regulator of G-protein signaling 20
	TAS1R1	Taste receptor type 1 member 1
Régulation cycle cellulaire	ATM	Serine-protein kinase ATM
	MAGED1	Melanoma-associated antigen D1

	GPC6	Glypican-6
	ZCCHC11	Terminal uridylyltransferase 4
	MROH7	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 7
	NF1	Neurofibromin
	KIAA1324	UPF0577 protein KIAA1324
	SOAT1	Sterol O-acyltransferase 1
Divers	NLRC3	Protein NLRC3
	AKAP14	A-kinase anchor protein 14
	PTPRC	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C
	IL1R1	Interleukin-1 receptor type 1
	TRIM46	Tripartite motif-containing protein 46
	CD109	CD109 antigen
	ATP5A1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial

Quant à GFP-NIC1dC, un plus grand nombre de protéines sont capables d'interagir avec GFP-NIC1dC. Parmi les 251 partenaires identifiés suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1dC dans le lysat total, 231 protéines interagissent uniquement avec notre mutant de délétion (Figure 20A, Tableau 12 + annexe 1) et 20 protéines sont capables d'interagir avec GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC dont les 5 membres de la voie NOTCH (Figure 20A, tableau 10).

Tableau 12 : Protéines associées exclusivement à GFP-NIC1dC et identifiées par spectrométrie de masse suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1dC à partir d'un lysat total de cellules U2OS GFP-NIC1dC.

Protéines identifiées dans l'immunoprécipitation GFP à partir d'un lysat total de cellules U2OS GFP-NIC1 non-induites (L) et U2OS GFP-NIC1dC induites (H).

Les peptides avec le ratio H/L supérieur ou égal à 2 à partir de lysat total ont été listés. Certaines catégories ont été présentées dans le tableau 12, les autres ont été mis en annexe 1.

Catégories fonctionnelles	Gènes	Protéines
	ATAD2	ATPase family AAA domain-containing protein 2
	BAZ1B	Tyrosine-protein kinase
Régulation transcriptionnelle	SNW1	SNW domain-containing protein 1 (SKIP)
	RELA	Transcription factor p65
	POLR1B	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2
	POLR2A	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1

PTRF	Polymerase I and transcript release factor
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
DDX18	ATP-dependent RNA helicase DDX18
DDX21	Nucleolar RNA helicase 2
DDX27	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27
DDX52	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52
DHX9	ATP-dependent RNA helicase A
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7
RBBP4	Histone-binding protein RBBP4
H1F0	Histone H1.0
HIST1H1E	Histone H1.4
H1FX	Histone H1x
HIST2H2AC	Histone H2A type 2-C
HIST1H2BC	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I
HIST2H2BE	Histone H2B type 2-E
HIST1H4A	Histone H4
HIST2H3A	Histone H3.2
HIST2H2AB	Histone H2A type 2-B
HIST1H1A	Histone H1.1
H2AFY2	Core histone macro-H2A.2
H2AFY	Core histone macro-H2A.1
HNRNPDL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
RUVBL1	RuvB-like 1
RUVBL2	RuvB-like 2
CBX1	Chromobox protein homolog 1
CBX3	Chromobox protein homolog 3
CBX5	Chromobox protein homolog 5
ZNF326	DBIRD complex subunit
MOSPD1	Motile sperm domain-containing protein 1
RALY	RNA-binding protein Raly
CCDC86	Coiled-coil domain-containing protein 86
RBMX	RNA-binding motif protein, X chromosome
MATR3	Matrin-3
CEBPZ	CCAAT/enhancer-binding protein zeta
RBM14	RNA-binding protein 14
SMARCA5	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5
PNN	Pinin
BANF1	Barrier-to-autointegration factor
NOC2L	Nucleolar complex protein 2 homolog
PPHLN1	Periphilin-1

	EIF4A3	Eukaryotic initiation factor 4A-III
	MYBBP1A	Myb-binding protein 1A
	TARDBP	TAR DNA-binding protein 43
	MYBBP1A	Myb-binding protein 1A
	TARDBP	TAR DNA-binding protein 43
	AKNA	AT-hook-containing transcription factor
	ABCC9	ATP-binding cassette sub-family C member 9
	GGA2	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA2
	CTAGE5	cTAGE family member 5
	RAB6B	Ras-related protein Rab-6B
Régulation trafic cellulaire	SLC44A5	Choline transporter-like protein 5
	CAV1	Caveolin-1
	COX4I1	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial
	LYST	Lysosomal-trafficking regulator
	SEC13	Protein SEC13 homolog
	SNX6	Sorting nexin-6
	ORC3	Origin recognition complex subunit 3
	INCENP	Inner centromere protein
	NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1
	NIFK	MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein
	SERTAD4	SERTA domain-containing protein 4
	AURKB	Aurora kinase B
	MISP	Mitotic interactor and substrate of PLK1
	SMC3	Structural maintenance of chromosomes protein 3
Régulation cycle cellulaire	SMC1A	Structural maintenance of chromosomes protein 1A
	PLK2	Serine/threonine-protein kinase PLK2
	NOP2	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase
	GNL3	Guanine nucleotide-binding protein-like 3
	HP1BP3	Heterochromatin protein 1-binding protein 3
	MKI67	Antigen KI-67
	C10orf90	centrosomal protein c10orf90
	REV3L	DNA polymerase zeta catalytic subunit
	AATF	Protein AATF

Dans le noyau, parmi les 305 partenaires de GFP-NIC1dC, 284 partenaires interagissent exclusivement avec GFP-NIC1dC (Figure 20B, tableau 13 + annexe 2) et 21 protéines sont communes à GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC dont les 4 membres de la voie NOTCH (Figure 20B, tableau 10).

Malgré le plus grand nombre de partenaires interagissant avec GFP-NIC1dC, nous remarquons qu'il y a très peu de protéines du protéasome dans l'immunoprécipitat de GFP-NIC1dC comparé à celui de GFP-NIC1 (Tableaux 11, 12 et 13). Ce résultat semble appuyer nos résultats et ceux de la littérature sur la dégradation protéasomale de NIC1 (Figure 12) puisque GFP-NIC1dC est peu dégradé par le protéasome contrairement à GFP-NIC1. Nous observons également un plus grand nombre de protéines associées au trafic cellulaire dans l'immunoprécipitat de GFP-NIC1dC que celui de GFP-NIC1 pouvant suggérer un rôle de GFP-NIC1dC dans cette fonction cellulaire.

Tableau 13 : Protéines associées exclusivement à GFP-NIC1dC et identifiées par spectrométrie de masse suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1dC à partir d'un extrait nucléaire de cellules U2OS GFP-NIC1dC.

Protéines identifiées dans l'immunoprécipitation GFP à partir d'un extrait nucléaire de cellules U2OS GFP-NIC1 non-induites (L) et U2OS GFP-NIC1dC induites (H). Les peptides avec le ratio H/L supérieur ou égal à 2 à partir d'extrait nucléaire ont été listés. Certaines catégories ont été présentées dans le tableau 13, les autres ont été mis en annexe 2.

Catégories fonctionnelles	Gènes	Protéines
	CTNNB1	Catenin beta-1
	LRRFIP2	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2
	AGO2	Protein argonaute-2
	AGO3	Protein argonaute-3
	ZNF184	Zing finger protein 184
	ZNF274	Neurotrophin receptor-interacting factor homolog
	ZNF667	Zing finger protein 667
	ZNF850	Zinc finger protein 850
Régulation transcriptionnelle	MYBBP1A	Myb-binding protein 1A
	MOV10	Putative helicase MOV-10
	DDX60L	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60-like
	DHX36	ATP-dependent RNA helicase DHX36
	YARS2	Tyrosine--tRNA ligase, mitochondrial
	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein
	WBSCR16	Williams-Beuren syndrome chromosomal region 16 protein
	SERBP1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein
	LARP1	La-related protein 1
	MTERF3	Transcription termination factor 3, mitochondrial
	PTRF	Polymerase I and transcript release factor

	NOC2L	Nucleolar complex protein 2 homolog
	HELLS	Lymphoid-specific helicase
	CTCF	Transcriptional repressor CTCF
	DYRK1B	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B
	WDR5	WD repeat-containing protein 5
	GZF1	GDNF-inducible zinc finger protein 1
	TRIM28	Transcription intermediary factor 1-beta
	HNRNPUL1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1
	CCAR1	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1
	MGA	MAX gene-associated protein
	PURA	Transcriptional activator protein Pur-alpha
Protéasome	PSMD12	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12
	ABCA5	ATP-binding cassette sub-family A member 5
	WDR44	WD repeat-containing protein 44
	SNAP23	Synaptosomal-associated protein 23
	MTX2	Metaxin-2
	ATP6V1B2	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform
	ATP6V0D1	V-type proton ATPase subunit d 1
	ATP6V1G1	V-type proton ATPase subunit G 1
Régulation trafic cellulaire	AP2A1	AP-2 complex subunit alpha-1
	ATP6V1A	V-type proton ATPase catalytic subunit A
	CAV1	Caveolin-1
	FLOT1	Flotillin-1
	FLOT2	Flotillin-2
	TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha
	CLTC	Clathrin heavy chain 1
	ATXN2	Ataxin-2
	CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
	MISP	Mitotic interactor and substrate of PLK1
Régulation cycle cellulaire	PRR11	Proline-rich protein 11
	SMC2	Structural maintenance of chromosomes protein 2
	HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial
	UBR4	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
	MKRN1	E3 ubiquitin-protein ligase makorin-1
	MAGEB2	Melanoma-associated antigen B2
Ubiquitination	TRIM56	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56
	UBAP2L	Ubiquitin-associated protein 2-like
	TRIM27	Zinc finger protein RFP

Parmi les 251 partenaires de GFP-NIC1dC dans le lysat total et les 305 protéines dans la fraction nucléaire, 21 partenaires sont communs (Tableau 14) suggérant de véritables partenaires d'interaction de GFP-NIC1dC. Hormis les composants de la voie NOTCH (NOTCH1, MAML1, MAML2, CSL), seulement 3 partenaires sont également capables d'interagir avec GFP-NIC1 : HSPA1A, MACF1 et GPC1 (voir Tableau 10).

Tableau 14 : Protéines associées à GFP-NIC1dC identifiées par spectrométrie de masse à la fois suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1dC à partir d'un lysat total et d'un extrait nucléaire d'U2OS GFP-NIC1dC.

Protéines identifiées dans l'immunoprécipitation GFP (IP) à partir d'un lysat total ou d'un extrait nucléaire de cellules U2OS GFP-NIC1 non-induites (L) et U2OS GFP-NIC1dC induites (H). Les peptides communs avec un ratio H/L supérieur ou égal à 2 suivant l'IP à partir d'un lysat total et d'un extrait nucléaire ont été listés. * protéine pouvant également interagir avec GFP-NIC1 tel qu'identifié par spectrométrie de masse (voir Tableau 10).

Catégories fonctionnelles	Gènes	Protéines
Voie NOTCH	NOTCH1*	NOTCH1
	MAML1*	Mastermind-like protein 1
	MAML2*	Mastermind-like protein 2
	CSL*	CBF1-Su(H)-Lag1
Régulation transcriptionnelle	PTRF	Polymerase I and transcript release factor
	NOC2L	Nucleolar complex protein 2 homolog
	MYBBP1A	Myb-binding protein 1A
Régulation traductionnelle	DHX30	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30
Régulation trafic cellulaire	CAV1	Caveolin-1
Régulation cycle cellulaire	MISP	Mitotic interactor and substrate of PLK1
RNA processing	SNRPD1	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1
Cytosquelette	MACF1*	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5
	NES	Nestin
	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2
	CAPZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1
	MYO1C	Unconventional myosin-Ic
Divers	THY1	Thy-1 membrane glycoprotein
	GPC1*	Glypican-1
	HSPA1A*	Heat shock 70 kDa protein 1A
	TTN	Titin
	GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2

Malgré que les expériences de co-immunoprécipitation n'aient pas permis de révéler un changement dans la capacité de GFP-NIC1dC vs. GFP-NIC1 à interagir avec CSL et MAML1 (Figure 19), les expériences en spectrométrie de masse suggèrent toutefois que la perte du domaine C-terminal de NIC1 pourrait influencer le recrutement de d'autres partenaires d'interaction et influencer la signalisation NIC1-dépendante.

3.1.4. NIC1 est plus efficace à promouvoir la croissance en indépendance d'ancrage que NIC1dC

Pour évaluer l'impact fonctionnel de la perte du domaine C-terminal de NIC1, des courbes de croissance ont été effectuées à l'aide des cellules U2OS FT, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC. Les 3 populations U2OS FT, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC présentent des courbes de croissance similaires suggérant que l'expression de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC n'influence pas la prolifération cellulaire (Figure 21A).

Nous avons ensuite évalué si la signalisation NOTCH1, à travers GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC, pouvait promouvoir la croissance en indépendance d'ancrage, une caractéristique des cellules transformées. Les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont étéensemencées dans du milieu de culture contenant de l'agarose et ont été cultivées pendant 3-4 semaines en présence ou non de doxycycline. Les populations U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC non induites forment très peu de colonies en agar mou (Figure 21B). Les cellules U2OS GFP-NIC1 induites à la doxycycline forment 13 fois plus de colonies que les cellules U2OS GFP-NIC1 non induites (Figures 21B et C). Quant aux cellules U2OS GFP-NIC1dC induites, elles ne forment significativement pas plus de colonies que les cellules U2OS GFP-NIC1dC non induites (Figures 21B et C). Le nombre relatif de colonies formées par la population U2OS GFP-NIC1 induite est significativement plus élevé que le nombre de colonies formées par la population U2OS GFP-NIC1dC induite. Ces résultats suggèrent que NIC1 est plus efficace à promouvoir la croissance en indépendance d'ancrage des cellules U2OS que le NIC1 tronqué de son domaine C-terminal. Ainsi, le plus fort niveau d'expression de GFP-NIC1dC comparativement à GFP-NIC1 ne lui confère pas un plus grand potentiel à promouvoir la croissance en indépendance d'ancrage.

Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que la perte du domaine C-terminal de NIC1 ne permet pas de récapituler la signalisation et/ou la réponse cellulaire médiée par NIC1.

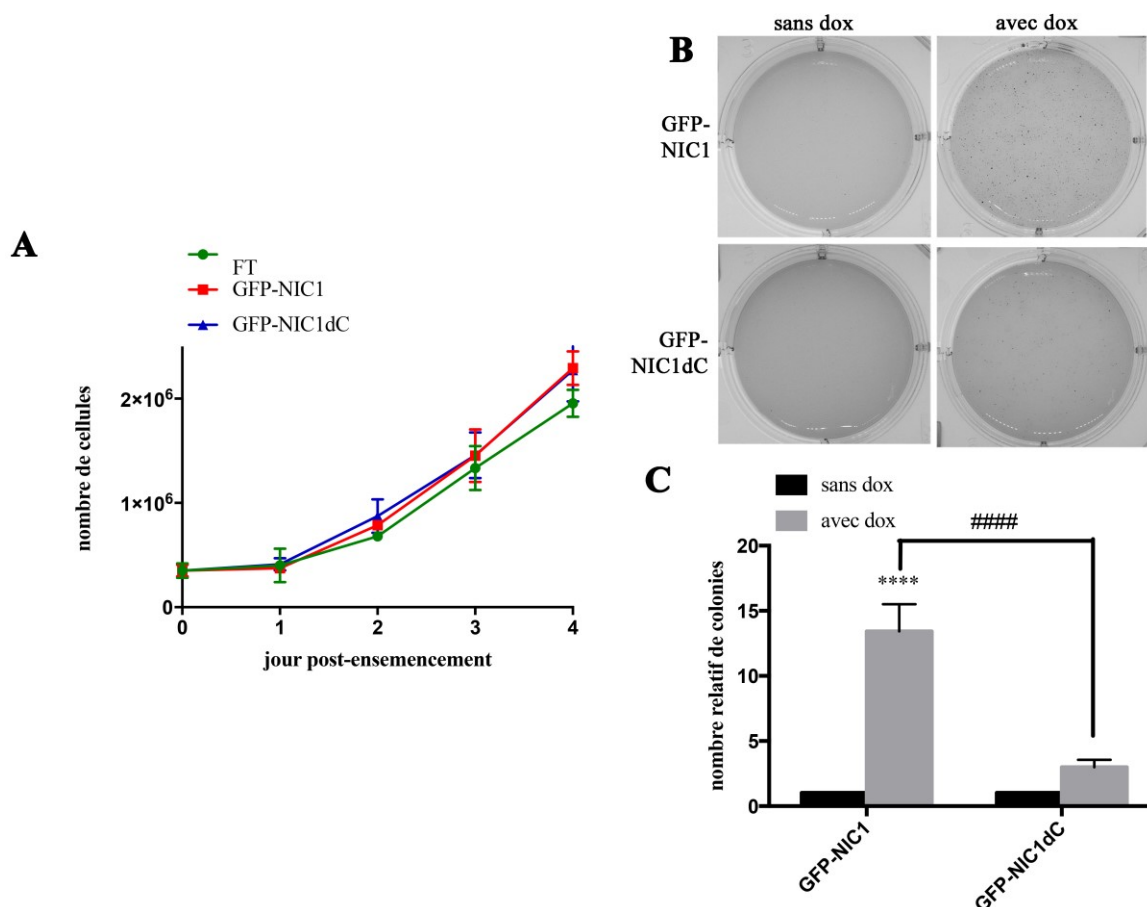


Figure 21 : Impact de l'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC sur la croissance des cellules U2OS.

A) Un nombre identique de cellules U2OS FT, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC a été ensemencé en duplicata (jour 0). Les cellules ont été traitées à la doxycycline (1µg/ml) à partir du jour 0. Le nombre de cellules a été compté à chaque jour jusqu'à 4 jours post-ensemencement. Une représentation graphique de 4 expériences est montrée. **B)** Un nombre identique de cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC a été ensemencé dans du milieu de culture contenant de l'agarose. Les cellules ont été cultivées pendant 3-4 semaines en présence ou non de doxycycline (dox) avant la coloration des colonies au MTT. Une photo d'une expérience représentative est montrée. **C)** Une représentation graphique de 10 expériences décrite en B est montrée. Les colonies ont été dénombrées à l'aide du logiciel Cellprofiler. Le nombre de colonies dans les cellules contrôles (non induite à la doxycycline) a été fixé à 1. **** p <0.0001 par rapport aux cellules contrôles

correspondantes. ##### $p < 0.0001$ par rapport au nombre relatif de colonies dans les cellules GFP-NIC1 traitées à la doxycycline.

3.2. **Objectif 2 : Identifier des mécanismes de régulation post-traductionnelle du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1 influencés par la perte du domaine C-terminal de NIC1**

3.2.1. NIC1 est phosphorylé dans son domaine C-terminal

Les mécanismes de régulation post-traductionnelle du complexe NIC1/CSL/MAML1 ont été très peu étudiés. L'identification de ces mécanismes nous permettrait certainement de mieux comprendre la signalisation médiée par NIC1. Puisque la signalisation médiée par NIC1dC semblait distincte de celle médiée par NIC1, nous avons émis l'hypothèse que le domaine C-terminal pouvait être régulé par des mécanismes post-traductionnels. Ce domaine C-terminal de NIC1 comprend un domaine PEST qui est riche en résidus sérine (S), thréonine (T) et proline (P). La présence de plusieurs sites S/T-P pourrait rendre NIC1 susceptible d'être phosphorylé par des sérines/thréonines kinases qui phosphorylent des sérines ou des thréonines lorsque suivies de proline (S/T-P) comme les ERK. Des résultats du laboratoire avaient d'ailleurs démontré que NIC1 était une protéine phosphorylée et que l'activation de la voie MEK/ERK favorisait certaines formes phosphorylées de NIC1 (Tremblay *et al.*, 2013).

Nous avons d'abord vérifié le statut de phosphorylation de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC en réalisant un essai phosphatase dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC (Figure 22A). Suite à cet essai, les formes retardées de GFP-NIC1 ont disparu suggérant que, tout comme NIC1 endogène dans les cellules MIA PaCa-2 et HEK 293T (Tremblay *et al.*, 2013), GFP-NIC1 est phosphorylé dans les cellules U2OS. À l'opposé, peu de différence dans la migration sur gel SDS-PAGE de GFP-NIC1dC a été notée suivant l'essai phosphatase (Figure 22A). Ce résultat suggère que GFP-NIC1dC est peu modifié par phosphorylation et que le domaine C-terminal de NIC1 est vraisemblablement une région ciblée par des kinases. Afin de supporter nos observations quant au statut phosphorylé de

NIC1, l'anticorps anti-MPM2 a aussi été utilisé pour immunoprécipiter spécifiquement les protéines phosphorylées sur des sites S/T-P (Figure 22B). Seul GFP-NIC1 est détecté suite à l'immunoprécipitation grâce à l'anticorps anti-MPM2 (Figure 22B). Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que NIC1 est phosphorylé dans son domaine C-terminal et possiblement sur des motifs S/T-P. De par cette expérience d'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-MPM2, nous ne pouvons cependant pas exclure que GFP-NIC1 et non GFP-NIC1dC soit lié avec une protéine phosphorylée sur des motifs S/T-P. Il est à noter que l'effet différentiel sur la migration sur gel de GFP-NIC1 vs. GFP-NIC1dC suivant l'essai phosphatase ainsi que la non-détection de GFP-NIC1dC suivant l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-MPM2 permettent d'écartier la possibilité que les effets observés soient conséquents d'une phosphorylation de l'étiquette GFP.

Nous avons par la suite vérifié la phosphorylation de NIC1 dans son domaine C-terminal dans un autre système : les cellules épithéliales de rein embryonnaire humain HEK293T. Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC puis un essai phosphatase avec la λ phosphatase a été effectué (Figure 22C). Nous n'observons plus de formes retardées de GFP-NIC1 suivant l'essai phosphatase tandis que nous ne voyons pas de différence de migration sur gel SDS-PAGE de GFP-NIC1dC avec ou sans l'ajout de la λ phosphatase. Suite à l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-MPM2, on remarque que seul GFP-NIC1 est détecté par immunobuvardage (Figure 22D). Ces résultats suggèrent encore une fois que le domaine C-terminal de NIC1 subit des modifications post-traductionnelles telle la phosphorylation. Les kinases impliquées pourraient particulièrement cibler des motifs S/T-P.

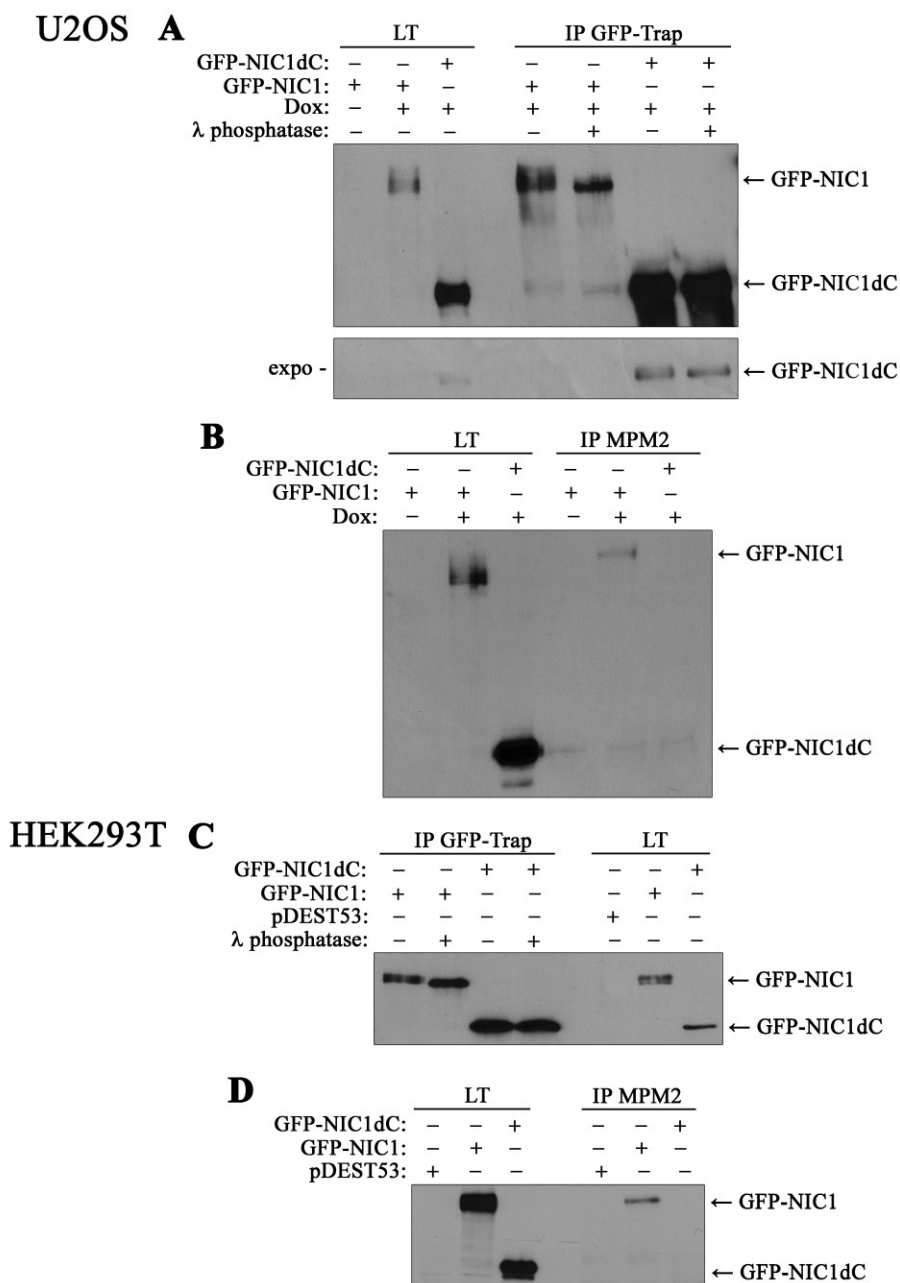


Figure 22 : NIC1 est phosphorylé dans son domaine C-terminal.

A, B) Les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites (+) ou non (-) à la doxycycline (1 μ g/ml) pendant 24h. **C, D)** Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec 1 μ g de vecteur vide pDEST53, GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC. **A, C)** La protéine fusionnée avec GFP a été immunoprécipitée à l'aide des billes GFP-Trap (IP GFP-Trap). L'immunoprécipitat a été séparé en 2 fractions équivalentes et a été mis en présence (+) ou non (-) de la λ phosphatase. **B, D)** Les protéines phosphorylées sur des Sérines/Thréonines suivies de Prolines (S/T-P) ont été immunoprécipitées grâce à l'anticorps anti-MPM2 (IP MPM2). **A - D)** L'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC dans les IP et les lysats totaux (LT) a été évaluée par immunobuvardage à l'aide de l'anticorps anti-GFP. (n=3)

Considérant l'implication de la voie MEK/ERK dans la régulation de NIC1 (Tremblay *et al.*, 2013), nous nous sommes interrogés si les sérine/théronine kinases ERK, qui phosphorylent des motifs S/T-P, phosphorylaient NIC1 dans son domaine C-terminal. Dans le but d'activer la voie MEK/ERK, nous avons traité les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC avec le PMA. Le PMA permet l'activation des PKC dépendantes du diacylglycérol et est utilisé pour stimuler fortement et de manière soutenue la voie MEK/ERK (Suzuki *et al.*, 2002). Pour inhiber la voie MEK/ERK, nous avons utilisé le U0126, un inhibiteur spécifique des MEK (Marampon *et al.*, 2011). La figure 23 démontre que le traitement avec le U0126 diminue le niveau de phosphorylation des ERK tandis que le PMA augmente la phosphorylation des ERK, montrant bien la modulation de l'activité de la voie MEK/ERK en réponse au U0126 ou PMA. Nous observons que le traitement au U0126 diminue l'expression de GFP-NIC dès 90min et cette diminution est maintenue à 240min. Le PMA favorise l'expression et les retards de migration sur gel de GFP-NIC1 après 90min et ceci est amplifié après 240min de traitement. À l'opposé, l'expression et la migration sur gel de GFP-NIC1dC sont peu affectées suivant la modulation de l'activité de la voie MEK/ERK. Ainsi, la voie MEK/ERK induit des changements dans l'expression et la migration de NIC1 et ces changements requièrent la présence du domaine C-terminal de NIC1.

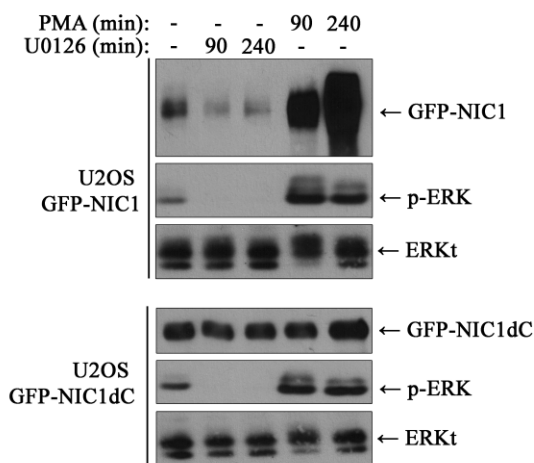


Figure 23 : NIC1 est influencé par la voie MEK/ERK.

Les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites à la doxycycline (1 μ g/ml) pendant 24h puis traitées ou non (-) 90min ou 240min au U0126 (10 μ M) ou au PMA (100nM). L'expression protéique a été analysée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. L'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC a été évaluée à l'aide de l'anticorps anti-GFP. p-ERK = ERK phosphorylé, ERKt= ERK total. (n=3)

3.2.2. NIC1 influence la phosphorylation de MAML1

Dans le cadre de nos expériences, nous avons régulièrement noté une forme retardée sur gel SDS-PAGE de MAML1 et ce, seulement dans les cellules U2OS GFP-NIC1 (Figures 8A et 19). Cette observation laisse suggérer que la présence du domaine C-terminal de NIC1 serait requise pour réguler la dynamique du complexe NIC1/CSL/MAML1. Dans le but de caractériser cette forme retardée de MAML1, nous avons émis l'hypothèse qu'elle correspondait à une forme phosphorylée de MAML1. Pour y répondre, des essais phosphatase ont été réalisés dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC (Figure 24A). À noter que nous avons utilisé les billes GFP-Trap pour l'immunoprécipitation afin d'évaluer la phosphorylation du MAML1 ou CSL associé à GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC. Suivant l'essai phosphatase, nous observons une accélération de la migration sur gel de MAML1 seulement dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et non dans les cellules U2OS GFP-NIC1dC (Figure 24A). À noter qu'il ne semble pas y avoir de différence de migration de CSL en présence ou non de la λ phosphatase dans les cellules

U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC (Figure 24B) suggérant que CSL est peu modifié par phosphorylation.

Nous avons également procédé à des immunoprécipitations avec l'anticorps anti-MPM2 qui détecte des motifs S/T-P phosphorylés. Comme en témoigne la figure 24C, MAML1 et CSL sont détectés seulement dans l'immunoprécipitat anti-MPM2 réalisé à partir des cellules U2OS GFP-NIC1.

Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que seule l'expression de GFP-NIC1, et non GFP-NIC1dC, favorise la phosphorylation de son partenaire d'interaction MAML1. De plus, les expériences d'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-MPM2 suggèrent que le statut de phosphorylation du complexe NIC1dC/CSL/MAML1 est distinct de celui du complexe NIC1/CSL/MAML1.

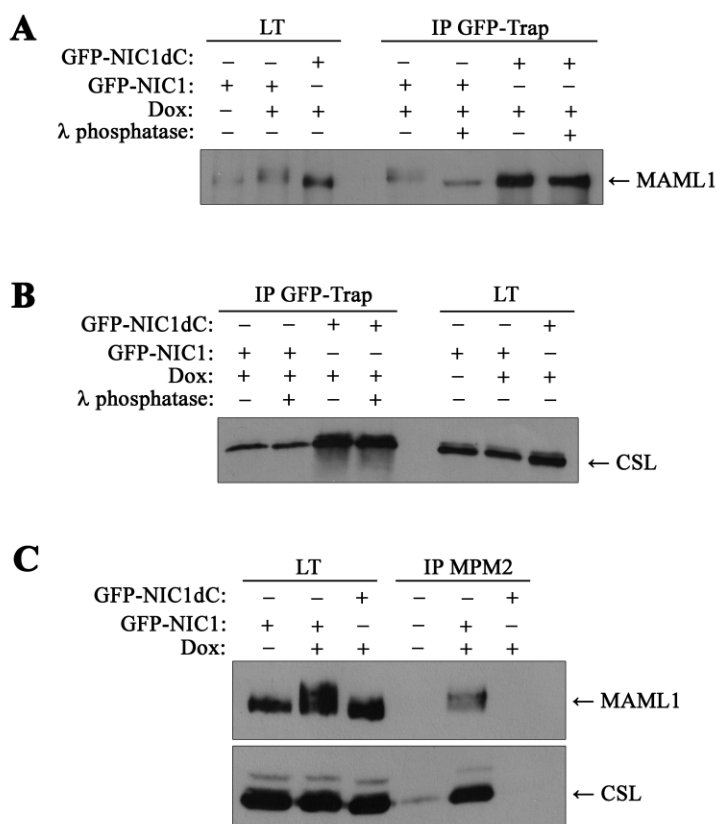


Figure 24 : Phosphorylation de MAML1 dans les cellules U2OS.

A-C) Les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ont été induites (+) ou non (-) pendant 24h à la doxycycline (Dox ; 1 μ g/ml). **A, B)** Les protéines fusionnées avec GFP ont été immunoprécipitées à l'aide des billes GFP-Trap (IP GFP-Trap). L'immunoprécipitat a été séparé en 2 fractions équivalentes et a été mis en présence (+) ou non (-) de la λ phosphatase. **C)** Les protéines phosphorylées sur des Sérines/Thréonines suivies de Proline (S/T-P) ont été immunoprécipitées à partir de lysat de cellules U2OS GFP-NIC1 non induites (-), GFP-NIC1 induites et GFP-NIC1dC induites grâce à l'anticorps anti-MPM2 (IP MPM2). **A-C)** L'expression endogène de MAML1 et CSL a été évaluée par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques. (n=3)

Nous avons vérifié le statut de phosphorylation de MAML1 dans 2 autres systèmes : les cellules HEK293T et les cellules MIA PaCa-2 (Figure 25). Nous avons tout d'abord procédé à un essai phosphatase dans les cellules HEK293T qui sur-expriment GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC (Figure 25A). Les billes GFP-Trap ont permis d'immunoprécipiter les protéines MAML1 associées à GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC. Les essais phosphatase ont permis de révéler que MAML1 était phosphorylé seulement suivant la surexpression de GFP-NIC1.

Nous avons vérifié si MAML1 était phosphorylé suite à l'activation des récepteurs NOTCH endogènes dans les cellules MIA PaCa-2 (Figure 25B). Pour ce faire, nous avons traité ces cellules 15min à l'EGTA et après 90min de recouvrement, nous avons immunoprécipité les protéines phosphorylées sur motifs S/T-P à l'aide de l'anticorps anti-MPM2. Le traitement à l'EGTA mène à l'augmentation d'expression de NIC1 appuyant que ce traitement mène au clivage du récepteur endogène NOTCH1 tel que précédemment rapporté (Tremblay *et al.*, 2013). Suite au traitement à l'EGTA, nous avons révélé l'expression de NIC1, MAML1 et CSL dans l'immunoprécipitat anti-MPM2. L'expression de NIC1 ainsi que la détection de NIC1, MAML1 et CSL dans l'immunoprécipitat anti-MPM2 est prévenue par le pré-traitement avec l'inhibiteur du complexe γ -sécrétase DAPT. Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie NOTCH entraîne une ou des phosphorylations sur motif S/T-P sur NIC1, CSL, MAML1 et/ou une protéine qui y est associée.

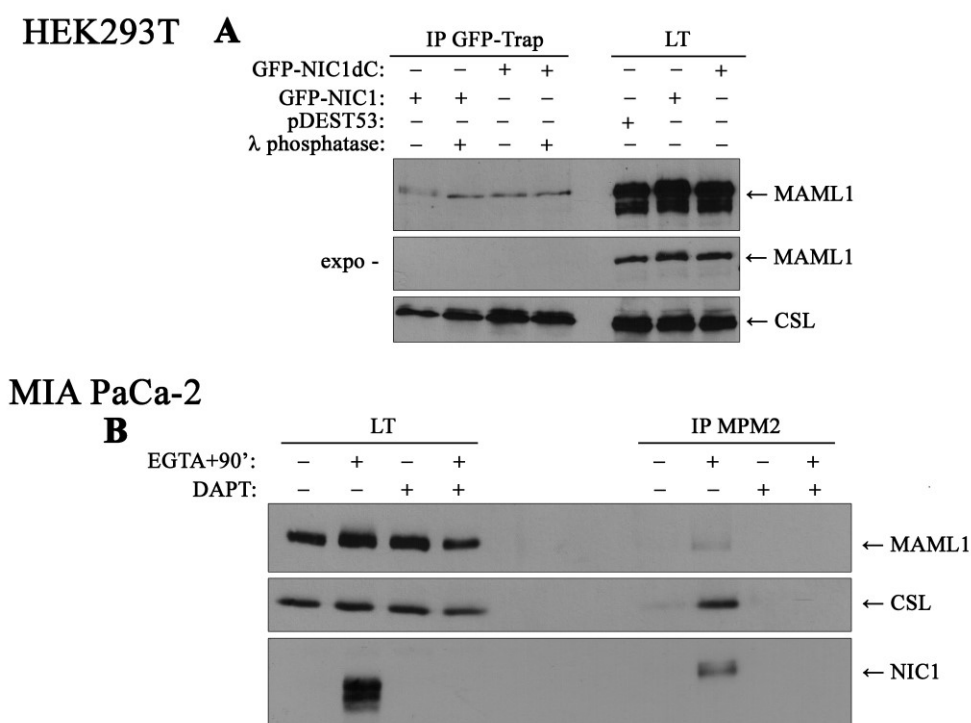


Figure 25 : Phosphorylation de MAML1 dans les cellules HEK293T et MIA PaCa-2.

A) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec 1 μ g de vecteur vide pDEST53, GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC. Les protéines fusionnées avec GFP ont été immunoprécipitées à

l'aide des billes GFP-Trap. L'immunoprécipitat (IP GFP-Trap) a été séparé en 2 fractions équivalentes et a été mis en présence (+) ou non (-) de la λ phosphatase. **B**) Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées (+) ou non (-) au DAPT (25 μ M) pendant 24h. Elles ont ensuite été traitées (+) à l'EGTA (4mM) pendant 15 min, puis le milieu a été remplacé par du milieu frais pour une période de 90 minutes avant que les cellules soient lysées. Les protéines phosphorylées sur des Sérines/Thréonines suivies de Proline (S/T-P) ont été immunoprécipitées grâce à l'anticorps anti-MPM2 (IP MPM2). **A, B**) Des immunobuvardages ont été faits à l'aide des lysats totaux (LT) et des immunoprécipitats (IP). L'expression endogène de MAML1, CSL et NIC1 a été évaluée par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques. (n=3)

Peu de données sur la phosphorylation de MAML1 sont répertoriées dans la littérature. Nous avons donc tenté d'identifier des sites potentiels de phosphorylation à l'aide de nos analyses de spectrométrie de masse (Tableau 15). Trois sites de phosphorylations sur 3 sérines suivies de proline ont été trouvés par cette technique : S303, S360 et S45. Des études bio-informatiques (Netphos 3.1) ont révélé que les sérines 303 et 45 étaient des sites potentiels de phosphorylation par des kinases non identifiées alors que la sérine 360 pouvait être la cible de plusieurs kinases potentielles comme CDK5, GSK3 et p38 MAPK. Grâce à ces études bio-informatiques, nous avons identifié plusieurs autres sites de phosphorylation potentiels sur MAML1 et également des kinases potentielles (Tableau 16).

Tableau 15 : Identification de sites potentiels de phosphorylation de MAML1 par spectrométrie de masse.

Grâce aux analyses de spectrométrie de masse (MS) (présentées dans les tableaux 10 à 14, les peptides de MAML1 identifiés ont été analysés pour le statut de phosphorylation. La séquence du peptide de MAML1 et la probabilité de phosphorylation du/des résidus est indiquée entre parenthèses. En rouge, les résidus qui ont une forte probabilité d'être phosphorylés. Des analyses bio-informatiques à l'aide du logiciel NetPhos 3.1 suggèrent des kinases potentielles pouvant phosphoryler les résidus de MAML1 identifiés.

	Sites de phosphorylation (MS)	Kinase potentielle (NetPhos)
S303	T(0.291)EFS(0.662)PAAFEQQLGS(0.047)PQVR	Non identifiée
S360	ADNPS(0.932)PNLMPAS(0.068)AQAQNAQR	CDK5, GSK3, p38
S45	YEAVS(1)PERLELER	Non identifiée

Tableau 16 : Identification de sites potentiels de phosphorylation de MAML1 par analyses bio-informatiques.

La séquence de MAML1 a été soumise pour analyse à l'aide du logiciel NetPhos 3.1. Ce logiciel a permis d'identifier le nombre de sites potentiels de phosphorylation sur MAML1 par les kinases mentionnées.

Kinase potentielle	Nombre de sites phosphorylation
p38 MAPK	10
PKC	24
PKA	10
GSK3	5
DNAPK	15
ATM	9
Cdc2	22
CDK5	7

Nous observons que plusieurs de ces kinases potentielles sont des sérines/thréonines kinases qui phosphorylent sur un motif S/T-P. En effet, parmi celles-ci on retrouve les kinases GSK3 et p38 MAPK. Ainsi, afin de déterminer si l'une de ces kinases pouvaient phosphoryler MAML1, nous avons traité pendant 4h et 8h les cellules U2OS GFP-NIC1 avec différents inhibiteurs de sérines/thréonines kinases : SB203580 (inhibiteur de p38 MAPK), SP600125 (inhibiteur de JNK), CHIR99021 (inhibiteur de GSK3) et SCH7722984 (inhibiteur des ERK) (Figure 26A). Nous remarquons que le retard de migration de MAML1 (indicatif d'une augmentation de la phosphorylation de MAML1) induit par la doxycycline dans les cellules U2OS GFP-NIC1 n'est pas prévenu par ces inhibiteurs de kinases. À prime abord, ces résultats suggèrent que la p38 MAPK, JNK, GSK3 et les ERK ne semblent pas être impliquées dans la phosphorylation de MAML1 induite suivant l'expression de GFP-NIC1.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur d'autres kinases pouvant potentiellement phosphoryler MAML1 (Tableau 16 et figure 26B) soit PKC, cdc2, CDK5, DNAPK, ATM et PKA. Nous avons traité pendant 4h les cellules U2OS GFP-NIC1 avec différents inhibiteurs pharmacologiques : staurosporine (inhibiteur de PKC), roscovitine (inhibiteur

de cdc2 et CDK5), Nu7441 (inhibiteur de DNAPK), Ku55933 (inhibiteur d'ATM) et H89 (inhibiteur de PKA) (Figure 26B). L'induction des cellules U2OS GFP-NIC1 à la doxycycline amène le retard de migration sur gel SDS-PAGE de MAML1 qui est prévenu par le traitement à la staurosporine et à la roscovitine. Les autres inhibiteurs Nu7441, Ku55933 et H89 ne préviennent pas le retard de migration sur gel de MAML1 induit par la doxycycline. Ces résultats suggèrent que PKC, cdc2 et/ou CDK5 pourraient être impliqués dans la phosphorylation de MAML1.

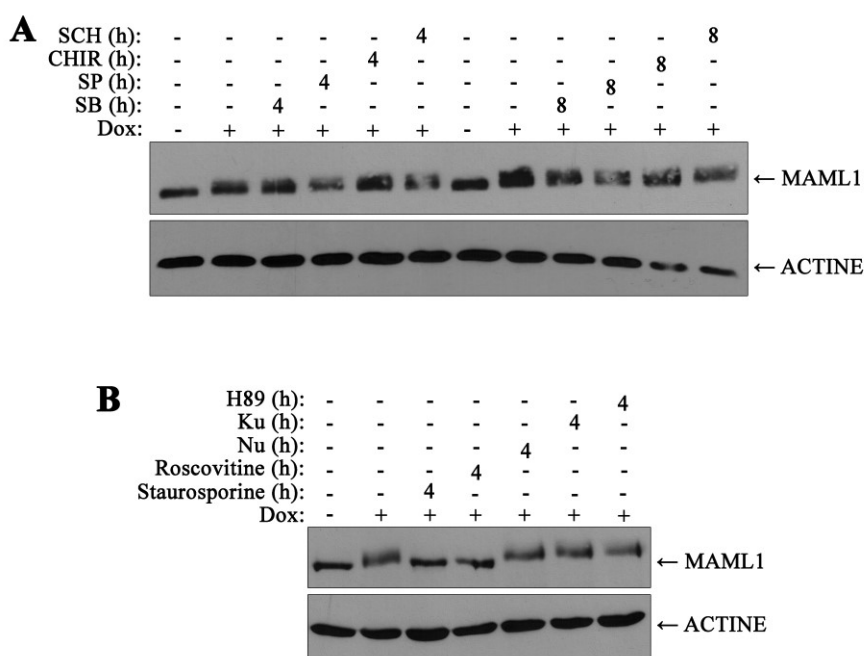


Figure 26 : Régulation de la phosphorylation de MAML1.

A) Les cellules U2OS GFP-NIC1 ont été induites (+) ou non (-) à la doxycycline (Dox ; 1µg/ml) pendant 24h. Les cellules ont par la suite été traitées ou non (-) pendant 4h ou 8h avec l'inhibiteur de p38MAPK : SB203580 (SB, 20µM), l'inhibiteur de JNK : SP600125 (SP, 25µM), l'inhibiteur de GSK3 : CHIR99021 (CHIR, 5µM) et l'inhibiteur des ERK : SCH7722984 (SCH, 500nM). **B)** Les cellules U2OS GFP-NIC1 ont été induites (+) ou non (-) à la doxycycline (Dox ; 1µg/ml) pendant 24h. Les cellules ont par la suite été traitées ou non (-) pendant 4h avec l'inhibiteur de PKC : staurosporine (1µM), l'inhibiteur de cdc2 et CDK5 : roscovitine (50µM), l'inhibiteur de DNAPK : Nu7441 (Nu, 10µM), l'inhibiteur d'ATM : Ku55933 (Ku, 10µM) et l'inhibiteur de PKA : H89 (10µM). **A - C)** L'expression endogène de MAML1 et ACTINE a été évaluée par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques. (n=2-3)

3.3. Objectif 3 : Évaluer la participation des processus endocytiques dans la régulation de NOTCH1

3.3.1. NIC1 peut emprunter la voie de dégradation protéasomale et lysosomale

Comme précédemment rapporté dans la littérature (Rechsteiner & Rogers, 1996; Oberg *et al.*, 2001; Gupta-Rossi *et al.*, 2001; G. Wu *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2004), nos résultats ont démontré que NIC1 est une protéine de courte demi-vie (Figure 10) dont la stabilité est régulée par la dégradation protéasomale (Figure 12). Des études ont suggéré que NOTCH1 et/ou NIC1 pouvait également emprunter la voie de dégradation lysosomale (McGill *et al.*, 2009; McGill & McGlade, 2003; Hori *et al.*, 2012; Baron, 2012; Kopan & Ilagan, 2009). Pour vérifier si NIC1 pouvait être dégradé par la voie lysosomale dans un modèle exprimant des niveaux endogènes de NOTCH1 et de NIC1, nous avons traité les cellules MIA PaCa-2 avec un inhibiteur de dégradation lysosomale, le chlorure d'ammonium (NH₄Cl) (Figure 27A). Nous avons constaté qu'une forme de plus faible poids moléculaire de NIC1 apparaissait au cours du temps suite au traitement au NH₄Cl alors que le traitement à l'inhibiteur de protéasome (MG132) menait à l'augmentation d'expression d'un NIC1 de même poids moléculaire que le NIC1 exprimé dans les cellules contrôles (Figure 27A).

Ayant démontré que les cellules MIA PaCa-2 expriment une forme phosphorylée de NIC1 en condition basale (Tremblay *et al.*, 2013), nous nous sommes demandé si la forme de plus faible poids moléculaire de NIC1 qui apparaît en réponse au NH₄Cl était une forme de NIC1 peu phosphorylée. Nous avons donc procédé à un essai phosphatase à partir d'extraits protéiques de cellules MIA PaCa-2 traitées au NH₄Cl ou au MG132. Le NIC1 endogène a été immunoprécipité à l'aide de l'anticorps anti-NIC1. Les échantillons ont ensuite été incubés ou non avec la λ phosphatase. Dans les cellules MIA PaCa-2 contrôles, nous observons que l'essai avec la λ phosphatase mène à l'apparition d'une bande de plus faible poids moléculaire de NIC1 (Figure 27B), confirmant nos précédents résultats que NIC1 est une protéine phosphorylée dans ces cellules en condition basale (Tremblay *et al.*, 2013). Dans les cellules traitées au MG132, l'ajout de la λ phosphatase entraîne également une accélération de migration de NIC1 suggérant que le NIC1 qui s'accumule suivant

l'inhibition du protéasome est une forme phosphorylée de NIC1. L'essai phosphatase sur les échantillons traités au NH_4Cl révèle que la bande de faible poids moléculaire de NIC1 migre à la même vitesse en absence ou présence de la λ phosphatase. Ces résultats suggèrent que le traitement au NH_4Cl permet d'accumuler une forme non phosphorylée de NIC1.

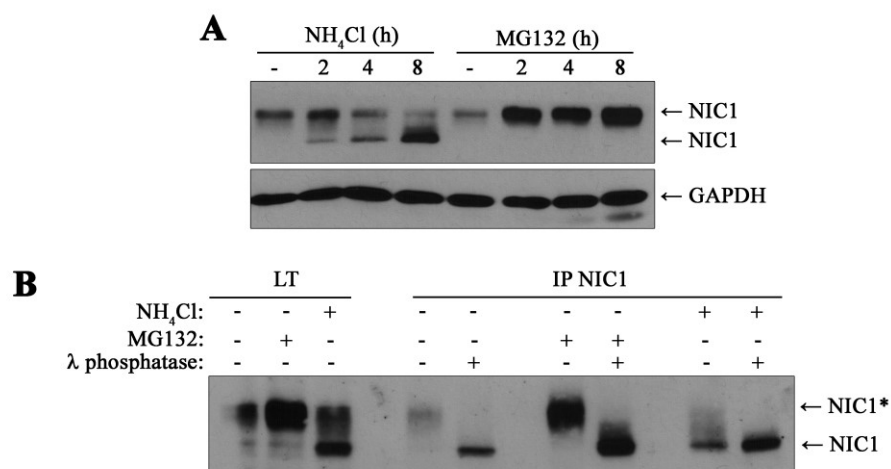


Figure 27 : NIC1 peut être dégradé à la fois par le lysosome et le protéasome.

A) Immunobuvardages sur des lysats protéiques de MIA PaCa-2 traitées ou non (-) au NH_4Cl (25mM) ou au MG132 (10 μM) pendant les périodes de temps indiquées. **B)** Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées (+) ou non (-) pendant 8h au NH_4Cl (25mM) ou au MG132 (10 μM). NIC1 a été immunoprécipité à l'aide de l'anticorps anti-NIC1 (IP NIC1). L'immunoprécipitat a été séparé en 2 fractions équivalentes et a été mis en présence (+) ou non (-) de la λ phosphatase. **A, B)** L'expression protéique de NIC1 et GAPDH a été analysée dans l'IP ou les lysats totaux (LT) par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques. NIC1* représente une forme phosphorylée de NIC1. (n=3)

Dans les cellules MIA PaCa-2, le NIC1 détecté provient du clivage du récepteur NOTCH1. Il faut se rappeler que le complexe γ -sécrétase est responsable de la libération de NIC1 (Fortini, 2002; Selkoe & Kopan, 2003). Nous pouvons remarquer que le traitement avec un inhibiteur du complexe γ -sécrétase, DAPT, est efficace à prévenir le clivage de NOTCH1 puisque l'expression de NIC1 diminue au cours du temps (Figure 28). À remarquer qu'en prévenant ainsi tout nouveau clivage du récepteur NOTCH1, le traitement

au DAPT nous permet d'analyser le destin/la demi-vie de NIC1, une fois libéré du récepteur.

Par la suite, nous avons voulu vérifier si l'inhibition du complexe γ -sécrétase par l'inhibiteur DAPT prévenait les modulations de NIC1 induites par les inhibiteurs de protéasome et lysosome. Nous avons donc traité les cellules au MG132 ou au NH_4Cl tout en empêchant le clivage de NOTCH1 (Figure 28). Nous observons que le traitement au DAPT ne prévient pas l'augmentation d'expression de NIC1 induite par le MG132 (Figure 28A). Ceci suggère que le NIC1 qui était déjà libéré du récepteur au moment du traitement et dont la demi-vie est estimée à 2h (Figures 10C et 28A) est éventuellement dégradée par le protéasome. À l'opposé, nous observons que le DAPT prévient l'accumulation de la bande de faible poids moléculaire de NIC1 observée suite au traitement au NH_4Cl (Figure 28B). Ceci suggère qu'une fraction du NIC1 nouvellement libérée de NOTCH1 n'est pas modifiée post-traductionnellement (voire non phosphorylée) et emprunte rapidement la voie de dégradation lysosomale.

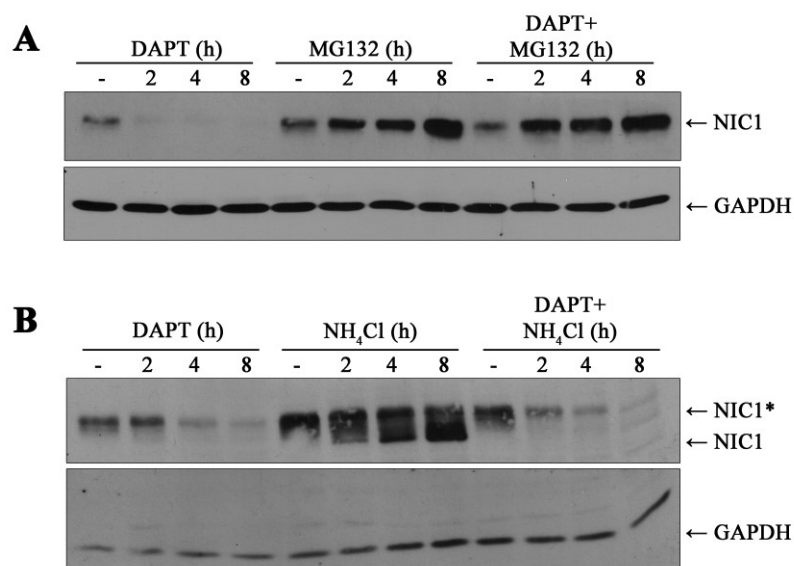


Figure 28 : Une fraction du NIC1 nouvellement libérée emprunte la voie de dégradation lysosomale.

A) Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées ou non (-) au DAPT (25 μM) et/ou MG132 (10 μM) pendant les périodes de temps indiquées. **B)** Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées ou non (-) au DAPT et/ou au NH_4Cl (25mM) pendant les périodes de temps

indiquées. **A, B)** L'expression protéique a été analysée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. NIC1* représente une forme phosphorylée de NIC1. (n=3)

Ces expériences démontrant que NIC1 pouvait emprunter à la fois les voies de dégradation protéasomale et lysosomale (Figures 27 et 28) ont été effectuées à l'aide de cellules MIA PaCa-2 en conditions basales. Cela démontre que, dans ces conditions, ces cellules présentent un certain niveau d'activation, possiblement ligand-dépendant, du récepteur NOTCH1. D'une part, le NIC1 libéré peut être phosphorylé pour éventuellement être dégradé via le protéasome ou d'autre part, une fraction de NIC1 ne subit pas de phosphorylation et emprunte rapidement la voie de dégradation lysosomale. Nous avons voulu évaluer si ces deux voies de dégradation étaient également empruntées par NIC1 lors d'une activation massive et synchronisée, ligand-indépendante, de NOTCH1 par traitement à l'EGTA. L'EGTA, en chélatant le calcium, permet de déstabiliser et favoriser le clivage du récepteur NOTCH1 pour entraîner la libération de NIC1. Suite au traitement à l'EGTA, lorsque les cellules sont mises de nouveau dans du milieu de culture frais, il y a un retour graduel de l'expression de NIC1 à des niveaux comparables aux cellules contrôles (Tremblay *et al.*, 2013). Ainsi, le traitement à l'EGTA permet de synchroniser l'activation (ligand-indépendante) du récepteur NOTCH1 pour ensuite pouvoir évaluer les modifications post-traductionnelles et le destin du NIC1 nouvellement libéré. Nous observons dans la figure 29 que le traitement à l'EGTA entraîne une augmentation de l'expression de NIC1 traduisant l'efficacité de l'activation de la voie NOTCH1. À noter que le NIC1 détecté dans les cellules traitées à l'EGTA se présente sous différents poids moléculaires suggérant des formes différenciellement modifiées post-traductionnellement de NIC1.

Pour déterminer si le NIC1 nouvellement libéré du récepteur était dégradé par le protéasome, nous avons ajouté du MG132 lors de la période de recouvrement suivant le traitement à l'EGTA. En figure 29A, nous remarquons que le retour à des niveaux d'expression de NIC1, comparables aux cellules contrôles, est prévenu par l'ajout de MG132. On note également que le traitement au MG132 influence seulement les niveaux d'expression du NIC1 de plus haut poids moléculaire. Ces résultats suggèrent que, suite à l'activation ligand-indépendante du récepteur NOTCH1, des modifications post-

traductionnelles sur NIC1 vont lui permettre d'être destiné à la voie de dégradation protéasomale permettant un retour de l'expression de NIC1 à des niveaux comparables aux cellules contrôles.

Par la suite, nous avons voulu savoir si le NIC1 nouvellement libéré suite au traitement à l'EGTA pouvait également être dégradé par le lysosome. Nous avons donc traité les cellules à l'EGTA puis placé les cellules dans du milieu frais contenant l'inhibiteur de dégradation lysosomale, le NH_4Cl (Figure 29B). D'une part, on observe que l'ajout de NH_4Cl n'influence pas l'expression de la forme de haut poids moléculaire de NIC1. Cependant, nous remarquons qu'une forme de faible poids moléculaire de NIC1 s'accumule lors d'une inhibition de la dégradation lysosomale par le NH_4Cl (Figure 29B). Ainsi, il semblerait que, suite à l'activation ligand-indépendante du récepteur NOTCH1, une petite fraction de NIC1 n'est pas phosphorylée et est dirigée vers la dégradation par le lysosome.

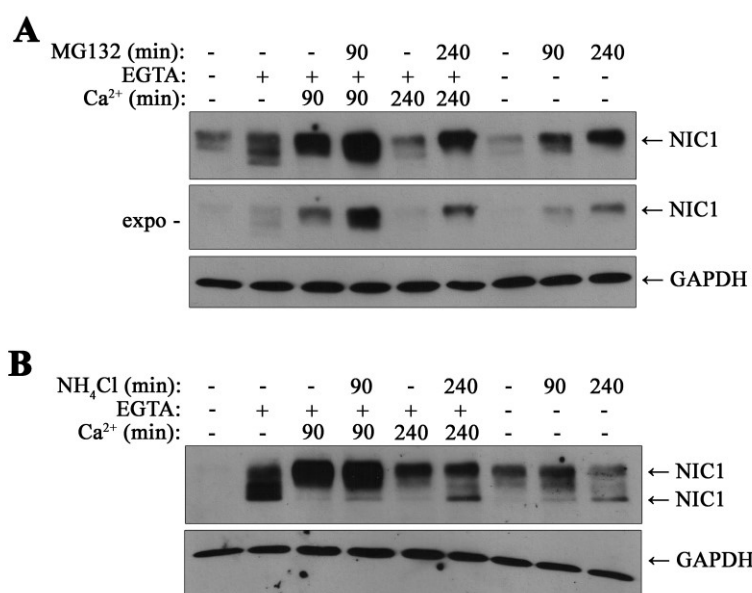


Figure 29 : Une fraction de NIC1 nouvellement libérée de manière ligand-indépendante peut être dégradée par le lysosome.

A, B Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées ou non (-) 15 min à l'EGTA 4mM (+) puis le milieu a été changé pour du milieu frais (Ca^{2+}) contenant ou non (-) du MG132 (10 μM) (**A**) ou du NH_4Cl (25mM) (**B**) pendant 90min et 240min. L'expression protéique a été analysée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. (n=3)

3.3.2. Les processus endocytiques participent à la libération du NIC1

Nos résultats précédents montrent que NIC1 peut être dégradé par le lysosome dans les cellules pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2. Un des moyens connus d'atteindre le lysosome est par la voie d'endocytose. Particulièrement chez la drosophile, des études montrent que le récepteur dNotch peut être endocyté pour être ensuite recyclé ou dégradé dans le lysosome. Ainsi, l'endocytose pourrait contribuer à réguler les niveaux d'expression de dNotch. De plus, un clivage possible de dNotch au niveau des endosomes a été proposé (Hori *et al.*, 2012; Baron, 2012). Quelques études montrent que le récepteur NOTCH1 peut être internalisé chez les mammifères (McGill *et al.*, 2009; Gupta-Rossi *et al.*, 2004; Kopan & Ilagan, 2009). Ainsi, nous avons voulu évaluer si l'endocytose du récepteur NOTCH1 pouvait contribuer à réguler les niveaux d'expression de NOTCH1 et NIC1. Pour vérifier si le récepteur NOTCH1 était internalisé suite à des processus endocytiques dans les cellules MIA PaCa-2, nous avons traité les cellules à la concanavaline A (ConA) (Figure 30A). Nous observons une augmentation de l'expression de NOTCH1 suite à l'inhibition de l'endocytose suggérant que l'expression du récepteur NOTCH1 peut être régulée grâce à des processus endocytiques. Puis, nous avons regardé si l'inhibition de l'endocytose pouvait influencer les niveaux d'expression de NIC1 dans notre modèle cellulaire MIA PaCa-2. Nous observons une diminution de l'expression de NIC1 suite au traitement des cellules avec l'inhibiteur de l'endocytose concanavaline A. Les niveaux d'expression de NIC1 atteints suite à l'inhibition de l'endocytose sont comparables aux niveaux d'expression de NIC1 détectés dans les cellules traitées avec l'inhibiteur du complexe γ -sécrétase DAPT qui prévient le clivage de NOTCH1 (Figure 30B). Ces résultats suggèrent que les processus endocytiques puissent être impliqués dans le clivage de NOTCH1.

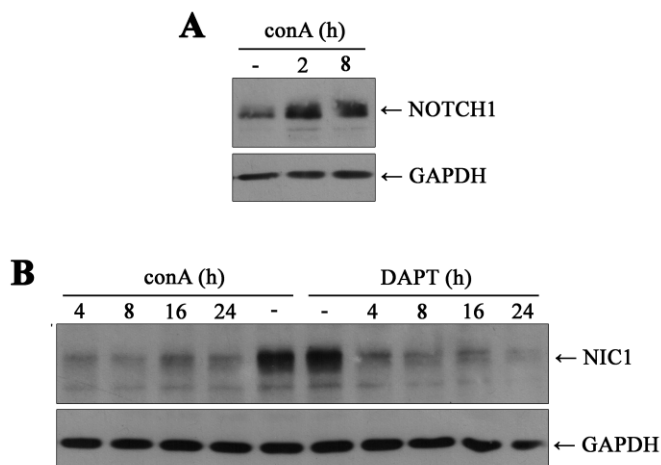


Figure 30 : Les processus endocytiques régulent les niveaux d'expression de NOTCH1 et de NIC1.

Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées ou non (-) à la concanavaleine A (conA, 50µg/mL) (**A, B**) ou au DAPT (25µM) (**B**) pendant les périodes de temps indiquées. **A, B** L'expression protéique a été analysée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. (n=3)

Puisque nous avons vu que NIC1 pouvait être dégradé par le protéasome et le lysosome (Figure 27A), nous nous sommes demandés si l'endocytose de NOTCH1 pouvait influencer le mode de dégradation de NIC1, suite à sa libération du récepteur. Tout d'abord, nous avons voulu investiguer si NIC1 libéré du récepteur NOTCH1 internalisé pouvait être dégradé par le protéasome. Nous avons effectué une cinétique de temps en traitant simultanément les cellules MIA PaCa-2 au MG132, inhibiteur de protéasome, et à la concanavaleine A (conA), inhibiteur d'endocytose (Figure 31A). Nous observons bien une accumulation de NIC1 suite à l'inhibition de la dégradation protéasomale tel que déjà observé à la figure 27A. De plus, une diminution de l'expression de NIC1 est notée suite à l'inhibition de l'endocytose. Le traitement à la concanavaleine A semble prévenir partiellement l'accumulation de NIC1 apportée par le traitement au MG132 (Figure 31A). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'endocytose pourrait limiter la quantité de NIC1 dégradée par la voie protéasomale.

Ensuite, nous avons voulu savoir si NIC1 libéré du récepteur NOTCH1 internalisé pouvait être dégradé par le lysosome. Nous avons traité simultanément les cellules MIA PaCa-2 au NH₄Cl, inhibiteur de lysosome, et à la concanavaleine A (conA), inhibiteur

d'endocytose (Figure 31B). Nous observons bien une accumulation de NIC1 de faible poids moléculaire suite à l'inhibition de la dégradation lysosomale comme observé à la figure 27A. Le traitement concomitant à la concanavoline A prévient partiellement l'accumulation de NIC1 de faible poids moléculaire induite par le traitement au NH_4Cl (Figure 31B) suggérant que l'inhibition de l'endocytose peut également limiter la quantité de NIC1 dégradée par la voie lysosomale.

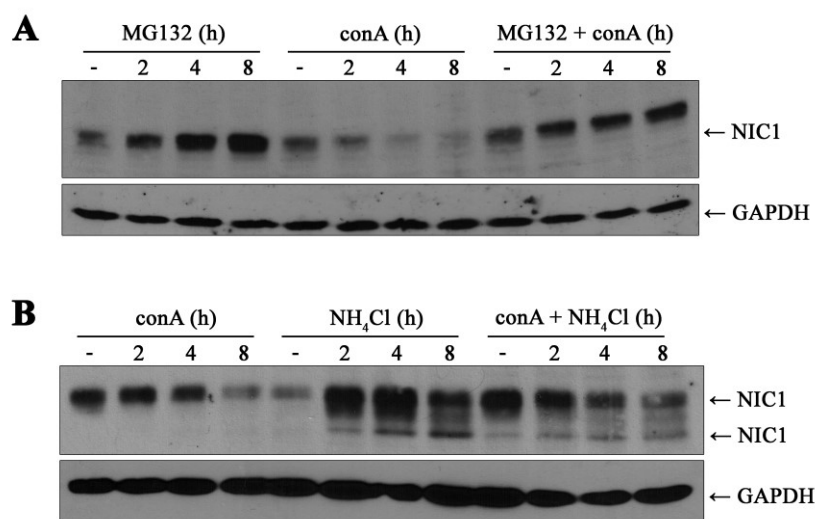


Figure 31 : L'inhibition de l'endocytose prévient partiellement la dégradation protéasomale et lysosomale de NIC1.

Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées ou non (-) à la concanavoline A (conA, $50\mu\text{g}/\text{mL}$) (**A**, **B**), au MG132 ($10\mu\text{M}$) (**A**) et/ou au NH_4Cl (25mM) (**B**) pendant les périodes de temps indiquées. **A**, **B**) L'expression protéique a été analysée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. (n=3)

4. DISCUSSION

La signalisation NOTCH joue un rôle important au cours du développement embryonnaire. Cette voie de signalisation est d'ailleurs éteinte dans la plupart des tissus chez l'adulte. Cependant, une activation aberrante est observée dans de nombreuses pathologies humaines comme le cancer. En effet, la signalisation NOTCH est retrouvée active dans les cancers du sein (Guo *et al.*, 2011), du pancréas (Jones *et al.*, 2008) et dans les leucémies lymphoblastiques aiguë à cellules T (T-ALL) (Pear & Aster, 2004).

Cette voie de signalisation très conservée et d'architecture simple demande certainement une régulation fine mais complexe qui est encore mal connue à ce jour. Il a été démontré que la liaison d'un ligand au récepteur NOTCH1 entraîne une série de clivages du récepteur NOTCH1, ce qui permet la libération de son domaine intracellulaire NIC1. Ensuite, NIC1 transloque au noyau où, en association avec ses partenaires, CSL et MAML1, forme un complexe transcriptionnel ternaire et active la transcription de gènes cibles. Il n'existe donc pas d'intermédiaires entre le récepteur membranaire et le NIC1 nucléaire et ainsi, il n'y a pas d'amplification de signal comme dans la plupart des voies de signalisation. L'arrêt de la transcription voire arrêt du signal est, entre autres, assuré par des modifications post-traductionnelles sur NIC1 (Friedmann *et al.*, 2008). Malgré la simplicité de cette voie, il est soupçonné que la signalisation NOTCH est régulée par des mécanismes précis et beaucoup plus complexes qu'anticipé qui assurent les diverses et nombreuses réponses cellulaires (Bray, 2016). À cette fin, nous avons voulu identifier des mécanismes de régulation de la signalisation NOTCH et ce, à différentes étapes : du récepteur NOTCH1 à l'intégration de NIC1 à un complexe transcriptionnel actif.

4.1. Rôles potentiels de l'endocytose dans la régulation de la signalisation NOTCH

Malgré que la littérature suggère une activation des récepteurs NOTCH au niveau de la membrane plasmique, il a été suggéré que l'activation du récepteur dNotch pouvait nécessiter son endocytose (Baron, 2012; Tien *et al.*, 2009; Hori *et al.*, 2012). Cet aspect reste encore avec beaucoup de questions, notamment chez les mammifères. Bien que cela

reste controversé pour la voie NOTCH, de plus en plus d'études montrent que les endosomes jouent plus qu'un rôle de transporteurs vésiculaires puisqu'ils peuvent servir de plateforme pour activer de nombreuses voies de signalisation (Gould & Lippincott-Schwartz, 2009). Cette perspective d'activation de la voie NOTCH à la fois à la membrane plasmique et dans les endosomes complexifie la simple architecture de la signalisation NOTCH.

Le récepteur Notch1 est principalement localisé à la membrane plasmique mais certaines études le démontrent au niveau des endosomes pour son éventuel recyclage ou dégradation par les lysosomes (Tien *et al.*, 2009; Kopan & Ilagan, 2009; Bray, 2006, 2016; McGill *et al.*, 2009; McGill & McGlade, 2003). Les études chez les mammifères sont peu nombreuses et difficiles en raison de nombreuses isoformes des protéines qui régulent l'endocytose. C'est pourquoi l'activation de la voie NOTCH dans les endosomes a surtout été étudiée chez la drosophile (Hori *et al.*, 2012; Baron, 2012). Vaccari *et al.* ont montré que plusieurs voies d'internalisation menant à l'entrée de dNotch au niveau des endosomes favorisaient l'activation ligand-indépendante de dNotch (Vaccari *et al.*, 2008). Le groupe d'Artavanis-Tsakonas a, quant à lui, suggéré que la monoubiquitination de dNotch par l'ubiquitine ligase Deltex mènerait à son activation lors de son transit dans les corps multivésiculaires (Hori *et al.*, 2012) Cette voie d'activation du récepteur dNotch dans les endosomes ne serait toutefois pas universelle et dépendrait du contexte qui est encore mal compris.

Puisque les études avaient surtout été effectuées chez la drosophile ou à l'aide de la sur-expression d'ADNc codant pour la séquence murine de Notch1, nous nous sommes alors demandés si l'endocytose jouait un rôle dans la régulation endogène de NOTCH1 dans notre modèle d'étude de cellules pancréatiques tumorales humaines. Nous avons observé que l'expression du récepteur NOTCH1 augmentait mais que l'expression de NIC1 diminuait suite à l'inhibition de l'endocytose par la concanavaline A (Figure 30). Ces résultats suggèrent que les processus endocytiques pourraient réguler les niveaux d'expression de NOTCH1 et de NIC1 dans les cellules humaines MIA PaCa-2. Ainsi, dans notre modèle, nos résultats supportent également un rôle potentiel de l'endocytose dans l'activation du récepteur NOTCH1. Cependant, ils n'ont pas permis d'identifier une voie

particulière d'internalisation menant à l'activation de NOTCH1 puisque nous avons utilisé la concanavaline A, un inhibiteur général de l'endocytose et qui inhibe donc potentiellement plusieurs voies d'internalisation. Il est à noter que nous avons toujours été en mesure de détecter un faible niveau d'expression de NIC1 suite au traitement à la concanavaline A. Ainsi, l'expression de NIC1 qui persiste suite à une inhibition prolongée de l'endocytose pourrait être dû soit à un blocage incomplet de l'endocytose par la concanavaline A ou encore conséquent d'un clivage du récepteur indépendamment de l'endocytose voire un clivage à la membrane plasmique.

Les études chez la drosophile montrent qu'une activation ligand-indépendante de dNotch se réalise dans les endosomes matures (Hori *et al.*, 2012; Baron, 2012). La concanavaline A bloque l'internalisation et empêche ainsi la maturation des endosomes. Il est difficile de déterminer si, dans notre cas, le clivage de NOTCH1 favorisé par l'endocytose, se fait de manière ligand-dépendante ou –indépendante. L'équipe de C. Brou affirme que l'activation de NOTCH de manière ligand-indépendante n'a jamais été observée chez les mammifères (Moretti & Brou, 2013), mais qu'une activation de NOTCH ligand-dépendante et γ -sécrétase dépendante dans les endosomes serait possible (Gupta-Rossi *et al.*, 2004). Les auteurs ont suggéré les événements séquentiels suivants : suite à sa liaison avec son ligand, le récepteur Notch1 est ubiquitiné sur la lysine 1749 par une ubiquitine ligase encore inconnue, puis il est internalisé par la voie de la clathrine pour favoriser le clivage γ -sécrétase dépendant du récepteur et la libération de Nic1 qui transloque au noyau. Ainsi, l'absence d'ubiquitination sur la K1749 préviendrait le clivage ligand-dépendant de Notch1.

À noter que certaines études contredisent les conclusions apportées par Gupta-Rossi *et al.* (Gupta-Rossi *et al.*, 2004). En effet, le fragment NIC1 ou Nic1 normalement généré débute par une valine, très conservée, en son N-terminal (Schroeter *et al.*, 1998; Tagami *et al.*, 2008). Pour identifier les événements séquentiels, Gupta-Rossi *et al.* avaient généré un mutant Notch1 (LLFF) qui ne serait pas clivé au site habituel S3 puisque la valine et les acides aminés précédents (GCGV) étaient mutés en LLFF. Struhl & Adachi ont montré que la substitution ou la délétion de cette valine de dNotch n'empêche pas le complexe γ -sécrétase de cliver le récepteur dNotch pour libérer dNic (Struhl & Adachi, 2000). Tagami

et al. ont, quant à eux, montré que Nic1 commençant par une valine (Nic1-V) est plus stable (Tagami *et al.*, 2008). En effet, d'après la règle du « N-end rule », les acides aminés valine, méthionine et glycine en N-terminal d'une protéine apportent une plus grande stabilité à celle-ci. La séquence de Nic1 débute par VLLSRKRRR (la lysine présente dans la séquence étant celle ubiquitinée d'après Gupta-Rossi *et al.*). Tagami *et al.* ont démontré par spectrométrie de masse que différents Nic1 étaient générés suite au clivage de Notch1 par le complexe γ -sécrétase: Nic1 commençant par une valine (Nic1-V) et Nic1 avec une sérine en N-terminal (Nic1-S). Après enrichissement de la fraction endosome et membrane plasmique, Nic1-V était majoritairement trouvé dans la fraction de la membrane plasmique et Nic1-S était principalement dans la fraction des endosomes. Suite à la purification de Nic1-V et Nic1-S, les auteurs ont montré que Nic1-V, en plus de sa plus grande stabilité, médie une plus grande activité transcriptionnelle que Nic1-S. Ils ont aussi observé que le taux d'endocytose changeait le ratio de Nic1-V vs. Nic1-S : une diminution de l'endocytose favorisant la formation de Nic1-V. Enfin, ils ont étudié le mutant Notch1 K1749R généré par Gupta-Rossi *et al.*. Ces derniers montraient que ce mutant n'était plus ubiquitiné et moins internalisé ce qui entraînait une inhibition du clivage de ce mutant et une diminution d'expression de Nic1. Or, Tagami *et al.* ont montré que cette mutation K1749R était capable de générer des Nic1, mais très instables, avec en N-terminal des acides aminés comme la leucine, la sérine et l'arginine. Ces résultats signifient que des Nic1 étaient libérés du mutant Notch1 K1749R mais qu'ils n'étaient pas détectés car trop instables. Cette étude remet en cause certaines interprétations de l'étude de Gupta-Rossi *et al.* notamment le choix du mutant K1749R comme modèle d'étude d'activation de Notch1 dans les endosomes. Des études supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer si le transit de Notch1 dans les endosomes peut mener à son clivage de façon ligand-dépendante et/ou ligand-indépendante.

Notre étude ne nous permet pas de distinguer si la liaison d'un ligand à NOTCH1 est requise ou non pour son clivage par des processus endocytiques. Il est cependant à noter que nous avons observé que l'activation ligand-indépendante de NOTCH1 (par traitement à l'EGTA) pouvait générer des NIC1 de faible poids moléculaire particulièrement visualisés suite à l'inhibition du lysosome (Figure 29). D'autre part, la concanavaline A a prévenu partiellement l'apparition de ces NIC1 de faible poids moléculaire (Figure 31) suggérant

que les processus endocytiques sont nécessaires pour générer une fraction du NIC1 libéré de NOTCH1. Ainsi, il est tentant de spéculer que le clivage de NOTCH1 par des processus endocytiques ne requiert pas obligatoirement sa liaison à un ligand.

Il faut se rappeler que le modèle classique d'activation de la voie NOTCH de manière ligand-dépendante est basé sur l'endocytose du ligand transmembranaire suite à sa liaison au récepteur NOTCH. Il est suggéré que la force générée par l'endocytose du ligand entraînerait un changement de conformation de NOTCH qui démasquerait ainsi le site de clivage S2 pour les protéases ADAM puis permettrait subséquemment le clivage par le complexe γ -sécrétase (Musse *et al.*, 2012). Dans notre cas, nous avons inhibé l'endocytose de manière générale et ce, dans toutes les cellules. Ainsi, il est possible que la diminution d'expression de NIC1 observée suivant le traitement à la concanavaleine A soit une conséquence du blocage de l'endocytose des ligands ce qui préviendrait le clivage de NOTCH1.

Puisque nos résultats suggèrent un rôle de l'endocytose dans la régulation de NOTCH1 et qu'il a été suggéré que le transit de Notch1 dans les endosomes pouvait l'envoyer vers les lysosomes (McGill *et al.*, 2009), nous avons vérifié si NIC1 pouvait être dégradé par la voie lysosomale. Nos résultats démontrent que l'inhibition de la dégradation lysosomale ou protéasomale mène à une augmentation des niveaux d'expression de NIC1 suggérant que ce dernier peut être régulé par ces deux voies de dégradation. Pour la première fois, nos résultats ont montré que le NIC1 qui s'accumule suite à l'inhibition de la dégradation lysosomale ou protéasomale était de poids moléculaire différent. Par essais phosphatases, nous avons établi qu'il s'agissait de formes différentiellement phosphorylées de NIC1. Ainsi, nos résultats suggèrent que le NIC1 non phosphorylé est dégradé en empruntant la voie de dégradation lysosomale tandis que le NIC1 phosphorylé est dégradé par le protéasome.

Nous avons voulu vérifier si le NIC1 dégradé dans le lysosome provenait du NOTCH1 internalisé. Nous avons observé que l'inhibition de l'endocytose i) prévenait partiellement l'accumulation de NIC1 non phosphorylé induite par l'inhibition de la dégradation lysosomale et ii) prévenait partiellement l'accumulation de NIC1 phosphorylé induite par l'inhibition du protéasome. De par nos observations, nous pourrions suggérer que les

processus endocytiques permettent le clivage d'une fraction de NOTCH1 et que le NIC1 libéré peut par la suite être ciblé soit à la dégradation lysosomale ou protéasomale. Dans ces expériences, la concanavaline A a été ajoutée simultanément avec le MG132 ou le NH₄Cl. Au moment du traitement, il y avait donc un certain niveau d'expression de NIC1. Il n'est donc pas exclu que l'augmentation (partielle) d'expression de NIC1 observée suite au traitement combiné à la concanavaline A et au MG132 ou NH₄Cl soit conséquent d'une prévention de la dégradation du NIC1 qui avait déjà été libéré avant l'inhibition de l'endocytose. En d'autres mots, il est possible que la prévention partielle par la concanavaline A de l'augmentation de NIC1 induit par le MG132 ou NH₄Cl ne soit pas nécessairement conséquent que d'une contribution partielle de l'endocytose dans la génération de NIC1, mais plutôt le résultat d'un blocage dans la dégradation de NIC1 ayant déjà été libéré avant le début de l'inhibition de l'endocytose. Pour limiter cette possibilité, nous pourrions pré-traiter les cellules à la concanavaline A pendant 4h, soit le temps d'au moins une demi-vie de NIC1 tel qu'estimé par les traitements au DAPT (Figures 10C, 28 et 30B), suivi de traitement pour inhiber les activités protéolytiques du protéasome ou du lysosome par le MG132 ou le NH₄Cl respectivement. Si le pré-traitement à la concanavaline A est plus efficace à prévenir l'augmentation d'expression de NIC1 induit par le MG132 et/ou NH₄Cl, nous pourrions davantage supporter la contribution des processus endocytiques dans l'activation de NOTCH1.

Bien que nos résultats apportent peu de réponses sur le clivage possible du récepteur NOTCH1 dans les endosomes, ils permettent tout de même d'émettre de nouvelles hypothèses. Globalement, nos résultats suggèrent que i) l'endocytose pourrait contribuer au clivage de NOTCH1, ii) qu'une fraction de NIC1 nouvellement libéré n'est pas phosphorylé et est rapidement dégradé via la voie lysosomale, alors iii) qu'une autre fraction de NIC1 subit de multiples phosphorylations, ce NIC1 phosphorylé semble plus stable et emprunte une voie de dégradation protéasomale. Ainsi, nous pouvons maintenant de proposer que ces modifications post-traductionnelles sur NIC1, suite à sa libération de NOTCH1, sont impliquées dans la régulation de la stabilité de NIC1. Nos résultats supportent ceux de la littérature suggérant que la dégradation protéasomale de NIC1 requiert préalablement sa phosphorylation (Oberg *et al.*, 2001; Gupta-Rossi *et al.*, 2001; G. Wu *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2004).

4.2. Le domaine C-terminal de NIC1 est important pour récapituler la signalisation NOTCH1

Une fois libérée de NOTCH1, il a été clairement établi que NIC1 transloque au noyau où, associé avec des partenaires, il reconnaît des séquences promotrices et influence la régulation de gènes. Il est à noter que la régulation de NIC1 depuis sa libération du récepteur NOTCH1 jusqu'à sa dégradation est peu connue. Nos études précédentes ont permis de démontrer que NIC1 subissait une série de modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation, suivant sa libération du récepteur (Tremblay *et al.*, 2013). Par contre, ces sites de phosphorylation n'ont pas encore été identifiés. D'autres études ont également permis de suggérer que NIC1 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que l'hydroxylation, acétylation, méthylation, phosphorylation et ubiquitination (Andersson *et al.*, 2011; Borggreffe *et al.*, 2016). Les sites de ces modifications, les mécanismes et leur rôle demeurent toutefois peu détaillés. Le seul mécanisme presque universellement accepté est la phosphorylation en C-terminal de NIC1, au niveau de son domaine PEST, menant à son ubiquitination puis dégradation protéasomale (Rechsteiner & Rogers, 1996; Oberg *et al.*, 2001; Gupta-Rossi *et al.*, 2001; G. Wu *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2004).

Afin d'étudier vraisemblablement l'impact d'une activation aberrante de Notch1 dans des tissus murins, Murtaugh *et al.* ont généré des souris transgéniques qui présentent une insertion de *Nic1* dans le locus ROSA26 (ROSA^{Nic1}) (Murtaugh *et al.*, 2003). Ce *Nic1* inséré est délété de ses derniers 238 acides aminés en C-terminal. Il est possible que cette délétion d'un si grand nombre d'acides aminés soit pour assurer la délétion du signal de dégradation protéasomale. En effet, la délétion de la partie C-terminale de NIC1 abolirait le signal de dégradation protéasomale puisque l'interaction et l'ubiquitination par FBW7 est perdue. La délétion du domaine C-terminal permettrait ainsi de stabiliser NIC1, sans que cette hypothèse ait toutefois été vérifiée et validée (Rechsteiner & Rogers, 1996; Oberg *et al.*, 2001; Gupta-Rossi *et al.*, 2001; G. Wu *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2004; Weng *et al.*, 2004). Considérant que NIC1 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles dont les sites demeurent à être identifiés et que l'impact fonctionnel de la délétion du domaine C-terminal de NIC1 a été peu détaillé, nous avons généré une version humaine de NIC1

tronqué de ses derniers 255 acides aminés (NIC1dC). Ce GFP-NIC1 tronqué correspond au Nic1 exprimé dans les souris ROSA^{Nic1} suivant la recombinaison. Nous avons évalué l'expression, la régulation et la fonction de ce GFP-NIC1dC pour savoir s'il pouvait récapituler NIC1.

Nos résultats ont montré que GFP-NIC1dC est plus fortement exprimé que GFP-NIC1. Cependant, cette plus forte expression de GFP-NIC1dC ne se traduit pas par une plus forte expression des gènes cibles de la voie NOTCH et ne confère pas non plus une plus grande capacité aux cellules U2OS de croître en indépendance d'ancrage comparativement aux cellules qui expriment GFP-NIC1.

4.2.1. La délétion du domaine C-terminal de GFP-NIC1 stabilise la protéine

L'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC dans les cellules U2OS FT nous a permis d'observer une plus grande expression de GFP-NIC1dC que de GFP-NIC1. L'avantage de l'insertion ciblée d'une seule copie du gène à un site d'intégration unique transcriptionnellement actif des cellules parentales U2OS FT ne nous a pas permis d'obtenir un niveau d'expression de GFP-NIC1dC comparable à GFP-NIC1. Cette information suggérait que cette différence d'expression n'était pas due à une variation du site ou du nombre de sites d'intégration. Nous avons donc postulé que la raison de cette différence d'expression de GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC était la stabilité différente de GFP-NIC1 vs. GFP-NIC1dC. Nos expériences ont permis d'estimer la demi-vie de GFP-NIC1 à 1h tandis que celle de GFP-NIC1dC est supérieure à 8h. La même expérience dans les MIA PaCa-2 nous a montré que la demi-vie de NIC1 endogène est similaire au GFP-NIC1 soit d'environ 2h. Ainsi, la délétion du domaine C-terminal de NIC1 prolonge sa demi-vie telle que suggérée par certaines études (Weng *et al.*, 2004; Oberg *et al.*, 2001; Gupta-Rossi *et al.*, 2001; G. Wu *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2004).

La plus grande stabilité de GFP-NIC1dC n'est pas étonnante puisque dans la partie C-terminale de NIC1 se trouve le domaine PEST, signal de dégradation protéasomale. En accord, nos résultats ont montré que ce NIC1 tronqué de sa partie C-terminale n'est plus dégradé par le protéasome. Ainsi, nos résultats supportent ceux de la littérature suggérant que la partie C-terminale de NIC1 est importante puisqu'elle régule la stabilité de NIC1

(Oberg *et al.*, 2001; Gupta-Rossi *et al.*, 2001; G. Wu *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2004). Sachant que le domaine C-terminal de NIC1 est responsable de son interaction avec l'ubiquitine ligase FBW7, il serait intéressant de vérifier si la perte de ce domaine abolit effectivement l'ubiquitination de NIC1dC par FBW7. La surexpression ou non de l'ubiquitine étiquetée HA et/ou de FBW7 dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC induites pourrait être effectuée pour tester si GFP-NIC1dC est moins ubiquitiné que GFP-NIC1 suivant la surexpression de FBW7.

4.2.2. Impact potentiel de la délétion du domaine C-terminal de NIC1 sur la signalisation CSL-dépendante et CSL-indépendante

Ensuite, nous avons voulu vérifier si les forts niveaux d'expression de GFP-NIC1dC comparativement à GFP-NIC1 corrélaient avec une signalisation NOTCH plus importante. En accord avec les niveaux protéiques, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC sont capables d'induire significativement l'activité HES1-luciférase protéiques dans les cellules U2OS (Figures 14 et 16). Cependant, dans les cellules MIA PaCa-2, l'induction significative d'HES1-luciférase est assurée seulement par GFP-NIC1. Il est à noter que nous n'observons pas de différence significative entre l'induction d'HES1-luciférase apportée par GFP-NIC1 et celle apportée par GFP-NIC1dC. Quant à l'expression protéique, GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC sont tous les 2 capables d'induire l'expression d'HES1 dans les cellules MIA PaCa-2 même si la capacité de NIC1dC à induire l'expression d'HES1 semble plus faible. Ainsi, nos résultats démontrent qu'une stabilité plus grande de GFP-NIC1dC n'induit pas une plus grande transcription des gènes cibles de la voie NOTCH.

Il faut toutefois noter que nos résultats reflètent seulement l'impact de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC sur la transcription d'un gène cible : *HES1*. Nous avons tenté d'analyser l'expression protéique d'autres cibles connues de la voie NOTCH telles que C-MYC et CYCLINE D1 (Tremblay *et al.*, 2013). Cependant, leur faible niveau d'expression dans les cellules U2OS ne nous a pas permis de révéler des variations d'expression suite à l'induction de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC (résultats non montrés). Dans les cellules MIA PaCa-2, malgré que GFP-NIC1dC fût moins compétent que GFP-NIC1 à induire l'expression d'HES1, une différence d'expression protéique de C-MYC ou CYCLINE D1 induite par GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC est moins évidente à apprécier (Figure 16). Les

résultats de RT-PCR nous ont révélé d'autres gènes cibles pouvant être modulés par GFP-NIC1 et non par GFP-NIC1dC (Figure 15) tels que *NOTCH4* et *HEY2* mais à ce jour, le manque d'anticorps validés ne nous a pas permis de confirmer ces résultats au niveau protéique.

Il est à noter que nous avons également analysé la transcription NIC1-dépendante en utilisant le gène rapporteur CSL-luciférase. Nous avons observé dans les cellules U2OS et MIA PaCa-2 que GFP-NIC1 est beaucoup plus compétent à promouvoir l'activité sur le gène rapporteur CSL-luciférase que GFP-NIC1dC. Ces résultats sont quelque peu différents des observations de Weng *et al.* qui ont utilisé un NOTCH1 muté dans son domaine hétérodimérisation (nommé N1LP) et/ou tronqué de 85 acides aminés en C-terminal (N1LPdeltaP) (Weng *et al.*, 2004). Cette mutation dans le domaine d'hétérodimérisation permet d'activer NOTCH1 voire entraîne son clivage de façon constitutive libérant ainsi un NIC1 (suite au clivage de N1LP) et un NIC1deltaP (suite au clivage de N1LPdeltaP) terminant au résidu 2471. Les auteurs ont démontré que l'expression de N1LPdeltaP augmentait l'activité CSL-luciférase de 20 à 40 fois comparativement à N1LP qui l'augmente de 3 à 10 fois. Malgré que l'expression et/ou la stabilité du NIC1deltaP vs. NIC1 libéré ne soient pas montrées dans ce papier, les résultats de Weng *et al.* suggèrent qu'une délétion en C-terminal de NIC1 favorise son activité transcriptionnelle. Il faut cependant noter que notre mutant NIC1dC a une délétion plus grande de sa partie C-terminale que le mutant N1LPdeltaP dans le but de correspondre au Nic1 exprimé dans les souris ROSA^{Nic1} suivant recombinaison et initialement générées pour étudier l'impact de l'activation de la voie Notch1 dans l'homéostasie tissulaire (Murtaugh *et al.*, 2003). En effet, notre NIC1dC correspond aux acides aminés 1754-2301 vs. le NIC1deltaP obtenu suivant le clivage du mutant N1LPdeltaP correspond aux acides aminés 1754-2471. Ainsi, nous ne pouvons exclure que la région 2301-2471 de NIC1 contienne des sites de régulation pouvant expliquer l'apparente différence entre l'activité transcriptionnelle d'un NIC1 tronqué de ces 85 vs. 255 acides aminés en C-terminal.

Ainsi, malgré un plus fort niveau d'expression de GFP-NIC1dC, nos résultats n'ont pas démontré que GFP-NIC1dC médiait une plus forte activité transcriptionnelle que GFP-NIC1. Ces observations sont en accord avec ceux de Gerhardt *et al.* (Gerhardt *et al.*, 2014).

En effet, ils ont démontré qu'un mutant de Nic1 délété de ses acides aminés 2193 à 2396 en C-terminal (Nic1^{Δ2193-2396}) était plus fortement exprimé que Nic1, mais qu'il était moins apte que Nic1 à augmenter l'expression des ARNm des gènes cibles de la voie NOTCH tels qu'*Hes1* de par sa plus faible capacité à lier les régions promotrices d'*Hes1*. Finalement, la génération de souris knock-in leur a permis de suggérer que les acides aminés 2193 à 2396 de Notch1 ne sont pas essentiels à sa fonction mais pourrait jouer un rôle en augmentant ou facilitant l'expression de certains gènes cibles.

Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC sont capables de moduler l'expression de certains gènes cibles de manière similaire alors que d'autres gènes cibles pourraient être influencés différemment. Nos résultats montrent également que le contexte cellulaire pourrait être important. En effet, alors que GFP-NIC1dC est capable de promouvoir l'activité HES1-luciférase dans les cellules U2OS, il semble sans impact sur l'activité HES1-luciférase dans les cellules MIA PaCa-2. De plus, GFP-NIC1dC augmente significativement l'activité du gène rapporteur HES1-luciférase dans les cellules U2OS, mais est incapable d'induire l'activité du gène-rapporteur CSL-luciférase dans cette même lignée cellulaire.

Une raison pouvant expliquer l'impact différentiel de GFP-NIC1dC sur HES1-luciférase vs. CSL-luciférase pourrait être la disposition des sites de liaison de CSL au niveau de ces promoteurs. En effet, CSL-luciférase contient un promoteur synthétique avec 4 répétitions du site de liaison de CSL de haute affinité orienté en « tête à queue ». Quant au gène rapporteur HES1-luciférase, il s'agit d'un fragment du promoteur endogène d'*HES1* qui contient des sites de liaison de CSL très conservés et appelés SPS (Su(H) Paired Sites). Ils sont en paires et inversés dans le sens « tête à tête », séparés par 15-19 nucléotides et situés proche du promoteur proximal, dans les 5kb du site d'initiation de la transcription (Figure 6) (Ong *et al.*, 2006; H. Liu *et al.*, 2010; Arnett *et al.*, 2010). Ong *et al.* ont montré que le promoteur d'*Hes1* répond à des doses plus faibles de Nic1 comparé aux promoteurs qui ne contiennent pas de site SPS comme le promoteur d'*Hes5*, un autre gène cible de la voie NOTCH. Une autre étude montre que le site SPS permet une dimérisation du complexe transcriptionnel ternaire Nic1/CSL/Maml1 via les répétitions ankyrines (ANK) de Nic1 (Nam *et al.*, 2007; H. Liu *et al.*, 2010; Arnett *et al.*, 2010). Le

domaine ANK étant conservé dans GFP-NIC1dC, il est probable que GFP-NIC1dC puisse toujours se dimériser avec NIC1 endogène ou avec lui-même pour favoriser la transcription d'*HES1* via le site SPS. Malgré tout, nous ne pouvons pas exclure que les éléments de réponse et/ou la disposition des sites de liaison CSL au niveau du promoteur explique pourquoi GFP-NIC1dC serait apte à moduler HES1-luciférase mais non CSL-luciférase.

Il est à noter que plusieurs autres gènes cibles de la voie NOTCH comme *C-MYC*, *CUL1*, *pTa* possèdent ce site SPS. Dans les leucémies T-ALL, il a été montré que la dimérisation du complexe transcriptionnel ternaire Nic1/CSL/Maml1 à ces sites SPS était importante pour la transformation des cellules T tandis que le complexe transcriptionnel ternaire Nic1/CSL/Maml1 en monomère, comme sur le promoteur d'*Hey1* et de *Cd25*, était important pour le destin des cellules T (H. Liu *et al.*, 2010; Arnett *et al.*, 2010). La perte du pouvoir de dimérisation de Nic1 prévient le développement des leucémies T-ALL induites par Notch1 dans les souris et réduit la prolifération et la survie des lignées cellulaires T-ALL (Nam *et al.*, 2007). De plus, l'échec de la dimérisation de Nic1 empêche l'activation de la transcription de *c-Myc* qui est un évènement critique dans les leucémies T-ALL puisque sa réexpression permet un sauvetage phénotypique (H. Liu *et al.*, 2010). L'avantage de ces dimérisations du complexe Nic1/CSL/Maml1 serait de générer des nouveaux sites de liaison pour des facteurs de transcription, de recruter plus efficacement des facteurs de transcription basaux, de déplacer plus efficacement les répresseurs et/ou d'augmenter la liaison de CSL à l'ADN. Donc, il est possible que le complexe NIC1dC/CSL/MAML1 soit capable de se dimériser sur ces sites SPS comme le montre la transcription d'*HES1*, mais la perte du domaine C-terminal pourrait abolir ces nouveaux sites de liaison pour d'autres facteurs de transcription.

Un autre aspect qui pourrait expliquer cette différence de pouvoir transcriptionnel entre GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC est la localisation subcellulaire. Les études sur la voie NOTCH ont permis de démontrer que le fragment intracellulaire NIC s'associe avec CSL et MAML1 pour former la plateforme transcriptionnelle NIC/CSL/MAML1 dans le noyau (Kovall & Hendrickson, 2004; Jeffries *et al.*, 2002; Nam *et al.*, 2003; Friedmann *et al.*, 2008). Ainsi, nous pouvons nous demander si GFP-NIC1dC se localise au noyau et s'il forme toujours un complexe transcriptionnel ternaire avec CSL et MAML1. Nos résultats

ont montré que GFP-NIC1dC était apte à se localiser au noyau et donc une incapacité de GFP-NIC1dC à transloquer au noyau ne semble pas expliquer les impacts sur l'expression des gènes cibles de la voie NOTCH. Cependant, il est vrai qu'une plus forte proportion de GFP-NIC1dC est retrouvée dans le cytoplasme comparativement à GFP-NIC1. Bien que GFP-NIC1 possède 2 signaux de localisation nucléaire (NLS) bipartites et que notre délétion de la partie C-terminale de NIC1 ne devrait pas toucher aux NLS, il se pourrait que GFP-NIC1dC ait un problème de transport : soit d'import nucléaire soit d'export nucléaire à cause d'un défaut de signal perdu par l'absence du domaine C-terminal.

Les mécanismes menant à la localisation nucléaire de NIC1 ainsi qu'à son intégration dans un complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1 actif ne sont pas encore bien définis. Le modèle classique propose que la formation du complexe NIC1/CSL/MAML1 s'établisse au noyau (Figures 3-5) (L. Wu *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 2006; Wilson & Kovall, 2006; Friedmann *et al.*, 2008) alors que d'autres études suggèrent que l'assemblage du complexe NIC1/CSL/MAML1 pourrait s'initier au niveau du cytoplasme (Krejci & Bray, 2007; Vasquez-Del Carpio *et al.*, 2011; Jeffries *et al.*, 2002). Dans le cas où NIC1 doit s'associer avec un de ses partenaires CSL et/ou MAML1 dans le cytoplasme avant de transloquer au noyau, il se pourrait, dans notre modèle, qu'il y ait un problème de saturation des partenaires. En effet, puisque GFP-NIC1dC est exprimé plus fortement, il est possible que le manque de protéines CSL et/ou MAML1 libres prévienne la translocation nucléaire de toutes les protéines GFP-NIC1dC. À noter cependant que le fractionnement subcellulaire montre que la distribution de MAML1 et CSL est majoritairement nucléaire en présence de GFP-NIC1 et de GFP-NIC1dC (Figure 17) suggérant que l'association au cytoplasme de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC avec CSL et/ou MAML1 ne serait pas un préalable à sa localisation nucléaire.

De plus, certaines études suggèrent que la localisation cytoplasmique de NIC1 favoriserait le signal NOTCH CSL-indépendant (Romain *et al.*, 2001; Perumalsamy *et al.*, 2009; S. Jin *et al.*, 2013). Dans notre fractionnement subcellulaire, une plus grande proportion de GFP-NIC1dC vs. GFP-NIC1 a été retrouvée dans le cytoplasme, pouvant appuyer que GFP-NIC1dC pourrait conduire à un signal NOTCH CSL-indépendant plus important. Malgré quelques connaissances, les mécanismes de régulation des cibles de

NOTCH de manière CSL-indépendante restent peu connus (Martinez Arias *et al.*, 2002; Sanalkumar *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2016). Par exemple, dans le cancer du sein, NIC1 augmente l'expression d'IL6 à travers l'effecteur de la voie NF κ B, IKK (I κ B kinase) par des mécanismes encore inconnus mais qui sont indépendants de la liaison de CSL à l'ADN (S. Jin *et al.*, 2013). Des études montrent que la signalisation NOTCH CSL-indépendante dépendrait des niveaux d'expression de DELTEX (Veeraraghavalu *et al.*, 2005; Romain *et al.*, 2001). Veeraraghavalu *et al.* ont montré que pour certaines réponses cellulaires, la signalisation NOTCH passerait par DELTEX et non par CSL. En effet, l'expression d'un dominant-négatif de CSL n'interfère pas avec la motilité des cellules du cancer du col utérin induite par l'activation de la signalisation NOTCH. À l'inverse, l'expression d'un dominant-négatif de DELTEX1 prévient l'augmentation de la motilité de ces cellules et le nombre de colonies formées en agar mou promu par l'activation de la signalisation NOTCH (Veeraraghavalu *et al.*, 2005). Dans notre modèle, il n'est pas exclu que NIC1dC puisse également influencer la transcription CSL-indépendante (Martinez Arias *et al.*, 2002; Sanalkumar *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2016).

Enfin, nos résultats démontrant qu'une diminution de la quantité de GFP-NIC1dC au noyau ne peut pas expliquer ses impacts sur son pouvoir transcriptionnel, nous nous sommes alors interrogés si la formation du complexe transcriptionnel ternaire NIC1dC/CSL/MAML1 était possible. Les expériences d'immunoprécipitation montrent que GFP-NIC1dC et GFP-NIC1 sont capables de lier CSL et MAML1. Étant donné les niveaux d'expression différents de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC, il est difficile de conclure sur l'efficacité de la liaison de GFP-NIC1 vs. GFP-NIC1dC à MAML1 et CSL. L'association de GFP-NIC1dC avec CSL et MAML1 n'est pas si étonnante puisque GFP-NIC1dC présente toujours ses domaines d'interaction connus avec ces protéines (Nam *et al.*, 2006; Wilson & Kovall, 2006).

4.2.3. Rôles potentiels des modifications post-traductionnelles dans la régulation de NIC1

Nos résultats ont clairement démontré que l'expression plus importante de GFP-NIC1dC comparativement à GFP-NIC1 ne se traduisait ni en une expression plus forte des cibles de la voie NOTCH testées ni en une plus grande capacité des cellules à croître en

indépendance d'ancrage. La délétion du domaine C-terminal de NIC1 semble donc avoir un impact fonctionnel. Le plus faible niveau de phosphorylation de GFP-NIC1dC comparativement à GFP-NIC1 que nous avons observé pourrait suggérer une contribution de cette modification post-traductionnelle dans la régulation de la fonction de NIC1. À noter que nos résultats sont en accord avec ceux de Gupta-Rossi *et al.* qui montrent que, contrairement à Nic1, un Nic1 délété en C-terminal de 349 acides aminés n'est plus phosphorylé au cours du temps (Gupta-Rossi *et al.*, 2001).

La littérature montre qu'il existe une coopération entre les voies NOTCH et KRAS/RAF/MEK/ERK (De La *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2008). Dans notre laboratoire, nous avons montré que la voie MEK/ERK était capable de promouvoir la signalisation NOTCH (Tremblay *et al.*, 2013). En effet, dans les cellules pancréatiques tumorales humaines MIA PaCa-2, l'activation de la voie MEK/ERK favorise la phosphorylation de NIC1 et promeut l'expression protéique des cibles de la voie NOTCH telles que HES1 et C-MYC. Ces résultats supportent donc une régulation de NIC1 par la voie MEK/ERK. À noter qu'il reste à être démontré si les ERK régulent directement ou indirectement NIC1. Néanmoins, puisque dans le laboratoire il avait été observé que la voie MEK/ERK promeut la phosphorylation de NIC1 (Tremblay *et al.*, 2013) et que nous notions une diminution des niveaux de phosphorylation de GFP-NIC1dC, nous avons vérifié si les ERK avaient le même impact sur GFP-NIC1dC vs. GFP-NIC1 dans les cellules U2OS. Nos résultats suggèrent que la voie MEK/ERK influence seulement les niveaux d'expression de GFP-NIC1 et demeure sans impact sur l'expression de GFP-NIC1dC suggérant que le domaine C-terminal pourrait être requis pour la régulation ERK-dépendante de NIC1.

Cependant, les sites de phosphorylations au niveau du domaine C-terminal de NIC1 n'ont pas été identifiés. L'analyse des résultats de spectrométrie de masse ne nous a malheureusement pas permis de les identifier. Dans le cadre de notre étude, nous avons remarqué que le domaine C-terminal de NIC1 n'était pas riche en résidus lysine et arginine. Cette information est importante puisque nous avons utilisé la trypsine pour générer les peptides à être analysés par spectrométrie de masse suivant l'immunoprécipitation de NIC1. Or, la trypsine clive en C-terminal d'un résidu lysine ou arginine. Ainsi, aucun peptide correspondant à la partie C-terminale de NIC1 n'a pu être identifié par spectrométrie de

masse et nous n'avons pu analyser les sites potentiels de phosphorylation dans cette région. De plus, nos expériences en spectrométrie de masse n'étaient pas dans les conditions favorables pour identifier des sites potentiels de phosphorylation par les ERK puisque nous n'avions pas activé la voie MEK/ERK.

Bien que la phosphorylation puisse expliquer la régulation différentielle de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC, d'autres modifications post-traductionnelles pourraient y contribuer. Une étude intéressante a montré que la méthylation pouvait influencer le potentiel transcriptionnel de NIC1. En effet, Hein *et al.* ont généré un mutant de Nic1 murin déficient en méthylation sur 5 arginines (R2253, R2262, R2303, R2317, R2361) situées en C-terminal de Nic1 (5RA) (Hein *et al.*, 2015). À noter que 3 de ces arginines sont délétés dans notre mutant GFP-NIC1dC. Tout comme notre GFP-NIC1dC, ils ont observé que le mutant Nic1 5RA était beaucoup plus stable que Nic1 mais qu'il n'activait pas beaucoup plus la transcription en utilisant un gène-rapporteur CSL-luciférase. Dans notre étude, nous avons initialement attribué la plus grande stabilité de GFP-NIC1dC à la perte du domaine PEST. Cependant, le mutant Nic1 5RA d'Hein *et al.* possède encore le domaine PEST mais il ne peut plus être méthylé dans sa région C-terminale. Ces données suggèrent que des modifications post-traductionnelles, dont la méthylation, dans la région C-terminale de NIC1 seraient importantes pour moduler la stabilité de NIC1 mais également pour favoriser son potentiel transcriptionnel. Combinés à nos observations, ces résultats suggèrent que malgré que la région C-terminale de NIC1 contienne des sites de régulation pour sa stabilité protéique, cette région serait également importante pour contrôler la transcription. Il est important de souligner que les résultats de Hein *et al.* ainsi que les nôtres démontrent clairement qu'une stabilité plus grande de NIC1 ne corrèle pas avec une activité transcriptionnelle plus importante. À partir de leur étude, Hein *et al.* ont proposé un intéressant modèle mathématique qui suggère que Nic1 mène à une forte réponse transcriptionnelle mais de courte durée tandis que leur mutant de Nic1 5RA apporte une réponse transcriptionnelle de moins forte intensité mais de plus longue durée. Leur modèle mathématique suggère que l'amplitude et la durée de la réponse NOTCH assurent une transcription séquentielle et organisée des gènes cibles. Ce modèle mathématique s'intègre parfaitement à nos résultats, mais il reste à être prouvé. L'analyse temporelle des transcrits exprimés suite à l'induction de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC dans nos modèles U2OS

permettrait d'évaluer dans le temps les niveaux d'expression des différents ARNm et permettrait de valider si ce modèle est cohérent avec nos observations.

4.2.4. La délétion de la partie C-terminale de NIC1 module ses partenaires d'interaction

Il a été proposé que NIC1 puisse recruter des partenaires différents selon le promoteur lié (Yatim *et al.*, 2012). Nos résultats de spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence que le domaine C-terminal de NIC1 était important pour le choix de ses partenaires d'interaction (Tableaux 10-14). En effet, nous avons identifié 28 protéines dans le lysat total et 9 partenaires nucléaires qui se liaient avec GFP-NIC1 et non avec GFP-NIC1dC. À l'inverse, nous avons observé que 231 protéines dans le lysat total et 284 dans la fraction nucléaire interagissaient uniquement avec GFP-NIC1dC. Il est donc plausible que le recrutement différentiel de partenaires par GFP-NIC1 vs. GFP-NIC1dC influence l'activité du complexe transcriptionnel dans lequel il est intégré et module ainsi la réponse cellulaire.

Nos analyses en spectrométrie de masse révèlent que GFP-NIC1 mais non GFP-NIC1dC s'associe fortement avec NOTCH2. Plusieurs études montrent une dimérisation de NIC1 avant ou après liaison à l'ADN (Nam *et al.*, 2007; Arnett *et al.*, 2010; Ong *et al.*, 2006; H. Liu *et al.*, 2010; Vasquez-Del Carpio *et al.*, 2011). Certaines études proposent que NIC1 et NIC2 puissent dimériser car leurs structures sont semblables. Ainsi, puisque NOTCH2 n'a pas été retrouvé en association avec GFP-NIC1dC, il semble que le domaine C-terminal de NIC1 puisse être requis pour l'interaction avec NIC2. Nous avons tenté de vérifier par immunoprécipitation cette hétérodimérisation NIC1/NIC2 dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC ainsi que dans les cellules HEK293T transfectées avec GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de détecter une interaction avec NIC2, cette hypothèse d'hétérodimérisation n'a donc pu être confirmée. De meilleurs anticorps anti-NIC2 devront être obtenus afin de confirmer ou exclure définitivement l'hypothèse que seul GFP-NIC1 et non GFP-NIC1dC interagit avec NIC2.

Vasquez-Del Carpio *et al.* ont suggéré que le dimère NIC1/NIC1 permettrait de recruter des co-facteurs additionnels, tel SKIP, pour coordonner l'assemblage d'une

plateforme transcriptionnelle (Vasquez-Del Carpio *et al.*, 2011). Dans l'avenir, il serait intéressant d'évaluer si un dimère NIC1/NIC2 pourrait diversifier le recrutement des partenaires pour éventuellement former un complexe transcriptionnel distinct ce qui permettrait d'expliquer l'occupation différentielle du complexe NIC1/CSL/MAML1 au niveau de différents promoteurs dépendamment des protéines additionnelles qui sont associées à ce complexe ternaire.

En plus de NOTCH2 (voire NIC2), les expériences de spectrométrie de masse nous ont permis d'identifier UTP3 (ou SAS10 = something about silencing protein 10) et CNOT1 (CCR4-NOT transcription complex subunit 1) comme protéines potentielles interagissant exclusivement avec NIC1. Ces 2 protéines sont prometteuses car elles ont été proposées pour jouer un rôle dans la régulation génique. À notre connaissance, aucune étude ne montre une interaction de NIC1 avec ces 2 protéines. UTP3/SAS10 a été découverte en 1998 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Kamakaka & Rine, 1998). UTP3/SAS10 est suggéré pour avoir un homologue chez la souris et l'homme grâce au marqueur de séquence exprimée (EST) provenant de bibliothèques d'ADNc. Néanmoins, nous n'avons pas trouvé d'études réalisées avec l'homologue UTP3/SAS10 humain ou murin. Chez la levure, UTP3/SAS10 est exclusivement nucléaire. Cette protéine jouerait un rôle dans la prolifération cellulaire puisque la déplétion d'UTP3/SAS10 entraîne un arrêt du cycle cellulaire. De plus, l'expression forcée d'UTP3/SAS10 permet de dé-réprimer l'expression de certains gènes. Les auteurs suggèrent qu'UTP3/SAS10 puisse interagir avec des histones, moduler leur profil d'acétylation et ainsi modifier la structure de la chromatine. Après confirmation de l'interaction NIC1-UTP3/SAS10, il serait donc intéressant de vérifier si UTP3/SAS10 module le niveau d'acétylation des histones particulièrement au niveau des gènes modulés par GFP-NIC1 vs. GFP-NIC1dC.

Une autre protéine d'intérêt issue de notre analyse de spectrométrie de masse est CNOT1. Cette protéine est la plus large sous-unité du complexe CCR4-NOT et il s'agit d'une protéine d'échafaudage sur laquelle les autres membres du complexe CCR4-NOT se lient (Winkler *et al.*, 2006; Collart, 2016). CCR4-NOT a été découvert chez l'homme en 2000 par homologie avec la version de la levure (Albert *et al.*, 2000). Les fonctions de CCR4-NOT sont nombreuses comme par exemple : permettre le recrutement des histones

acétyltransférases pour assurer l'accès de l'ARN polymérase II sur l'ADN et initier la transcription, lier certains facteurs de transcription pour réprimer la transcription, impliquer dans l'élongation des transcrits et dans la dégradation des ARNm (Collart, 2016). En effet, CNOT1 joue un rôle dans la dégradation des ARNm en contrôlant la taille de la queue poly(A) par dé-adénylation (Collart, 2016). CNOT1 peut aussi inhiber la transcription. Il a été démontré que la liaison de CNOT1 au récepteur à l'œstrogène ER α réprime la transcription des gènes cibles de ce récepteur nucléaire (Winkler *et al.*, 2006). Les auteurs proposent une répression de la transcription par recrutement d'histones désacétylases par CNOT1. Encore une fois, l'identification de CNOT1 lors de l'analyse par spectrométrie de masse des partenaires d'interaction de GFP-NIC1 suggère que NIC1 pourrait recruter des partenaires qui modulent les niveaux d'acétylation des histones et ainsi influencer l'expression génique. Il serait intéressant d'abord de confirmer par co-immunoprécipitation l'interaction de CNOT1 avec GFP-NIC1 et non avec GFP-NIC1dC dans les cellules U2OS. Si tel est le cas, l'impact de la déplétion de CNOT1 sur l'activité transcriptionnelle induite par NIC1 pourrait être vérifié à l'aide de nos gènes-rapporteurs mesurant l'activité transcriptionnelle NOTCH-dépendante.

Si nous confirmons l'interaction de NIC1 ou du complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 avec UTP3/SAS10 et/ou CNOT1, ces résultats apporteraient quelques données supplémentaires sur les facteurs qui forment la machinerie transcriptionnelle spécifique sur les promoteurs des gènes cibles de la voie NOTCH.

En ce qui concerne GFP-NIC1dC, nous avons constaté qu'il interagit avec un plus grand nombre de protéines que GFP-NIC1 (Figure 20 et tableaux 13 et 14). L'expression plus stable de GFP-NIC1dC et sa distribution au cytoplasme n'excluent pas que l'interaction ne soit pas spécifique comme par exemple avec les protéines régulant la traduction (voir Annexes). Parmi les partenaires fortement associés à GFP-NIC1dC, nous avons identifié β -CATÉNINE et LRRFIP2, 2 acteurs de la voie WNT/ β -CATÉNINE. Des études montrent que les voies NOTCH et WNT peuvent s'influencer sans en connaître les mécanismes. Cependant, l'issue fonctionnel de cette coopération est controversée, probablement parce que NIC1 peut interagir avec les différents composants de la voie WNT/ β -CATÉNINE. Dans la voie WNT canonique, la liaison d'un ligand WNT à un

récepteur FRIZZLED favorise le recrutement de DISHEVELLED au récepteur pour prévenir la dégradation de la β -CATÉENINE. Stabilisée, une quantité suffisante de β -CATÉENINE peut alors se retrouver au noyau où, en association avec TCF/LEF, il y a modulation de l'expression génique (Giles *et al.*, 2003). Le gène rapporteur TOP-FLASH-luciférase est régulièrement utilisé pour évaluer l'activité du complexe β -CATÉENINE/TCF/LEF.

Chez la drosophile, dNic interagit avec Dishevelled via son domaine C-terminal ce qui favorise une transcription CSL-dépendante (Axelrod *et al.*, 1996; Romain *et al.*, 2001). Il a été suggéré que la perte du domaine C-terminal de dNic entraîne une perte d'interaction avec Dishevelled et induit alors une transcription dNic-dépendante qui est CSL-indépendante et Deltex-dépendante (Romain *et al.*, 2001).

Des études ont également montré une possible interaction entre NIC1 et β -CATÉENINE pour favoriser l'activation de la transcription CSL-dépendante (Gekas *et al.*, 2016; S. Jin *et al.*, 2013). La surexpression du facteur de transcription LEF1 abolit cette interaction NIC1/ β -CATÉENINE ce qui a pour conséquence de diminuer l'activité CSL-luciférase (Y. H. Jin *et al.*, 2009). Une autre étude a montré l'interaction de NIC1 avec LEF1 (dont l'activité peut être indépendante de β -CATÉENINE) menant à une activation CSL-indépendante et β -CATÉENINE-indépendante des gènes transcrits par le facteur de transcription LEF1 (Ross & Kadesch, 2001). En accord avec l'étude précédente (Y. H. Jin *et al.*, 2009), LEF1 abolit l'interaction NIC1/ β -CATÉENINE pour probablement se lier avec NIC1 et activer la transcription de ses cibles sans son interaction avec β -CATÉENINE. De plus, l'étude de Ross & Kadesch montre que NIC1 peut également potentialiser l'activité de TCF1 (dont l'activité est dépendante de β -CATÉENINE) entraînant une activation CSL-indépendant des gènes cibles de la voie WNT/ β -CATÉENINE (Ross & Kadesch, 2001). Dans leur ensemble, les données de la littérature suggèrent une association possible de NIC1 avec des joueurs connus impliqués dans la régulation de la voie WNT/ β CATÉENINE. Ces interactions pourraient à la fois moduler la signalisation NOTCH et la signalisation WNT/ β CATÉENINE.

Nos analyses de spectrométrie de masse nous montrent une plus forte interaction GFP-NIC1dC/ β -CATÉENINE suggérant que la perte du domaine C-terminal de NIC1 favorise

son interaction avec la β -CATÉNINGINE. En effet, selon nos résultats de spectrométrie de masse, l'interaction de GFP-NIC1 avec β -CATÉNINGINE est possible mais elle est plus faible qu'avec GFP-NIC1dC et elle n'a donc pas été sélectionnée dans nos analyses de ratio supérieur ou égal à 2 (M/L (indicateur de l'interaction GFP-NIC1/ β -CATÉNINGINE) = 1.5 vs H/L (interaction GFP-NIC1dC/ β -CATÉNINGINE) = 3). L'interaction de GFP-NIC1dC et GFP-NIC1 avec la β -CATÉNINGINE reste cependant à être confirmée par co-immunoprécipitation. Si tel est le cas, nous pouvons nous demander si l'interaction NIC1dC/ β -CATÉNINGINE ne favoriserait pas la transcription des gènes cibles de la voie WNT/ β -CATÉNINGINE. Nous pourrions vérifier cette hypothèse en vérifiant l'impact de l'expression de GFP-NIC1dC vs. GFP-NIC1 sur l'activité du gène rapporteur TOP/FLASH-luciférase.

Nos analyses de spectrométrie de masse mettent également en lumière une forte interaction de GFP-NIC1dC avec LRRFIP2. Cette protéine a été identifiée en 2004 chez l'homme et elle interagit avec DISHEVELLED (J. Liu *et al.*, 2005). Il a été suggéré que LRRFIP2 agit comme un modulateur positif de la signalisation WNT (J. Liu *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2017). Lorsqu'associé à DISHEVELLED, LRRFIP2 permettrait de stabiliser la β -CATÉNINGINE (J. Liu *et al.*, 2005) pour favoriser l'activité TOP/FLASH-luciférase (J. Liu *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2017). La forte interaction de GFP-NIC1dC avec LRRFIP2 et avec β -CATÉNINGINE pourrait suggérer que ce complexe influence la signalisation WNT. Il serait donc intéressant de tester si GFP-NIC1dC et/ou GFP-NIC1 module l'activité du gène-rapporteur TOP/FLASH-luciférase. Cette expérience nous donnerait des pistes sur les mécanismes pouvant contribuer à la coopération complexe entre ces deux voies, NOTCH et WNT/ β -CATÉNINGINE, importantes au cours du développement embryonnaire et dans les processus associés à la tumorigenèse.

4.2.5. La délétion du domaine C-terminal influence la réponse cellulaire médiée par NIC1

Nos résultats ont permis de démontrer que, malgré son plus faible niveau d'expression, GFP-NIC1 a un plus grand potentiel à promouvoir la croissance en indépendance d'ancrage des cellules U2OS. Cela suggère que les changements qui s'opèrent suivant l'expression de GFP-NIC1 et non de GFP-NIC1dC sont plus susceptibles d'engendrer des changements dans la capacité des cellules à croître en agar mou. L'équipe de Capobianco avait

également noté que l'expression d'un NIC1 délété de ses acides aminés 2202-2555 (NIC1d2202) a une plus forte expression que NIC1 mais médie une plus faible activité transcriptionnelle que NIC1 et n'est pas aussi compétent que NIC1 à promouvoir la formation de colonies en agar mou (Vasquez-Del Carpio *et al.*, 2011; Jeffries & Capobianco, 2000). L'étude publiée par Hein *et al.* montrait que la perte de méthylation de 5 arginines dans la région contenant les résidus 2253-2361 promeut la stabilité de Nic1 sans promouvoir son activité transcriptionnelle telle que mesurée par essais luciférase (Hein *et al.*, 2015). Cette étude a également démontré que l'injection *in vivo* de l'ARNm d'un Notch1 constitutif actif (N1dE) causait des défauts développementaux importants chez le xénope et le poisson zèbre alors que l'incidence de ces défauts était beaucoup plus faible lorsque l'ARNm d'un N1dE dont les 5 arginines ne pouvant plus être méthylés (N1dE 5RA) avait été injecté. Ainsi, il semble clair que la région C-terminale de NIC1 contient des sites de régulation importants qui influencent la réponse cellulaire médiée par NIC1. Par conséquent, il est fort probable que la délétion du domaine C-terminal de NIC1, stratégie utilisée lors de la génération des souris ROSA^{Nic1}, ne permette pas de récapituler adéquatement l'impact d'une activation de la voie NOTCH1. Certaines données de la littérature ainsi que nos résultats démontrant le plus faible potentiel de NIC1dC à promouvoir la croissance en agar mou des cellules U2OS supportent clairement cette hypothèse.

Malgré que nous ayons démontré que la perte du domaine C-terminal ne permette plus de récapituler la réponse cellulaire médiée par NIC1, nous n'avons pas été en mesure d'identifier le(s) mécanisme(s) responsable(s) ou des cibles potentielles. En effet, la cible la plus évidente HES1, témoin de l'activation de la voie NOTCH, est exprimée à des niveaux comparables suite à l'expression de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC. HES1 a été montré pour être important pour la prolifération cellulaire puisqu'il réprime l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p57 dans les cellules progénitrices pancréatiques (Georgia *et al.*, 2006). Il a également été montré qu'Hes1 jouait un rôle important dans le développement et le maintien des leucémies T-ALL chez la souris (Wendorff *et al.*, 2010). Nos résultats suggèrent que l'augmentation d'expression d'HES1 suivant l'induction de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC n'est pas suffisante à elle seule à promouvoir la croissance en indépendance

d'ancrage dans notre modèle U2OS. Ce résultat nous suggère qu'HES1 n'est probablement pas le seul acteur en jeu pour promouvoir la croissance en indépendance d'ancrage.

Pour le moment, il est difficile de postuler quant aux joueurs participant avec NIC1 à la promotion de la croissance en indépendance d'ancrage. Certaines études montrent que la coopération de la signalisation NOTCH avec d'autres voies de signalisation est requise pour promouvoir la tumorigenèse. Par exemple, la signalisation NOTCH promeut le développement de lésions pré-néoplasiques initiées par l'oncogène Kras dans l'épithélium pancréatique murin (De La *et al.*, 2008). Dans les kératinocytes humains, il a été montré que NIC1 coopère avec les oncogènes E6/E7 et la signalisation PI3K pour favoriser la transformation cellulaire (Lathion *et al.*, 2003). Ainsi, il est possible que la perte du domaine C-terminal de NIC1 interfère avec sa capacité à interagir avec certains partenaires ce qui influence son potentiel à coopérer avec d'autres voies de signalisation pour favoriser des processus associés à la transformation cellulaire. Il est intéressant de noter que dans l'étude de Lathion *et al.*, ils ont démontré que l'expression d'un NIC1 exogène sous le contrôle d'un promoteur faible n'influence pas le phénotype des cellules du cancer du col utérin qui expriment déjà E6/E7 et des niveaux endogènes de NIC1. Cependant, l'expression d'un NIC1 exogène sous le contrôle d'un promoteur fort diminue la synthèse d'ADN et l'expression des oncogènes du papillomavirus humain E6 et E7 (Lathion *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent que les niveaux d'expression de NIC1 sont importants pour la réponse cellulaire et notamment pour la transformation cellulaire.

Il est important de souligner que ce n'est pas la seule étude qui suggère que les niveaux d'expression de NIC1 ne corrént pas avec l'intensité du phénotype. En effet, dans les cellules de cancer du sein, les résultats obtenus par Mazzone *et al.* leur ont permis de proposer qu'à faible intensité, la signalisation NOTCH1 promeut la prolifération alors qu'une forte intensité du signal NOTCH1 favorise la différenciation luminale (Mazzone *et al.*, 2010). Au cours du développement, la force du signal NOTCH semble contrôler le destin des cellules de l'endothélium hémogénique (Gama-Norton *et al.*, 2015). En effet, il a été montré que les cellules endothéliales recevant un fort signal Notch1 adoptent un programme de différenciation artérielle alors qu'un faible signal Notch1 est permissif pour leur spécification vers la lignée hématopoïétique. Ainsi, ces données de la littérature

montrent l'importance de la force du signal de NOTCH1 pour la réponse cellulaire à la fois dans le développement et dans les pathologies comme le cancer. Ces résultats suggèrent clairement que l'expression de NIC1 ne corrèle pas nécessairement avec l'intensité de la réponse cellulaire.

En terminant, il est important de rappeler que des souris exprimant un *Nic1* tronqué en C-terminal ($ROSA^{Nic1}$) ont été générées. Plusieurs groupes ont exploitées ce modèle de souris transgénique afin d'examiner l'impact de l'activation de Notch1 dans de nombreux tissus comme par exemple le pancréas, le muscle et les tissus adipeux. Nous avons étudié la version humaine de ce *Nic1*, NIC1dC. Il est à noter que ce mutant NIC1dC n'est pas retrouvé dans les cancers solides bien que quelques mutations dans le gène de *NOTCH1* ont été identifiées et pourraient mener à l'expression d'un NIC1 tronqué comparable à notre NIC1dC (Wang *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2004; Feldman *et al.*, 2000; Hoemann *et al.*, 2000). Nous avons observé que la perte de ce domaine C-terminal de NIC1 augmentait sa stabilité, ce que nous supposons être le but de la délétion en C-terminal de *Nic1* chez les souris $ROSA^{Nic1}$. Cependant, nous avons remarqué que la délétion de la partie C-terminale de NIC1 réduisait fortement les modifications post-traductionnelles notamment les phosphorylations. Nous avons vu que les modifications post-traductionnelles pourraient contribuer aux différents aspects de la régulation de NIC1 : sa stabilité et/ou son activité transcriptionnelle (Hein *et al.*, 2015; Tremblay *et al.*, 2013; Borggreffe *et al.*, 2016). GFP-NIC1dC interagissait toujours avec ses partenaires du complexe transcriptionnel ternaire CSL et MAML1. Toutefois, par spectrométrie de masse, nous soupçonnons que GFP-NIC1dC ne s'associe plus avec les mêmes partenaires que GFP-NIC1, ce qui pourrait moduler la régulation génique ou qui pourrait changer la coopération avec les autres voies de signalisation. En effet, de nombreuses voies de signalisation ont été identifiées dans le cancer pancréatique pouvant suggérer une coopération entre elles (Jones *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2017). Des études montrent une coopération de la voie NOTCH avec la voie KRAS/RAF/MEK/ERK (De La *et al.*, 2008; Tremblay *et al.*, 2013) et avec la voie canonique de NF- κ B (Maniati *et al.*, 2011). Il est plus difficile de montrer la coopération des voies NOTCH et WNT/ β -CATÉNINE dans le cancer pancréatique mais elle a été montrée dans le cancer colorectal (Fre *et al.*, 2009). Une conclusion qui se dégage de notre étude et des études citées ci-haut qui supportent un rôle du domaine C-terminal dans la

réponse cellulaire de NIC1 est que la réponse du signal NOTCH ne semble pas dépendre des niveaux d'expression de NIC1. En effet, malgré que les niveaux d'expression de GFP-NIC1dC fussent supérieurs à ceux de GFP-NIC1, GFP-NIC1dC n'était pas plus compétent que GFP-NIC1 à induire une activité transcriptionnelle au niveau de cibles connus NOTCH-dépendant. De plus, comparativement à GFP-NIC1, GFP-NIC1dC n'a eu que peu d'impact sur la capacité des cellules U2OS à former des colonies en agar mou. Par conséquent, le domaine C-terminal de NIC1 semble important pour contrôler la réponse cellulaire de NOTCH1. Il serait intéressant de tester si la perte du domaine C-terminal de NIC1 module la réponse cellulaire en influençant la durée et l'amplitude de la réponse transcriptionnelle. En conclusion, nous pouvons dire que NIC1dC ne phénocopie pas NIC1 et qu'il faut probablement revisiter les conclusions faites à partir des expériences exploitant le modèle de souris ROSA^{Nic1}.

4.3. NIC1, un acteur pivot dans la régulation de son partenaire d'interaction MAML1

MAML1 a longtemps été considéré comme un simple partenaire transcriptionnel de la voie NOTCH. En effet, la présence de MAML1 est importante dans le complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 pour activer la transcription des gènes cibles de la voie NOTCH. Des études démontrent que l'absence de MAML1 dans le complexe transcriptionnel ternaire par liaison compétitive du peptide SAHM1 (Moellering *et al.*, 2009) ou un dominant négatif de MAML1 (L. Wu *et al.*, 2000; Weng *et al.*, 2003) empêche la transcription des gènes cibles de la voie NOTCH. MAML1 ne serait pas qu'un simple partenaire passif de NIC1 (L. Wu & Griffin, 2004; McElhinny *et al.*, 2008; Kitagawa, 2016). Il permettrait entre autres de recruter d'autres partenaires tels que des histones acétylases (p300) (Fryer *et al.*, 2002; Wallberg *et al.*, 2002) ou des kinases (CDK8) (Fryer *et al.*, 2004) au complexe NIC1/CSL/MAML1 afin d'en moduler son activité transcriptionnelle. Malgré l'importance de MAML1 au sein de la plateforme transcriptionnelle NIC1/CSL/MAML1, peu d'études ont été entreprises pour caractériser sa régulation.

De façon intéressante, nous avons observé que la demi-vie de MAML1 est plus courte dans les cellules U2OS GFP-NIC1 que dans les cellules U2OS GFP-NIC1dC. À l'opposé

de NIC1, nos résultats suggèrent que la stabilité de MAML1 ne serait pas sous le contrôle du protéasome ni dans les cellules U2OS GFP-NIC1 ni dans les cellules U2OS GFP-NIC1dC. Nos résultats préliminaires montrent que l'expression de MAML1 augmente suite à l'inhibition de la dégradation lysosomale par un traitement à la bafilomycine A dans les cellules U2OS GFP-NIC1 mais pas dans les cellules U2OS GFP-NIC1dC (résultats non montrés). Ainsi, nous montrons pour la première fois que la stabilité de MAML1 est modulée par la présence ou non du domaine C-terminal de NIC1 et que MAML1 n'est pas dégradé par le protéasome mais semblerait être dégradé par le lysosome. Malheureusement, nous n'avons pas trouvé dans la littérature des évidences suggérant une régulation de la stabilité d'un facteur de transcription par la voie de dégradation lysosomale. Sasaki *et al.* ont suggéré aussi que MAML1 pourrait être dégradé par le lysosome sans fournir plus d'information (Sasaki *et al.*, 2011). Ils ont découvert que le facteur de transcription Mesp2 réprimait le signal NOTCH en déstabilisant Mam1 lors de la somitogenèse chez la souris. Dans un modèle cellulaire, la surexpression de MESP2 diminuait l'expression protéique de MAML1 sans diminuer les transcrits de *MAML1*. Ils ont démontré que l'expression protéique de MAML1 n'augmentait pas suite à l'inhibition de la dégradation protéasomale. Ils ont alors postulé une possible dégradation lysosomale de MAML1 sans toutefois démontrer cette hypothèse. Malgré que les auteurs proposent cette hypothèse dans leur discussion, ils ne semblaient pas y croire puisqu'ils mentionnaient que cette voie de dégradation est surtout associée au trafic des endosomes. Cependant, une autre voie peut mener à la dégradation lysosomale : l'autophagie (Jegga *et al.*, 2011; Levine, 2005). Il s'agit d'un processus de dégradation du contenu intracellulaire (Levine, 2005; Ravikumar *et al.*, 2009). Il existe différents types d'autophagie dont l'autophagie associée aux protéines chaperonnes, qui permet le transport sélectif de protéines vers l'intérieur des lysosomes. p62/SQSTM1 est une protéine chaperonne qui reconnaît des protéines polyubiquitinées (Zaffagnini & Martens, 2016). Il se pourrait que p62 puisse faire le pont entre MAML1 et les autophagosomes. Pour vérifier cela, il faudrait d'abord vérifier si MAML1 est ubiquitiné puis s'il peut lier p62. De plus, nous pourrions vérifier la localisation, par immunofluorescence, de MAML1 à savoir s'il peut se retrouver au niveau d'autophagosomes et/ou des lysosomes.

En plus d'influencer la stabilité de MAML1, nous avons régulièrement constaté que l'expression de GFP-NIC1 et non GFP-NIC1dC induisait un retard sur gel de MAML1. Nos résultats ont permis de mettre en évidence que l'expression de GFP-NIC1 et non GFP-NIC1dC mène à la phosphorylation de MAML1. NIC1 n'ayant pas d'activité kinasique, il se pourrait que la présence du domaine C-terminal de NIC1 permette le recrutement d'une kinase qui phosphorylerait MAML1. Il reste à démontrer si MAML1 est effectivement phosphorylé sur un motif S/T-P tel que suggéré avec l'anticorps anti-MPM2.

Nous avons remarqué que seul GFP-NIC1 et non GFP-NIC1dC est détecté suivant l'immunoprécipitation avec l'anticorps MPM2. Il serait donc tentant de postuler, qu'advenant la possibilité que MAML1 ne soit pas phosphorylé sur motif S/T-P, que NIC1 est une protéine phosphorylée sur motif S/T-P et associé à MAML1. Pour vérifier cela, il sera encore une fois déterminant de d'abord immunoprécipiter GFP-NIC1, GFP-NIC1dC, MAML1 et de vérifier s'il s'agit de protéines phosphorylées sur motif S/T-P et détectables avec l'anticorps MPM2.

Il existe peu d'études sur les modifications post-traductionnelles de MAML1 et surtout sur la régulation de ces modifications. Des études montrent l'ubiquitination (Farshbaf *et al.*, 2015), la sumoylation (Lindberg *et al.*, 2010), l'acétylation (Saint Just Ribeiro *et al.*, 2007) de MAML1 et une seule étude mentionne la phosphorylation de MAML1 par la kinase GSK3 (Saint Just Ribeiro *et al.*, 2009). Nos expériences avec l'inhibiteur de GSK3 n'ont pu confirmer cette régulation de la phosphorylation de MAML1 par GSK3. Dans le but d'identifier une kinase régulant MAML1, nous nous sommes aidés du logiciel NetPhos ainsi que de nos résultats de spectrométrie de masse pour déterminer des sites potentiels de phosphorylation de MAML1. Nos expériences avec des inhibiteurs de kinases sélectionnés, nous ont permis de découvrir que PKC, Cdc2 ou CDK5 pourraient influencer la phosphorylation de MAML1.

En somme, nos résultats ont permis de démontrer que la perte du domaine C-terminal de NIC1, non seulement influence la régulation de NIC1, mais régule la dynamique du complexe NIC1/CSL/MAML1. En effet, pour la première fois, nous démontrons que la présence du domaine C-terminal de NIC1 est requise pour médier la phosphorylation du partenaire MAML1. Dans l'avenir, il sera intéressant de déterminer les mécanismes de

régulation de cette phosphorylation de MAML1 en plus d'en étudier les impacts fonctionnels sur le complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1 et sur la réponse cellulaire NOTCH-dépendante.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La voie NOTCH est une voie de signalisation simple puisqu'elle ne contient pas d'intermédiaire pour amplifier le signal. En effet, son activation résulte de la libération de la partie intracellulaire du récepteur NOTCH1, NIC1, qui lui-même transloque au noyau pour activer la transcription en se liant à ses partenaires CSL et MAML1. Ceci nécessite alors une régulation fine pour que la voie NOTCH puisse être activée dans les bonnes conditions afin de médier une réponse cellulaire adéquate. Dans le cas contraire, une activation aberrante de la signalisation NOTCH a pour effet d'amener à diverses pathologies comme le cancer. Des études dont la nôtre montrent que ces mécanismes de régulation sont beaucoup plus complexes qu'anticipé.

D'abord, il existe une controverse sur le lieu de clivage des récepteurs NOTCH. Chez la drosophile, il a été montré que le récepteur dNotch peut être clivé à la membrane plasmique et/ou au niveau des endosomes (Struhl & Adachi, 2000; Sorensen & Conner, 2010; Gupta-Rossi et al., 2004; Baron, 2012; Hori et al., 2012; Moretti & Brou, 2013). Chez les mammifères, il existe très peu d'études sur une possible activation des récepteurs NOTCH dans les endosomes. La difficulté venant probablement des différentes isoformes des récepteurs NOTCH et des divers composants qui constituent les différentes voies d'endocytose. Dans notre étude, nous avons suggéré que le clivage du récepteur NOTCH1 pouvait se faire à la fois à la membrane plasmique et dans les endosomes puisque l'inhibition de l'endocytose abolit partiellement l'expression de NIC1. Dans l'avenir, il sera intéressant de déterminer si NIC1 issue du clivage de NOTCH1 à la membrane plasmique et/ou dans les endosomes peut subir des modifications post-traductionnelles différentes ou favoriser des interactions protéiques différentes. Il sera également important de vérifier si le NIC1 issu de processus endocytiques peut intégrer le complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 afin de moduler l'expression génique des cibles de la voie NOTCH. Ces informations pourraient aider à mieux comprendre la régulation de NIC1 ainsi que son potentiel à activer la transcription de gènes différents et à moduler différentes réponses cellulaires selon le contexte. Cependant, il n'est pas exclu que dans notre cas, l'inhibition

de l'endocytose inhibe à la fois l'endocytose des ligands et des récepteurs. L'endocytose des ligands a été plus étudié et est nécessaire, selon le modèle classique, pour générer une force mécanique qui révèle le premier site de clivage du récepteur suite à la liaison du ligand et du récepteur (D'Souza et al., 2010).

Nos résultats sur l'endocytose du récepteur NOTCH1 n'ont pas pu mettre clairement en évidence l'activation possible de NOTCH1 dans les endosomes, mais ils montrent que NIC1, le fragment intracellulaire actif de NOTCH1, subit de nombreuses modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation. La délétion du domaine C-terminal de NIC1 (NIC1dC) diminue la plupart des phosphorylations sur NIC1 suggérant que NIC1 est majoritairement phosphorylé au niveau de son domaine C-terminal. De plus, nous avons montré que le domaine C-terminal pourrait être requis pour la régulation ERK-dépendante de NIC1. Il serait alors intéressant d'identifier des sites susceptibles d'être phosphorylés par les ERK sur NIC1. Pour ce faire, nous avons procédé à des analyses par NetPhos. Les résidus S2492, S2513, T2497, T2511 et la séquence WSSSSP (résidues 2520-2525) sont des sites potentiels de phosphorylation particulièrement par les ERK. Ces sérines et thréonines de NIC1 ont été mutées de façon à abolir la phosphorylation en les substituant en alanine ou, de manière à mimer la phosphorylation, en les substituant en aspartate. Les mutants ont été générés, leur expression vérifiée et ils sont prêts à être testés. Suite à l'activation de la voie MEK/ERK, nous pourrions vérifier l'absence de retard sur gel des mutants en alanine qui montrerait que ces sites de NIC1 sont phosphorylés par les ERK. Ensuite, nous pourrions tester la stabilité des mutants de NIC1, leur localisation subcellulaire, leur pouvoir transcriptionnel, leur capacité à interagir avec des partenaires identifiés par spectrométrie de masse suite à l'activation ou non de la voie MEK/ERK. À noter que les sites T2511 et S2513 sont particulièrement intéressants car ces 2 sites font parties du phosphodégron que l'ubiquitine ligase FBW7 reconnaît pour ubiquitiner NIC1 et le cibler à la dégradation protéasomale (O'Neil *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2007). D'un autre côté, il a été décrit que la phosphorylation de NIC1 sur la T2511 est reconnue par la prolyl-isomérase PIN1 et que PIN1 est impliqué dans la stabilisation de NIC1 (Rustighi *et al.*, 2014). À noter que PIN1 reconnaît des sites phospho-S/T-P (Yaffe *et al.*, 1997). Le motif S/T-P correspond au site consensus minimal de phosphorylation par les ERKs. Donc, nous pouvons nous demander si la phosphorylation par les ERK sur la T2511 de NIC1

permet le recrutement de PIN1 et favorise la stabilisation de NIC1. De plus, nous pouvons nous questionner s'il pourrait y avoir compétition entre PIN1 et FBW7 pour reconnaître NIC1 phosphorylé sur la T2511.

La phosphorylation de NIC1 pourrait jouer un rôle sur sa liaison avec des partenaires. En effet, dans nos analyses de spectrométrie de masse, nous avons observé que la délétion du domaine C-terminal de NIC1 modifiait son interaction avec certains partenaires. Ceci pourrait suggérer que le domaine C-terminal de NIC1 joue un rôle important dans l'association de NIC1 avec ses partenaires. Ceci pourrait être régulé par la perte de phosphorylation due à la perte du domaine C-terminal de NIC1 ou du moins à une perte de modifications post-traductionnelles sur ce domaine de NIC1. Après identification et confirmation d'une ou des protéines qui se lient à NIC1 au niveau du domaine C-terminal (donc qui ne se lient pas à NIC1dC), nous pourrions vérifier si la phosphorylation de NIC1 joue un rôle dans son interaction avec ce nouveau partenaire.

Dans le but d'identifier un spectre plus large d'interacteurs de NIC1 et NIC1dC, nous pourrions exploiter l'approche BioID (proximity-dependent biotin identification) (Roux *et al.*, 2012). En effet, les analyses en spectrométrie de masse ont été effectuées suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC. Ainsi, les protéines identifiées reflètent leur interaction à GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC au moment de la lyse cellulaire. Or, nos connaissances nous laissent présager que l'association et dissociation des partenaires d'interaction de NIC1, et possiblement NIC1dC, est très dynamique. Cette méthode, BioID, est basée sur la fusion d'une protéine biotine ligase BirA à nos protéines d'intérêt soient NIC1 et NIC1dC. En supplémentant le milieu de culture en biotine, l'activité biotine ligase de BirA permettrait de biotinyler les protéines interagissant avec BirA-NIC1 et BirA-NIC1dC ainsi que les protéines à proximité. Il se formerait donc un gradient de biotinylation : les protéines les plus proches de BirA-NIC1 et BirA-NIC1dC seraient beaucoup plus biotinylées que les protéines plus éloignées. La purification des protéines biotinylées serait réalisée par des billes couplées à la streptavidine qui a une très grande affinité pour la biotine. En couplant la méthode SILAC et la stratégie BioID, il serait possible d'identifier l'ensemble des candidats qui interagissent et/ou qui ont été à proximité de NIC1 et NIC1dC. Ces expériences nous permettraient, d'une part, de mieux définir

l'interactome de NIC1. Les partenaires d'interaction de NIC1 étant peu connus, leur identification contribuerait à l'avancement de nos connaissances sur la régulation de la voie NOTCH puisque nos résultats suggèrent que les protéines qui se joignent au complexe NIC1/CSL/MAML1 ou NIC1dC/CSL/MAML1 pourraient différer et possiblement influencer différemment la régulation génique. D'autre part, l'identification en parallèle de l'interactome de NIC1dC nous permettrait possiblement de cibler plus rapidement des candidats qui, lorsqu'intégré à un complexe NIC1-dépendant, induisent, entre autres, un programme transcriptionnel qui favorise la croissance en indépendance d'ancrage des cellules U2OS. Il serait alors intéressant de tester si ces candidats confèrent également des avantages pour la transformation de cellules normales ou pour supporter le statut transformé de cellules tumorales.

Nous avons aussi observé que NIC1dC était plus exprimé que NIC1 car il est plus stable et moins dégradé par le protéasome. Cependant, cette plus forte expression de NIC1dC ne corrèle pas avec un plus fort pouvoir transcriptionnel. L'impact différentiel de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC sur des gènes-rapporteurs NOTCH-dépendant combiné à l'observation que GFP-NIC1dC ne promeut pas au même titre que GFP-NIC1 la croissance en indépendance d'ancrage suggèrent que GFP-NIC1dC pourrait activer des gènes différents de GFP-NIC1 ou seulement un certain groupe de gènes, entre autres ceux qui possèdent le site SPS comme *HES1*. Il serait alors intéressant de voir si GFP-NIC1dC est capable d'activer la transcription d'autres gènes qui possèdent des sites SPS comme *C-MYC* ou *CUL1*. De plus, il serait intéressant de répertorier l'ensemble des gènes cibles modulés par GFP-NIC1dC vs. GFP-NIC1 dans les U2OS par séquençage des ARN et d'identifier les séquences d'ADN reconnues par le complexe formé par GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC (ChIP-seq) afin de pouvoir classifier les gènes cibles de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC selon les éléments de réponse reconnus.

Dans l'avenir, il sera important de connaître le répertoire des gènes cibles de la voie NOTCH. Peu de gènes sont connus à ce jour, mais des analyses génomiques montrent des cibles nombreuses et diverses (Krejci *et al.*, 2009). De plus, de nouvelles techniques ont permis de révéler que la translocation nucléaire de NIC se produisait dans les minutes suivant le clivage du récepteur NOTCH. Également, il a été proposé que les différentes

cibles de la voie NOTCH sont activées avec différentes cinétiques et/ou différentes forces de signal (Housden *et al.*, 2013). Ainsi, les cibles ont pu être classées en 3 grands groupes : 1) les cibles transcrites tôt, 2) les cibles transcrites plus tardivement et 3) les cibles sous-régulées (régulateurs négatifs). Les auteurs ont mis en évidence une boucle de régulation entre ces 3 groupes : les gènes cibles transcrits tôt comme les gènes de la famille HES, qui sont des répresseurs, inhibent les régulateurs négatifs, ce qui permet de soulever la répression sur les gènes cibles du groupe 3). Les auteurs ont également montré que la force du signal plus importante de dNotch induisait une plus forte expression des cibles transcrites tôt mais pas celle transcrites tardivement, probablement car ces dernières sont des cibles indirectes. Il se pourrait que GFP-NIC1dC ne soit capable d'activer que certaines de ces cibles ou des cibles que d'un certain groupe. L'analyse temporelle du transcriptome de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC serait intéressante afin de mieux comprendre la dynamique transcriptionnelle de GFP-NIC1 vs. GFP-NIC1dC. Nos modèles inductibles d'expression de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC constituent des outils de choix qui permettraient cette analyse.

Ensuite, nous avons montré que NIC1dC se localisait au noyau et s'associait avec ses partenaires MAML1 et CSL pour former le complexe transcriptionnel ternaire comme NIC1, ce qui n'explique pas l'activité transcriptionnelle plus faible de NIC1dC malgré sa plus forte expression. Cependant, il serait intéressant de vérifier si le complexe NIC1dC/CSL/MAML1 lie l'ADN et s'il est actif transcriptionnellement. En effet, une étude démontre que la phosphorylation de Nic1 par la caséine kinase 2 (CK2) entraîne une dissociation du complexe transcriptionnel ternaire de l'ADN et diminue la transcription des gènes cibles de la voie NOTCH. Malgré cette dissociation de l'ADN, les protéines Nic1, CSL et Maml1 sont toujours retrouvées en complexe (Ranganathan *et al.*, 2011). Cette étude nous suggère donc qu'une association NIC1(NIC1dC)/CSL/MAML1 n'est pas garant de l'efficacité transcriptionnelle. Par conséquent, il serait intéressant de savoir si le complexe NIC1dC/CSL/MAML1 est lié à l'ADN et s'il est actif en immunoprécipitant la chromatine (ChIP) et en analysant le recrutement de l'ARN polymérase II au niveau des promoteurs des gènes cibles connus du complexe NIC1/CSL/MAML1. Nous pourrions réaliser un ChIP dans nos modèles U2OS en immunoprécipitant GFP-NIC1dC et GFP-NIC1 puis amplifier par PCR la région promotrice contenant le/les sites de liaison à CSL des gènes cibles de NOTCH tels qu'*HES1* et *C-MYC*. Ensuite, nous pourrions vérifier si

l'ARN polymérase II est présente au niveau de ses promoteurs et sous sa forme active en utilisant un anticorps contre la phosphorylation des sérines 2 ou 5. Nous pourrions également faire un ChIP reChIP en immunoprécipitant une première fois l'ARN polymérase II active grâce à l'anticorps dirigé contre la phosphorylation des sérines 2 ou 5 puis immunoprécipiter de nouveau avec l'anticorps GFP pour reconnaître NIC1dC et NIC1 et amplifier par PCR la région promotrice CSL-dépendant de gènes cibles de NOTCH. Ces expériences nous permettraient d'évaluer si GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC i) ont le même potentiel à s'associer au niveau de certains promoteurs connus, ii) sont capables de recruter l'ARN polymérase II et iii) sont associées avec la forme active de l'ARN polymérase II au niveau de région promotrice contenant des éléments de réponse CSL.

Cette plus grande expression de NIC1dC pourrait expliquer sa plus grande distribution dans le cytoplasme par rapport à NIC1 s'il y a un problème de saturation des partenaires qui limite la translocation nucléaire de NIC1dC. Cette localisation inhabituelle de NIC1dC pourrait aussi expliquer son interaction non spécifique avec de nombreuses protéines liées à la traduction, par exemple. Cette distribution cytoplasmique importante de NIC1dC pourrait également suggérer la piste de signalisation CSL-indépendante par interaction avec des protéines appartenant à d'autres voies de signalisation comme β -CATÉNINE. En effet, la littérature suggère que NIC1 localisé dans le cytoplasme favorise une signalisation NOTCH CSL-indépendante. De plus chez la drosophile, il a été suggéré que CSL et Deltex sont en compétition pour la liaison au domaine ANK de dNic : l'association de dNic à CSL médiant des effets CSL-dépendant et l'association dNic à Deltex menant à des effets CSL-indépendant (Romain *et al.*, 2001). Les auteurs ont montré que la liaison de Dishvelled au niveau du domaine PEST en C-terminal de dNic promeut l'association dNic-CSL au détriment de l'association dNic-Deltex menant ainsi à un déséquilibre dans les effets CSL-dépendant et -indépendant de dNic. Ainsi, la perte du domaine C-terminal de dNic (de 114 acides aminés) entraîne une perte de liaison avec Dishvelled, favorise l'association avec Deltex et favorise la voie CSL-indépendante (Romain *et al.*, 2001). Ainsi, dans notre modèle, il serait intéressant de comparer la capacité de GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC à interagir avec CSL, DELTEX et DISHVELLED. Advenant que les observations faites chez la drosophile soient similaires chez les mammifères, la perte du domaine C-terminal de NIC1 pourrait réduire l'interaction avec DISHVELLED et défavoriser l'interaction

NIC1dC-CSL au profit de l'interaction NIC1dC-DELTEX. Par conséquent, la signalisation NOTCH CSL-indépendante pourrait dominer la signalisation NOTCH CSL-dépendante dans les cellules exprimant NIC1dC. À l'inverse, l'interaction NIC1-DISHVELLED pourrait favoriser la signalisation CSL-dépendante dans les cellules U2OS GFP-NIC1. Pour vérifier cette possibilité, il serait intéressant de tester si la diminution d'expression de DISHVELLED (shDSH) dans les cellules U2OS GFP-NIC1 augmente l'interaction NIC1-DELTEX et réduit l'activité du gène rapporteur CSL-luciférase. Cette hypothèse que la perte du domaine C-terminal de NIC1 module le ratio signalisation CSL-dépendante et -indépendante demeure toutefois à être validée. Puisque les quelques données de la littérature suggèrent que NIC médie des effets CSL-dépendant et CSL-indépendant (Martinez Arias *et al.*, 2002; Sanalkumar *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2016), un changement dans le ratio entre les effets CSL-dépendant et -indépendant joue possiblement un rôle dans la réponse cellulaire médiée par GFP-NIC1 vs. GFP-NIC1dC.

Bien que nos résultats issus des essais luciférase avec le gène rapporteur CSL-luciférase suggèrent que GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC n'ont pas le même potentiel à influencer la signalisation CSL-dépendante, il serait également intéressant de démontrer que la signalisation CSL-dépendante est effectivement impliquée dans la réponse cellulaire médiée par GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC. Nous pourrions, par exemple, limiter la signalisation CSL-dépendante en sur-exprimant un dominant négatif de CSL (CSL-DN comme le CSL R218H) (S. Jin *et al.*, 2013) ou un shARN dirigé contre CSL. Il serait alors intéressant d'en mesurer l'impact sur la croissance en agar mou des cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC. Si la signalisation CSL-dépendante requiert le domaine C-terminal de NIC1 et est impliquée dans la réponse cellulaire, seules les cellules U2OS GFP-NIC1 devraient être affectées par l'abrogation de CSL.

En somme, il serait important dans l'avenir d'évaluer l'impact de GFP-NIC1 vs. GFP-NIC1dC sur la transcription NOTCH CSL-dépendante et -indépendante. Il serait fort intéressant de procéder à l'analyse des promoteurs liés par GFP-NIC1, GFP-NIC1dC et CSL par CHIP-seq. Combinée au séquençage des ARN exprimés suite à l'induction de GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC, ces expériences nous permettraient de répertorier les gènes modulés par GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC qui sont sous le contrôle ou non d'éléments de

réponse CSL. Ces résultats pourraient nous informer sur la possible contribution et/ou le ratio de la signalisation CSL-dépendante et -indépendante dans les cellules U2OS selon la présence ou non du domaine C-terminal de NIC1.

Notre étude a également montré pour la première fois que MAML1 est une protéine phosphorylée et que la phosphorylation requiert la présence du domaine C-terminal de NIC1. En effet, nous avons observé que MAML1 était phosphorylé en présence de NIC1 et non en présence de NIC1dC. Ceci pourrait aussi expliquer pourquoi NIC1dC n'est pas capable d'activer la transcription de tous les gènes cibles comme NIC1. La phosphorylation de MAML1 pourrait recruter des partenaires spécifiques qui moduleraient l'activité du complexe NIC1/CSL/MAML1. Réaliser une expérience de spectrométrie de masse pour identifier les partenaires d'interaction de MAML1 dans les cellules U2OS GFP-NIC1 vs. GFP-NIC1dC pourrait révéler des protéines distinctes. Pour cela, nous pourrions faire de la protéomique quantitative (SILAC) sur les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC qui exprimeraient de façon stable MAML1 étiqueté autre que GFP de façon à l'immunoprécipiter. L'identification de partenaires différents de MAML1 lorsqu'associés à GFP-NIC1 ou GFP-NIC1dC, pourrait nous donner des pistes pour l'identification de nouveaux régulateurs du complexe NIC1/CSL/MAML1. Compte tenu que GFP-NIC1 promeut davantage la croissance en indépendance d'ancrage que GFP-NIC1dC, il est possible que ces nouveaux régulateurs soient associés à une régulation du complexe NIC1/CSL/MAML qui favorise une réponse cellulaire qui soutient la transformation cellulaire.

Évidemment, ces partenaires identifiés seront à confirmer par immunoprécipitation de MAML1 dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC pour montrer qu'ils interagissent avec MAML1. Il serait également important de vérifier que cette interaction du partenaire identifié avec MAML1 joue un rôle dans l'activation de la transcription. Pour cela, nous pourrions procéder à des ChIP afin d'évaluer la liaison à la chromatine du partenaire identifié en association avec le complexe NIC1/CSL/MAML1 ou NIC1dC/CSL/MAML1. Nous pourrions immunoprécipiter le partenaire identifié avec un anticorps spécifique avant d'amplifier par PCR une région promotrice des gènes cibles de NOTCH dans les cellules U2OS GFP-NIC1 et GFP-NIC1dC. Pour aller plus loin et

montrer que la transcription est active, nous pourrions faire un ChIP reChIP en insérant une étape d'immunoprécipitation de l'ARN polymérase II active avec l'anticorps dirigé contre la phosphorylation de la sérine 2 ou de la sérine 5 de l'ARN polymérase II. Nous pourrions également évaluer l'impact de la diminution d'expression de ce nouveau partenaire (ex. via shARN) de MAML1 sur l'activation de la transcription par essais luciférase en utilisant le gène rapporteur CSL-luciférase. L'identification de nouveaux partenaires d'interaction de MAML1, qui sont peu nombreux à ce jour, permettrait d'augmenter nos connaissances sur MAML1 en plus de donner des pistes sur les protéines participant à la régulation génique sous le contrôle du complexe NIC1/CSL/MAML1.

Notre étude montre également que les modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation, sont très importantes non seulement pour NIC1 mais également pour MAML1. Nos résultats suggèrent que MAML1 pourrait être phosphorylé par PKC, Cdc2 et CDK5. Bien que ces résultats restent à confirmer, il en demeure pas moins que MAML1 est phosphorylée et que l'identification de ces sites de phosphorylation sera importante. Dans ce but, nous pourrions enrichir les peptides phosphorylés suite au traitement des cellules U2OS GFP-NIC1 avec les inhibiteurs de PKC, Cdc2 ou CDK5 afin de les analyser par spectrométrie de masse grâce à l'utilisation des micro-colonnes de dioxyde de titane (TiO_2) (Dunn *et al.*, 2010). Nous pourrions combiner cette stratégie à une approche de protéomique quantitative afin d'identifier des résidus de MAML1 régulés par phosphorylation. Ces sites de phosphorylation pourront être confirmés en générant des mutants de MAML1 qui abolissent la phosphorylation ou qui miment la phosphorylation. Il serait alors intéressant d'analyser l'impact de ces mutations sur les niveaux de phosphorylation de MAML1, sur la stabilité de MAML1, sur ses interactions avec ses partenaires NIC1 et CSL ainsi que sur l'activité des gènes-rapporteurs CSL-luciférase et HES1-luciférase. Il est possible que MAML1 phosphorylé joue un rôle dans le recrutement d'autres partenaires transcriptionnels qui auraient ainsi une conséquence sur l'activité de la plateforme transcriptionnelle NIC1/CSL/MAML1. Ces phosphorylations pourraient jouer un rôle dans la localisation subcellulaire, l'interaction avec NIC1 et CSL et le recrutement spécifique de partenaires impliqués dans la régulation du complexe NIC1/CSL/MAML1.

Notre projet a permis de montrer que la simplicité de la voie NOTCH cache en fait une complexité à de nombreuses étapes, de l'activation au niveau de la membrane, au post-clivage de NOTCH1 jusqu'à l'activation de la transcription. Nous avons également mis de l'avant l'importance d'étudier la voie NOTCH avec un NIC1 entier pour décortiquer les mécanismes de régulation complexes qui régulent NIC1. En effet, la délétion de la partie C-terminale de NIC1 ne permet pas seulement de le stabiliser, mais elle fait perdre des informations cruciales notamment des modifications post-traductionnelles qui permettent le recrutement de certains partenaires par exemple. Enfin, nous avons révélé l'importance de MAML1 dans le complexe transcriptionnel ternaire NIC1/CSL/MAML1 puisque nous avons découvert la phosphorylation de MAML1 qui est dépendante du domaine C-terminal de NIC1. Notre étude suggère que le domaine C-terminal de NIC1 est important pour une bonne régulation de la voie NOTCH ce qui permet de récapituler la réponse cellulaire de NIC1 lors de l'activation de la voie NOTCH1 au cours du développement ou dans les cancers.

6. REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, la Pre Marie-Josée Boucher pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci de ta patience, de ta rigueur et de ton enseignement. Merci de m'avoir encouragée et motivée quand les expériences ne fonctionnaient pas et que les résultats n'étaient pas ceux attendus. Tu as tenté de m'apprendre l'optimisme, ce qui n'était pas une tâche aisée pour une pessimiste comme moi.

J'aimerais ensuite remercier les membres de mon jury pour le temps qu'ils m'ont consacré tout au long de mon doctorat. Merci à ma mentore, la Pre Nathalie Perreault pour son soutien et pour son aide à me donner confiance en moi pour répondre aux questions. Merci à mon mentor, le Pr Jean-Luc Parent pour ses précieux conseils afin d'améliorer mon raisonnement scientifique. Merci au Pr Éric Asselin pour ses importants commentaires lors de mon examen général et de mon doctorat.

Je tiens à remercier tous les membres du département d'anatomie et biologie cellulaire et les membres du laboratoire, particulièrement Émanuel Paré (Chop Chop), pour ses longues conversations sur la science ou non et pour ces fous rires parce que l'on ne se comprenait pas toujours ! Merci à Isabelle Tremblay et Benoît Marchand de m'avoir aidé au commencement et de m'avoir intégrée à l'équipe. Merci à ma stagiaire Jessily Bédard pour toute ton aide, ton enthousiasme sans fin et à Marika Groleau pour tous ces fous rires qu'on a eu toutes les 3 et votre soutien moral.

Merci au Pr François-Michel Boisvert et son équipe pour leur précieuse aide sur les analyses de spectrométrie de masse. Je remercie spécifiquement Dominique Lévesque pour son écoute et ses précieux conseils sur la vie et sur la science. Merci de toujours t'être assuré qu'il y ait une bonne ambiance et une bonne cohésion dans cette grande famille qu'on formait entre les équipes MJB et FMB. Un grand merci à Marie-Line Dubois d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin. Merci de m'avoir ouvert les portes de ta famille formidable et d'avoir fait découvrir à une parisienne ton chalet isolé de l'extérieur, un paradis sur terre.

Merci à Sofiane Yacine Mersaoui de m'avoir challengé, pas toujours au bon moment, mais d'avoir été présent depuis le début et de m'avoir aidé jusqu'au bout. Un énorme MERCI à Edith Milena Alvarado Cuevas pour ton soutien. Tu as été mon pilier pendant mon doctorat. Merci de ton optimisme éternel et de ta vision de la vie hors norme !

Merci à Alexandre Cloutier, Patrick Asselin-Mullen, Jessica Gagné Sansfaçon, Joannie Allaire, Babao (Sébastien Cagnol), Etienne Lemieux, Jean-Philippe Babeu et Amélie Montagne pour leur soutien moral et technique. Je tenais à remercier également Alex-Ane Mathieu pour toutes ces heures d'études qui m'ont motivées à travailler et pour m'avoir transmis ta passion pour l'ultimate frisbee. Tu es une des raisons qui m'ont décidées à faire ce sport assez addictif. Je remercie toutes les personnes que j'ai rencontrées pendant les matchs et tournois. Un merci particulier à Sara St-Jean pour ton aide et ta motivation pendant ma rédaction. Enfin je remercie ma famille et mes amis en France qui m'ont aidés et soutenus malgré la distance.

7. LISTE DES RÉFÉRENCES

Albert, T. K., Lemaire, M., van Berkum, N. L., Gentz, R., Collart, M. A., & Timmers, H. T. (2000). Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic Acids Res*, *28*(3), 809-817.

Andersson, E. R., Sandberg, R., & Lendahl, U. (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*, *138*(17), 3593-3612. doi:10.1242/dev.063610

Arnett, K. L., Hass, M., McArthur, D. G., Ilagan, M. X., Aster, J. C., Kopan, R., & Blacklow, S. C. (2010). Structural and mechanistic insights into cooperative assembly of dimeric Notch transcription complexes. *Nat Struct Mol Biol*, *17*(11), 1312-1317. doi:10.1038/nsmb.1938

Aster, J. C., Pear, W. S., & Blacklow, S. C. (2008). Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol*, *3*, 587-613. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154300

Axelrod, J. D., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., & Perrimon, N. (1996). Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. *Science*, *271*(5257), 1826-1832.

Bardeesy, N., & DePinho, R. A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*, *2*(12), 897-909. doi:10.1038/nrc949

Baron, M. (2012). Endocytic routes to Notch activation. *Semin Cell Dev Biol*, *23*(4), 437-442. doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.008

Blain, J., Bedard, J., Thompson, M., Boisvert, F. M., & Boucher, M. J. (2017). C-terminal deletion of NOTCH1 intracellular domain (N1ICD) increases its stability but does not amplify and recapitulate N1ICD-dependent signalling. *Sci Rep*, *7*(1), 5034. doi:10.1038/s41598-017-05119-0

Borggreffe, T., Lauth, M., Zwijsen, A., Huylebroeck, D., Oswald, F., & Giaimo, B. D. (2016). The Notch intracellular domain integrates signals from Wnt, Hedgehog, TGFbeta/BMP and hypoxia pathways. *Biochim Biophys Acta*, *1863*(2), 303-313. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.11.020

Borggreffe, T., & Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci*, 66(10), 1631-1646. doi:10.1007/s00018-009-8668-7

Bozkulak, E. C., & Weinmaster, G. (2009). Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Mol Cell Biol*, 29(21), 5679-5695. doi:10.1128/MCB.00406-09

Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(9), 678-689. doi:10.1038/nrm2009

Bray, S. J. (2016). Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(11), 722-735. doi:10.1038/nrm.2016.94

Buchler, P., Gazdhar, A., Schubert, M., Giese, N., Reber, H. A., Hines, O. J., . . . Friess, H. (2005). The Notch signaling pathway is related to neurovascular progression of pancreatic cancer. *Ann Surg*, 242(6), 791-800, discussion 800-791.

Castel, D., Mourikis, P., Bartels, S. J., Brinkman, A. B., Tajbakhsh, S., & Stunnenberg, H. G. (2013). Dynamic binding of RBPJ is determined by Notch signaling status. *Genes Dev*, 27(9), 1059-1071. doi:10.1101/gad.211912.112

Castro, N. P., Fedorova-Abrams, N. D., Merchant, A. S., Rangel, M. C., Nagaoka, T., Karasawa, H., . . . Salomon, D. S. (2015). Cripto-1 as a novel therapeutic target for triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 6(14), 11910-11929. doi:10.18632/oncotarget.4182

Chastagner, P., Israel, A., & Brou, C. (2008). AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS One*, 3(7), e2735. doi:10.1371/journal.pone.0002735

Chiang, M. Y., Xu, M. L., Histen, G., Shestova, O., Roy, M., Nam, Y., . . . Aster, J. C. (2006). Identification of a conserved negative regulatory sequence that influences the leukemogenic activity of NOTCH1. *Mol Cell Biol*, 26(16), 6261-6271. doi:10.1128/MCB.02478-05

Cho, I. T., Lim, Y., Golden, J. A., & Cho, G. (2017). Aristaless Related Homeobox (ARX) Interacts with beta-Catenin, BCL9, and P300 to Regulate Canonical Wnt Signaling. *PLoS One*, 12(1), e0170282. doi:10.1371/journal.pone.0170282

Cohen, B., Shimizu, M., Izrailit, J., Ng, N. F., Buchman, Y., Pan, J. G., . . . Reedijk, M. (2010). Cyclin D1 is a direct target of JAG1-mediated Notch signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *123*(1), 113-124. doi:10.1007/s10549-009-0621-9

Coleman, M. L., McDonough, M. A., Hewitson, K. S., Coles, C., Mecinovic, J., Edelmann, M., . . . Schofield, C. J. (2007). Asparaginyl hydroxylation of the Notch ankyrin repeat domain by factor inhibiting hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, *282*(33), 24027-24038. doi:10.1074/jbc.M704102200

Collart, M. A. (2016). The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *7*(4), 438-454. doi:10.1002/wrna.1332

Collins, K. J., Yuan, Z., & Kovall, R. A. (2014). Structure and function of the CSL-KyoT2 corepressor complex: a negative regulator of Notch signaling. *Structure*, *22*(1), 70-81. doi:10.1016/j.str.2013.10.010

Contreras-Cornejo, H., Saucedo-Correa, G., Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcon, J. J., Baizabal-Aguirre, V. M., Cajero-Juarez, M., & Bravo-Patino, A. (2016). The CSL proteins, versatile transcription factors and context dependent corepressors of the notch signaling pathway. *Cell Div*, *11*, 12. doi:10.1186/s13008-016-0025-2

D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M. I., & Stahl, P. D. (1995). A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science*, *267*(5201), 1175-1178.

D'Souza, B., Meloty-Kapella, L., & Weinmaster, G. (2010). Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr Top Dev Biol*, *92*, 73-129. doi:10.1016/S0070-2153(10)92003-6

De La, O. J., Emerson, L. L., Goodman, J. L., Froebe, S. C., Illum, B. E., Curtis, A. B., & Murtaugh, L. C. (2008). Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(48), 18907-18912. doi:10.1073/pnas.0810111105

Dontu, G., Jackson, K. W., McNicholas, E., Kawamura, M. J., Abdallah, W. M., & Wicha, M. S. (2004). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res*, *6*(6), R605-615. doi:10.1186/bcr920

Dunn, J. D., Reid, G. E., & Bruening, M. L. (2010). Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, *29*(1), 29-54. doi:10.1002/mas.20219

Edlund, H. (2002). Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet*, 3(7), 524-532. doi:10.1038/nrg841

Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D., & Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, 66(4), 649-661.

Endo, Y., Osumi, N., & Wakamatsu, Y. (2002). Bimodal functions of Notch-mediated signaling are involved in neural crest formation during avian ectoderm development. *Development*, 129(4), 863-873.

Espinosa, L., Ingles-Esteve, J., Aguilera, C., & Bigas, A. (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem*, 278(34), 32227-32235. doi:10.1074/jbc.M304001200

Farshbaf, M., Lindberg, M. J., Truong, A., Bevens, Z., Chambers, E., Pournara, A., . . . White, J. B. (2015). Mastermind-Like 1 Is Ubiquitinated: Functional Consequences for Notch Signaling. *PLoS One*, 10(7), e0134013. doi:10.1371/journal.pone.0134013

Feldman, B. J., Hampton, T., & Cleary, M. L. (2000). A carboxy-terminal deletion mutant of Notch1 accelerates lymphoid oncogenesis in E2A-PBX1 transgenic mice. *Blood*, 96(5), 1906-1913.

Fischer, A., & Gessler, M. (2007). Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res*, 35(14), 4583-4596. doi:10.1093/nar/gkm477

Foltz, D. R., Santiago, M. C., Berechid, B. E., & Nye, J. S. (2002). Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability. *Curr Biol*, 12(12), 1006-1011.

Fortini, M. E. (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(9), 673-684. doi:10.1038/nrm910

Fre, S., Pallavi, S. K., Huyghe, M., Lae, M., Janssen, K. P., Robine, S., . . . Louvard, D. (2009). Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(15), 6309-6314. doi:10.1073/pnas.0900427106

Friedmann, D. R., Wilson, J. J., & Kovall, R. A. (2008). RAM-induced allostery facilitates assembly of a notch pathway active transcription complex. *J Biol Chem*, 283(21), 14781-14791. doi:10.1074/jbc.M709501200

Fryer, C. J., Lamar, E., Turbachova, I., Kintner, C., & Jones, K. A. (2002). Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev*, 16(11), 1397-1411. doi:10.1101/gad.991602

Fryer, C. J., White, J. B., & Jones, K. A. (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell*, 16(4), 509-520. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.014

Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T., & Pestell, R. G. (2004). Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*, 145(12), 5439-5447. doi:10.1210/en.2004-0959

Gama-Norton, L., Ferrando, E., Ruiz-Herguido, C., Liu, Z., Guiu, J., Islam, A. B., . . . Bigas, A. (2015). Notch signal strength controls cell fate in the haemogenic endothelium. *Nat Commun*, 6, 8510. doi:10.1038/ncomms9510

Gao, J., Long, B., & Wang, Z. (2017). Role of Notch signaling pathway in pancreatic cancer. *Am J Cancer Res*, 7(2), 173-186.

Gekas, C., D'Altri, T., Aligue, R., Gonzalez, J., Espinosa, L., & Bigas, A. (2016). beta-Catenin is required for T-cell leukemia initiation and MYC transcription downstream of Notch1. *Leukemia*, 30(10), 2002-2010. doi:10.1038/leu.2016.106

Georgia, S., Soliz, R., Li, M., Zhang, P., & Bhushan, A. (2006). p57 and Hes1 coordinate cell cycle exit with self-renewal of pancreatic progenitors. *Dev Biol*, 298(1), 22-31. doi:10.1016/j.ydbio.2006.05.036

Gerhardt, D. M., Pajcini, K. V., D'Altri, T., Tu, L., Jain, R., Xu, L., . . . Pear, W. S. (2014). The Notch1 transcriptional activation domain is required for development and reveals a novel role for Notch1 signaling in fetal hematopoietic stem cells. *Genes Dev*, 28(6), 576-593. doi:10.1101/gad.227496.113

Giles, R. H., van Es, J. H., & Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1653(1), 1-24.

Gould, G. W., & Lippincott-Schwartz, J. (2009). New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(4), 287-292. doi:10.1038/nrm2652

Guarani, V., Deflorian, G., Franco, C. A., Kruger, M., Phng, L. K., Bentley, K., . . . Potente, M. (2011). Acetylation-dependent regulation of endothelial Notch signalling by the SIRT1 deacetylase. *Nature*, *473*(7346), 234-238. doi:10.1038/nature09917

Guo, S., Liu, M., & Gonzalez-Perez, R. R. (2011). Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, *1815*(2), 197-213. doi:10.1016/j.bbcan.2010.12.002

Gupta-Rossi, N., Le Bail, O., Gonen, H., Brou, C., Logeat, F., Six, E., . . . Israel, A. (2001). Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *J Biol Chem*, *276*(37), 34371-34378. doi:10.1074/jbc.M101343200

Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., . . . Brou, C. (2004). Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. *J Cell Biol*, *166*(1), 73-83. doi:10.1083/jcb.200310098

Gustafsson, M. V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., . . . Bondesson, M. (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*, *9*(5), 617-628. doi:10.1016/j.devcel.2005.09.010

Habets, R. A., Groot, A. J., Yahyanejad, S., Tiyanont, K., Blacklow, S. C., & Vooijs, M. (2015). Human NOTCH2 Is Resistant to Ligand-independent Activation by Metalloprotease Adam17. *J Biol Chem*, *290*(23), 14705-14716. doi:10.1074/jbc.M115.643676

Han, X., Ju, J. H., & Shin, I. (2012). Glycogen synthase kinase 3-beta phosphorylates novel S/T-P-S/T domains in Notch1 intracellular domain and induces its nuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun*, *423*(2), 282-288. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.111

Hansson, M. L., Popko-Scibor, A. E., Saint Just Ribeiro, M., Dancy, B. M., Lindberg, M. J., Cole, P. A., & Wallberg, A. E. (2009). The transcriptional coactivator MAML1 regulates p300 autoacetylation and HAT activity. *Nucleic Acids Res*, *37*(9), 2996-3006. doi:10.1093/nar/gkp163

Hayette, S., Cornillet-Lefebvre, P., Tigaud, I., Struski, S., Forissier, S., Berchet, A., . . . Rimokh, R. (2005). AF4p12, a human homologue to the furry gene of *Drosophila*, as a

novel MLL fusion partner. *Cancer Res*, 65(15), 6521-6525. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1325

Hein, K., Mittler, G., Cizelsky, W., Kuhl, M., Ferrante, F., Liefke, R., . . . Borggrefe, T. (2015). Site-specific methylation of Notch1 controls the amplitude and duration of the Notch1 response. *Sci Signal*, 8(369), ra30. doi:10.1126/scisignal.2005892

Hicks, C., Johnston, S. H., diSibio, G., Collazo, A., Vogt, T. F., & Weinmaster, G. (2000). Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat Cell Biol*, 2(8), 515-520. doi:10.1038/35019553

Hoemann, C. D., Beaulieu, N., Girard, L., Rebai, N., & Jolicoeur, P. (2000). Two distinct Notch1 mutant alleles are involved in the induction of T-cell leukemia in c-myc transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 20(11), 3831-3842.

Hori, K., Sen, A., Kirchhausen, T., & Artavanis-Tsakonas, S. (2012). Regulation of ligand-independent Notch signal through intracellular trafficking. *Commun Integr Biol*, 5(4), 374-376. doi:10.4161/cib.19995

Housden, B. E., Fu, A. Q., Krejci, A., Bernard, F., Fischer, B., Tavaré, S., . . . Bray, S. J. (2013). Transcriptional dynamics elicited by a short pulse of notch activation involves feed-forward regulation by E(spl)/Hes genes. *PLoS Genet*, 9(1), e1003162. doi:10.1371/journal.pgen.1003162

Ilagan, M. X., & Kopan, R. (2007). SnapShot: notch signaling pathway. *Cell*, 128(6), 1246. doi:10.1016/j.cell.2007.03.011

Iso, T., Kedes, L., & Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol*, 194(3), 237-255. doi:10.1002/jcp.10208

Jang, J., Choi, Y. I., Choi, J., Lee, K. Y., Chung, H., Jeon, S. H., & Seong, R. H. (2006). Notch1 confers thymocytes a resistance to GC-induced apoptosis through Deltex1 by blocking the recruitment of p300 to the SRG3 promoter. *Cell Death Differ*, 13(9), 1495-1505. doi:10.1038/sj.cdd.4401827

Jeffries, S., & Capobianco, A. J. (2000). Neoplastic transformation by Notch requires nuclear localization. *Mol Cell Biol*, 20(11), 3928-3941.

Jeffries, S., Robbins, D. J., & Capobianco, A. J. (2002). Characterization of a high-molecular-weight Notch complex in the nucleus of Notch(ic)-transformed RKE cells and in a human T-cell leukemia cell line. *Mol Cell Biol*, 22(11), 3927-3941.

Jegga, A. G., Schneider, L., Ouyang, X., & Zhang, J. (2011). Systems biology of the autophagy-lysosomal pathway. *Autophagy*, 7(5), 477-489.

Jehn, B. M., Dittert, I., Beyer, S., von der Mark, K., & Bielke, W. (2002). c-Cbl binding and ubiquitin-dependent lysosomal degradation of membrane-associated Notch1. *J Biol Chem*, 277(10), 8033-8040. doi:10.1074/jbc.M108552200

Jin, S., Mutvei, A. P., Chivukula, I. V., Andersson, E. R., Ramskold, D., Sandberg, R., . . . Lendahl, U. (2013). Non-canonical Notch signaling activates IL-6/JAK/STAT signaling in breast tumor cells and is controlled by p53 and IKKalpha/IKKbeta. *Oncogene*, 32(41), 4892-4902. doi:10.1038/onc.2012.517

Jin, Y. H., Kim, H., Ki, H., Yang, I., Yang, N., Lee, K. Y., . . . Kim, K. (2009). Beta-catenin modulates the level and transcriptional activity of Notch1/NICD through its direct interaction. *Biochim Biophys Acta*, 1793(2), 290-299. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.10.002

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., . . . Kinzler, K. W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321(5897), 1801-1806. doi:10.1126/science.1164368

Kageyama, R., Ohtsuka, T., & Kobayashi, T. (2007). The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development*, 134(7), 1243-1251. doi:10.1242/dev.000786

Kamakaka, R. T., & Rine, J. (1998). Sir- and silencer-independent disruption of silencing in *Saccharomyces* by Sas10p. *Genetics*, 149(2), 903-914.

Kim, W., Bennett, E. J., Huttlin, E. L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., . . . Gygi, S. P. (2011). Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell*, 44(2), 325-340. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.025

Kitagawa, M. (2016). Notch signalling in the nucleus: roles of Mastermind-like (MAML) transcriptional coactivators. *J Biochem*, 159(3), 287-294. doi:10.1093/jb/mvv123

Kopan, R., & Ilagan, M. X. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, *137*(2), 216-233. doi:10.1016/j.cell.2009.03.045

Kovall, R. A., & Hendrickson, W. A. (2004). Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *EMBO J*, *23*(17), 3441-3451. doi:10.1038/sj.emboj.7600349

Krejci, A., Bernard, F., Housden, B. E., Collins, S., & Bray, S. J. (2009). Direct response to Notch activation: signaling crosstalk and incoherent logic. *Sci Signal*, *2*(55), ra1. doi:10.1126/scisignal.2000140

Krejci, A., & Bray, S. (2007). Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers. *Genes Dev*, *21*(11), 1322-1327. doi:10.1101/gad.424607

Kulic, I., Robertson, G., Chang, L., Baker, J. H., Lockwood, W. W., Mok, W., . . . Karsan, A. (2015). Loss of the Notch effector RBPJ promotes tumorigenesis. *J Exp Med*, *212*(1), 37-52. doi:10.1084/jem.20121192

Kurooka, H., & Honjo, T. (2000). Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. *J Biol Chem*, *275*(22), 17211-17220. doi:10.1074/jbc.M000909200

Lathion, S., Schaper, J., Beard, P., & Raj, K. (2003). Notch1 can contribute to viral-induced transformation of primary human keratinocytes. *Cancer Res*, *63*(24), 8687-8694.

Le Borgne, R. (2006). Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr Opin Cell Biol*, *18*(2), 213-222. doi:10.1016/j.ceb.2006.02.011

LeBon, L., Lee, T. V., Sprinzak, D., Jafar-Nejad, H., & Elowitz, M. B. (2014). Fringe proteins modulate Notch-ligand cis and trans interactions to specify signaling states. *Elife*, *3*, e02950. doi:10.7554/eLife.02950

Lee, H. J., Kim, M. Y., & Park, H. S. (2015). Phosphorylation-dependent regulation of Notch1 signaling: the fulcrum of Notch1 signaling. *BMB Rep*, *48*(8), 431-437.

Lee, J. C., Smith, S. B., Watada, H., Lin, J., Scheel, D., Wang, J., . . . German, M. S. (2001). Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes*, *50*(5), 928-936.

Leong, K. G., & Karsan, A. (2006). Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*, *107*(6), 2223-2233. doi:10.1182/blood-2005-08-3329

Leong, K. G., Niessen, K., Kulic, I., Raouf, A., Eaves, C., Pollet, I., & Karsan, A. (2007). Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med*, *204*(12), 2935-2948. doi:10.1084/jem.20071082

Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*, *120*(2), 159-162. doi:10.1016/j.cell.2005.01.005

Lewis, H. D., Leveridge, M., Strack, P. R., Haldon, C. D., O'Neil, J., Kim, H., . . . Beher, D. (2007). Apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia cells after cell cycle arrest induced by pharmacological inhibition of notch signaling. *Chem Biol*, *14*(2), 209-219. doi:10.1016/j.chembiol.2006.12.010

Lindberg, M. J., Popko-Scibor, A. E., Hansson, M. L., & Wallberg, A. E. (2010). SUMO modification regulates the transcriptional activity of MAML1. *FASEB J*, *24*(7), 2396-2404. doi:10.1096/fj.09-149401

Lissemore, J. L., & Starmer, W. T. (1999). Phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) proteins. *Mol Phylogenet Evol*, *11*(2), 308-319. doi:10.1006/mpev.1998.0588

Liu, H., Chi, A. W., Arnett, K. L., Chiang, M. Y., Xu, L., Shestova, O., . . . Pear, W. S. (2010). Notch dimerization is required for leukemogenesis and T-cell development. *Genes Dev*, *24*(21), 2395-2407. doi:10.1101/gad.1975210

Liu, J., Bang, A. G., Kintner, C., Orth, A. P., Chanda, S. K., Ding, S., & Schultz, P. G. (2005). Identification of the Wnt signaling activator leucine-rich repeat in Flightless interaction protein 2 by a genome-wide functional analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(6), 1927-1932. doi:10.1073/pnas.0409472102

Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., & Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(14), 8108-8112.

Lowell, S., Jones, P., Le Roux, I., Dunne, J., & Watt, F. M. (2000). Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol*, *10*(9), 491-500.

Lubman, O. Y., Ilagan, M. X., Kopan, R., & Barrick, D. (2007). Quantitative dissection of the Notch:CSL interaction: insights into the Notch-mediated transcriptional switch. *J Mol Biol*, 365(3), 577-589. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.071

MacKenzie, F., Duriez, P., Wong, F., Nosedà, M., & Karsan, A. (2004). Notch4 inhibits endothelial apoptosis via RBP-Jkappa-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*, 279(12), 11657-11663. doi:10.1074/jbc.M312102200

Maniati, E., Bossard, M., Cook, N., Candido, J. B., Emami-Shahri, N., Nedospasov, S. A., . . . Hagemann, T. (2011). Crosstalk between the canonical NF-kappaB and Notch signaling pathways inhibits Ppargamma expression and promotes pancreatic cancer progression in mice. *J Clin Invest*, 121(12), 4685-4699. doi:10.1172/JCI45797

Marampon, F., Gravina, G. L., Di Rocco, A., Bonfili, P., Di Staso, M., Fardella, C., . . . Zani, B. M. (2011). MEK/ERK inhibitor U0126 increases the radiosensitivity of rhabdomyosarcoma cells in vitro and in vivo by downregulating growth and DNA repair signals. *Mol Cancer Ther*, 10(1), 159-168. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0631

Martinez Arias, A., Zecchini, V., & Brennan, K. (2002). CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr Opin Genet Dev*, 12(5), 524-533.

Mazzone, M., Selfors, L. M., Albeck, J., Overholtzer, M., Sale, S., Carroll, D. L., . . . Brugge, J. S. (2010). Dose-dependent induction of distinct phenotypic responses to Notch pathway activation in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(11), 5012-5017. doi:10.1073/pnas.1000896107

McElhinny, A. S., Li, J. L., & Wu, L. (2008). Mastermind-like transcriptional co-activators: emerging roles in regulating cross talk among multiple signaling pathways. *Oncogene*, 27(38), 5138-5147. doi:10.1038/onc.2008.228

McGill, M. A., Dho, S. E., Weinmaster, G., & McGlade, C. J. (2009). Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. *J Biol Chem*, 284(39), 26427-26438. doi:10.1074/jbc.M109.014845

McGill, M. A., & McGlade, C. J. (2003). Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem*, 278(25), 23196-23203. doi:10.1074/jbc.M302827200

Meier-Stiegen, F., Schwanbeck, R., Bernoth, K., Martini, S., Hieronymus, T., Ruau, D., . . . Just, U. (2010). Activated Notch1 target genes during embryonic cell differentiation depend on the cellular context and include lineage determinants and inhibitors. *PLoS One*, 5(7), e11481. doi:10.1371/journal.pone.0011481

Melino, G., Gallagher, E., Aqeilan, R. I., Knight, R., Peschiaroli, A., Rossi, M., . . . Bernassola, F. (2008). Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ*, 15(7), 1103-1112. doi:10.1038/cdd.2008.60

Mellman, I., & Yarden, Y. (2013). Endocytosis and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(12), a016949. doi:10.1101/cshperspect.a016949

Mittal, S., Subramanyam, D., Dey, D., Kumar, R. V., & Rangarajan, A. (2009). Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Mol Cancer*, 8, 128. doi:10.1186/1476-4598-8-128

Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C. A., . . . Leach, S. D. (2003). Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*, 3(6), 565-576.

Moellering, R. E., Cornejo, M., Davis, T. N., Del Bianco, C., Aster, J. C., Blacklow, S. C., . . . Bradner, J. E. (2009). Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature*, 462(7270), 182-188. doi:10.1038/nature08543

Moretti, J., & Brou, C. (2013). Ubiquitinations in the notch signaling pathway. *Int J Mol Sci*, 14(3), 6359-6381. doi:10.3390/ijms14036359

Moretti, J., Chastagner, P., Gastaldello, S., Heuss, S. F., Dirac, A. M., Bernards, R., . . . Brou, C. (2010). The translation initiation factor 3f (eIF3f) exhibits a deubiquitinase activity regulating Notch activation. *PLoS Biol*, 8(11), e1000545. doi:10.1371/journal.pbio.1000545

Moretti, J., Chastagner, P., Liang, C. C., Cohn, M. A., Israel, A., & Brou, C. (2012). The ubiquitin-specific protease 12 (USP12) is a negative regulator of notch signaling acting on notch receptor trafficking toward degradation. *J Biol Chem*, 287(35), 29429-29441. doi:10.1074/jbc.M112.366807

Morishige, M., Hashimoto, S., Ogawa, E., Toda, Y., Kotani, H., Hirose, M., . . . Sabe, H. (2008). GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat Cell Biol*, 10(1), 85-92. doi:10.1038/ncb1672

Mosesson, Y., Mills, G. B., & Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer*, 8(11), 835-850. doi:10.1038/nrc2521

Mullendore, M. E., Koorstra, J. B., Li, Y. M., Offerhaus, G. J., Fan, X., Henderson, C. M., . . . Feldmann, G. (2009). Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 15(7), 2291-2301. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2004

Mulligan, P., Yang, F., Di Stefano, L., Ji, J. Y., Ouyang, J., Nishikawa, J. L., . . . Naar, A. M. (2011). A SIRT1-LSD1 corepressor complex regulates Notch target gene expression and development. *Mol Cell*, 42(5), 689-699. doi:10.1016/j.molcel.2011.04.020

Murtaugh, L. C., Stanger, B. Z., Kwan, K. M., & Melton, D. A. (2003). Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25), 14920-14925. doi:10.1073/pnas.2436557100

Musse, A. A., Meloty-Kapella, L., & Weinmaster, G. (2012). Notch ligand endocytosis: mechanistic basis of signaling activity. *Semin Cell Dev Biol*, 23(4), 429-436. doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.011

Nam, Y., Sliz, P., Pear, W. S., Aster, J. C., & Blacklow, S. C. (2007). Cooperative assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(7), 2103-2108. doi:10.1073/pnas.0611092104

Nam, Y., Sliz, P., Song, L., Aster, J. C., & Blacklow, S. C. (2006). Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell*, 124(5), 973-983. doi:10.1016/j.cell.2005.12.037

Nam, Y., Weng, A. P., Aster, J. C., & Blacklow, S. C. (2003). Structural requirements for assembly of the CSL-intracellular Notch1-Mastermind-like 1 transcriptional activation complex. *J Biol Chem*, 278(23), 21232-21239. doi:10.1074/jbc.M301567200

Nemet, J., Jelacic, B., Rubelj, I., & Sopta, M. (2014). The two faces of Cdk8, a positive/negative regulator of transcription. *Biochimie*, 97, 22-27. doi:10.1016/j.biochi.2013.10.004

Nofziger, D., Miyamoto, A., Lyons, K. M., & Weinmaster, G. (1999). Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development*, 126(8), 1689-1702.

O'Neil, J., Grim, J., Strack, P., Rao, S., Tibbitts, D., Winter, C., . . . Look, A. T. (2007). FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med*, *204*(8), 1813-1824. doi:10.1084/jem.20070876

Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M., & Lendahl, U. (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem*, *276*(38), 35847-35853. doi:10.1074/jbc.M103992200

Ong, C. T., Cheng, H. T., Chang, L. W., Ohtsuka, T., Kageyama, R., Stormo, G. D., & Kopan, R. (2006). Target selectivity of vertebrate notch proteins. Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability. *J Biol Chem*, *281*(8), 5106-5119. doi:10.1074/jbc.M506108200

Oswald, F., Tauber, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., . . . Schmid, R. M. (2001). p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol Cell Biol*, *21*(22), 7761-7774. doi:10.1128/MCB.21.22.7761-7774.2001

Palomero, T., Lim, W. K., Odom, D. T., Sulis, M. L., Real, P. J., Margolin, A., . . . Ferrando, A. A. (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(48), 18261-18266. doi:10.1073/pnas.0606108103

Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., & Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature*, *387*(6636), 908-912. doi:10.1038/43191

Pear, W. S., & Aster, J. C. (2004). T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: a human cancer commonly associated with aberrant NOTCH1 signaling. *Curr Opin Hematol*, *11*(6), 426-433.

Pece, S., Serresi, M., Santolini, E., Capra, M., Hulleman, E., Galimberti, V., . . . Di Fiore, P. P. (2004). Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol*, *167*(2), 215-221. doi:10.1083/jcb.200406140

Perumalsamy, L. R., Nagala, M., Banerjee, P., & Sarin, A. (2009). A hierarchical cascade activated by non-canonical Notch signaling and the mTOR-Rictor complex regulates neglect-induced death in mammalian cells. *Cell Death Differ*, *16*(6), 879-889. doi:10.1038/cdd.2009.20

Pettersson, S., Sczaniecka, M., McLaren, L., Russell, F., Gladstone, K., Hupp, T., & Wallace, M. (2013). Non-degradative ubiquitination of the Notch1 receptor by the E3

ligase MDM2 activates the Notch signalling pathway. *Biochem J*, 450(3), 523-536. doi:10.1042/BJ20121249

Piper, R. C., & Katzmann, D. J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 519-547. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123319

Plentz, R., Park, J. S., Rhim, A. D., Abravanel, D., Hezel, A. F., Sharma, S. V., . . . Bardeesy, N. (2009). Inhibition of gamma-secretase activity inhibits tumor progression in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 136(5), 1741-1749 e1746. doi:10.1053/j.gastro.2009.01.008

Popko-Scibor, A. E., Lindberg, M. J., Hansson, M. L., Holmlund, T., & Wallberg, A. E. (2011). Ubiquitination of Notch1 is regulated by MAML1-mediated p300 acetylation of Notch1. *Biochem Biophys Res Commun*, 416(3-4), 300-306. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.030

Puca, L., Chastagner, P., Meas-Yedid, V., Israel, A., & Brou, C. (2013). Alpha-arrestin 1 (ARRDC1) and beta-arrestins cooperate to mediate Notch degradation in mammals. *J Cell Sci*, 126(Pt 19), 4457-4468. doi:10.1242/jcs.130500

Qiu, H., Tang, X., Ma, J., Shaverdashvili, K., Zhang, K., & Bedogni, B. (2015). Notch1 Autoactivation via Transcriptional Regulation of Furin, Which Sustains Notch1 Signaling by Processing Notch1-Activating Proteases ADAM10 and Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase. *Mol Cell Biol*, 35(21), 3622-3632. doi:10.1128/MCB.00116-15

Qiu, L., Joazeiro, C., Fang, N., Wang, H. Y., Elly, C., Altman, Y., . . . Liu, Y. C. (2000). Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 275(46), 35734-35737. doi:10.1074/jbc.M007300200

Qu, X., Afelik, S., Jensen, J. N., Bukys, M. A., Kobberup, S., Schmerr, M., . . . Jensen, J. (2013). Notch-mediated post-translational control of Ngn3 protein stability regulates pancreatic patterning and cell fate commitment. *Dev Biol*, 376(1), 1-12. doi:10.1016/j.ydbio.2013.01.021

Radtke, F., & Raj, K. (2003). The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer*, 3(10), 756-767. doi:10.1038/nrc1186

Ramain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C., & Heitzler, P. (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr Biol*, 11(22), 1729-1738.

Ranganathan, P., Vasquez-Del Carpio, R., Kaplan, F. M., Wang, H., Gupta, A., VanWye, J. D., & Capobianco, A. J. (2011). Hierarchical phosphorylation within the ankyrin repeat domain defines a phosphoregulatory loop that regulates Notch transcriptional activity. *J Biol Chem*, *286*(33), 28844-28857. doi:10.1074/jbc.M111.243600

Ravikumar, B., Futter, M., Jahreiss, L., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., . . . Rubinsztein, D. C. (2009). Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci*, *122*(Pt 11), 1707-1711. doi:10.1242/jcs.031773

Rechsteiner, M., & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, *21*(7), 267-271.

Reedijk, M., Odorcic, S., Chang, L., Zhang, H., Miller, N., McCready, D. R., . . . Egan, S. E. (2005). High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res*, *65*(18), 8530-8537. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1069

Reynolds, T. C., Smith, S. D., & Sklar, J. (1987). Analysis of DNA surrounding the breakpoints of chromosomal translocations involving the beta T cell receptor gene in human lymphoblastic neoplasms. *Cell*, *50*(1), 107-117.

Ronchini, C., & Capobianco, A. J. (2001). Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol*, *21*(17), 5925-5934.

Ross, D. A., & Kadesch, T. (2001). The notch intracellular domain can function as a coactivator for LEF-1. *Mol Cell Biol*, *21*(22), 7537-7544. doi:10.1128/MCB.21.22.7537-7544.2001

Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., & Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*, *196*(6), 801-810. doi:10.1083/jcb.201112098

Rustighi, A., Zannini, A., Tiberi, L., Sommaggio, R., Piazza, S., Sorrentino, G., . . . Del Sal, G. (2014). Prolyl-isomerase Pin1 controls normal and cancer stem cells of the breast. *EMBO Mol Med*, *6*(1), 99-119. doi:10.1002/emmm.201302909

Saint Just Ribeiro, M., Hansson, M. L., Lindberg, M. J., Popko-Scibor, A. E., & Wallberg, A. E. (2009). GSK3beta is a negative regulator of the transcriptional coactivator MAML1. *Nucleic Acids Res*, *37*(20), 6691-6700. doi:10.1093/nar/gkp724

Saint Just Ribeiro, M., Hansson, M. L., & Wallberg, A. E. (2007). A proline repeat domain in the Notch co-activator MAML1 is important for the p300-mediated acetylation of MAML1. *Biochem J*, *404*(2), 289-298. doi:10.1042/BJ20061900

Sanalkumar, R., Dhanesh, S. B., & James, J. (2010). Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. *Cell Mol Life Sci*, *67*(17), 2957-2968. doi:10.1007/s00018-010-0391-x

Sanchez-Martin, M., & Ferrando, A. (2017). The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *129*(9), 1124-1133. doi:10.1182/blood-2016-09-692582

Sasaki, N., Kiso, M., Kitagawa, M., & Saga, Y. (2011). The repression of Notch signaling occurs via the destabilization of mastermind-like 1 by Mesp2 and is essential for somitogenesis. *Development*, *138*(1), 55-64. doi:10.1242/dev.055533

Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., & Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, *393*(6683), 382-386. doi:10.1038/30756

Schweisguth, F. (2004). Regulation of notch signaling activity. *Curr Biol*, *14*(3), R129-138.

Selkoe, D., & Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci*, *26*, 565-597. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131334

Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J. J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D., & Weinmaster, G. (1996). Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development*, *122*(12), 3765-3773.

Someya, A., Sata, M., Takeda, K., Pacheco-Rodriguez, G., Ferrans, V. J., Moss, J., & Vaughan, M. (2001). ARF-GEP(100), a guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(5), 2413-2418. doi:10.1073/pnas.051634798

Sorensen, E. B., & Conner, S. D. (2010). gamma-secretase-dependent cleavage initiates notch signaling from the plasma membrane. *Traffic*, *11*(9), 1234-1245. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01090.x

Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C. S., William, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T. M., & Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol*, *1*, 4.

Struhl, G., & Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell*, *6*(3), 625-636.

Suzuki, T., Ino, K., Kikkawa, F., Uehara, C., Kajiyama, H., Shibata, K., & Mizutani, S. (2002). Neutral endopeptidase/CD10 expression during phorbol ester-induced differentiation of choriocarcinoma cells through the protein kinase C- and extracellular signal-regulated kinase-dependent signalling pathway. *Placenta*, *23*(6), 475-482.

Tagami, S., Okochi, M., Yanagida, K., Ikuta, A., Fukumori, A., Matsumoto, N., . . . Takeda, M. (2008). Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. *Mol Cell Biol*, *28*(1), 165-176. doi:10.1128/MCB.00863-07

Thompson, B. J., Buonamici, S., Sulis, M. L., Palomero, T., Vilimas, T., Basso, G., . . . Aifantis, I. (2007). The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med*, *204*(8), 1825-1835. doi:10.1084/jem.20070872

Tien, A. C., Rajan, A., & Bellen, H. J. (2009). A Notch updated. *J Cell Biol*, *184*(5), 621-629. doi:10.1083/jcb.200811141

Tremblay, I., Pare, E., Arsenault, D., Douziech, M., & Boucher, M. J. (2013). The MEK/ERK pathway promotes NOTCH signalling in pancreatic cancer cells. *PLoS One*, *8*(12), e85502. doi:10.1371/journal.pone.0085502

Tsao, P. N., Chen, F., Izvolsky, K. I., Walker, J., Kukuruzinska, M. A., Lu, J., & Cardoso, W. V. (2008). Gamma-secretase activation of notch signaling regulates the balance of proximal and distal fates in progenitor cells of the developing lung. *J Biol Chem*, *283*(43), 29532-29544. doi:10.1074/jbc.M801565200

Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M. E., & Bilder, D. (2008). Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*, *180*(4), 755-762. doi:10.1083/jcb.200708127

van Tetering, G., & Vooijs, M. (2011). Proteolytic cleavage of Notch: "HIT and RUN". *Curr Mol Med*, *11*(4), 255-269.

Vasquez-Del Carpio, R., Kaplan, F. M., Weaver, K. L., VanWye, J. D., Alves-Guerra, M. C., Robbins, D. J., & Capobianco, A. J. (2011). Assembly of a Notch transcriptional activation complex requires multimerization. *Mol Cell Biol*, *31*(7), 1396-1408. doi:10.1128/MCB.00360-10

Veeraraghavalu, K., Subbaiah, V. K., Srivastava, S., Chakrabarti, O., Syal, R., & Krishna, S. (2005). Complementation of human papillomavirus type 16 E6 and E7 by Jagged1-specific Notch1-phosphatidylinositol 3-kinase signaling involves pleiotropic oncogenic functions independent of CBF1;Su(H);Lag-1 activation. *J Virol*, *79*(12), 7889-7898. doi:10.1128/JVI.79.12.7889-7898.2005

Wacker, S. A., Alvarado, C., von Wichert, G., Knippschild, U., Wiedenmann, J., Clauss, K., . . . Oswald, F. (2011). RITA, a novel modulator of Notch signalling, acts via nuclear export of RBP-J. *EMBO J*, *30*(1), 43-56. doi:10.1038/emboj.2010.289

Wagner, S. A., Beli, P., Weinert, B. T., Scholz, C., Kelstrup, C. D., Young, C., . . . Choudhary, C. (2012). Proteomic analyses reveal divergent ubiquitylation site patterns in murine tissues. *Mol Cell Proteomics*, *11*(12), 1578-1585. doi:10.1074/mcp.M112.017905

Wallberg, A. E., Pedersen, K., Lendahl, U., & Roeder, R. G. (2002). p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Mol Cell Biol*, *22*(22), 7812-7819.

Wang, K., Zhang, Q., Li, D., Ching, K., Zhang, C., Zheng, X., . . . Olson, P. (2015). PEST domain mutations in Notch receptors comprise an oncogenic driver segment in triple-negative breast cancer sensitive to a gamma-secretase inhibitor. *Clin Cancer Res*, *21*(6), 1487-1496. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1348

Welcker, M., & Clurman, B. E. (2008). FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer*, *8*(2), 83-93. doi:10.1038/nrc2290

Wendorff, A. A., Koch, U., Wunderlich, F. T., Wirth, S., Dubey, C., Bruning, J. C., . . . Radtke, F. (2010). Hes1 is a critical but context-dependent mediator of canonical Notch signaling in lymphocyte development and transformation. *Immunity*, *33*(5), 671-684. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.014

Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., . . . Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, *306*(5694), 269-271. doi:10.1126/science.1102160

Weng, A. P., Millholland, J. M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., . . . Aster, J. C. (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev*, 20(15), 2096-2109. doi:10.1101/gad.1450406

Weng, A. P., Nam, Y., Wolfe, M. S., Pear, W. S., Griffin, J. D., Blacklow, S. C., & Aster, J. C. (2003). Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling. *Mol Cell Biol*, 23(2), 655-664.

Wilkins, S. E., Hyvarinen, J., Chicher, J., Gorman, J. J., Peet, D. J., Bilton, R. L., & Koivunen, P. (2009). Differences in hydroxylation and binding of Notch and HIF-1alpha demonstrate substrate selectivity for factor inhibiting HIF-1 (FIH-1). *Int J Biochem Cell Biol*, 41(7), 1563-1571. doi:10.1016/j.biocel.2009.01.005

Wilson, J. J., & Kovall, R. A. (2006). Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell*, 124(5), 985-996. doi:10.1016/j.cell.2006.01.035

Winkler, G. S., Mulder, K. W., Bardwell, V. J., Kalkhoven, E., & Timmers, H. T. (2006). Human Ccr4-Not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription. *EMBO J*, 25(13), 3089-3099. doi:10.1038/sj.emboj.7601194

Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A., . . . Kitajewski, J. (2001). SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol Cell Biol*, 21(21), 7403-7415. doi:10.1128/MCB.21.21.7403-7415.2001

Wu, L., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S., & Griffin, J. D. (2000). MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet*, 26(4), 484-489. doi:10.1038/82644

Wu, L., & Griffin, J. D. (2004). Modulation of Notch signaling by mastermind-like (MAML) transcriptional co-activators and their involvement in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*, 14(5), 348-356. doi:10.1016/j.semcancer.2004.04.014

Wu, L., Sun, T., Kobayashi, K., Gao, P., & Griffin, J. D. (2002). Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. *Mol Cell Biol*, 22(21), 7688-7700.

Xie, M., Liu, M., & He, C. S. (2012). SIRT1 regulates endothelial Notch signaling in lung cancer. *PLoS One*, 7(9), e45331. doi:10.1371/journal.pone.0045331

Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J. U., . . . Lu, K. P. (1997). Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science*, *278*(5345), 1957-1960.

Yashiro-Ohtani, Y., Ohtani, T., & Pear, W. S. (2010). Notch regulation of early thymocyte development. *Semin Immunol*, *22*(5), 261-269. doi:10.1016/j.smim.2010.04.015

Yatim, A., Benne, C., Sobhian, B., Laurent-Chabalier, S., Deas, O., Judde, J. G., . . . Benkirane, M. (2012). NOTCH1 nuclear interactome reveals key regulators of its transcriptional activity and oncogenic function. *Mol Cell*, *48*(3), 445-458. doi:10.1016/j.molcel.2012.08.022

Yun, J., Espinoza, I., Pannuti, A., Romero, D., Martinez, L., Caskey, M., . . . Miele, L. (2015). p53 Modulates Notch Signaling in MCF-7 Breast Cancer Cells by Associating With the Notch Transcriptional Complex Via MAML1. *J Cell Physiol*, *230*(12), 3115-3127. doi:10.1002/jcp.25052

Zaffagnini, G., & Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. *J Mol Biol*, *428*(9 Pt A), 1714-1724. doi:10.1016/j.jmb.2016.02.004

Zang, S., Chen, F., Dai, J., Guo, D., Tse, W., Qu, X., . . . Ji, C. (2010). RNAi-mediated knockdown of Notch-1 leads to cell growth inhibition and enhanced chemosensitivity in human breast cancer. *Oncol Rep*, *23*(4), 893-899.

Zeng, C., Xing, R., Liu, J., & Xing, F. (2016). Role of CSL-dependent and independent Notch signaling pathways in cell apoptosis. *Apoptosis*, *21*(1), 1-12. doi:10.1007/s10495-015-1188-z

Zheng, X., Linke, S., Dias, J. M., Zheng, X., Gradin, K., Wallis, T. P., . . . Poellinger, L. (2008). Interaction with factor inhibiting HIF-1 defines an additional mode of cross-coupling between the Notch and hypoxia signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(9), 3368-3373. doi:10.1073/pnas.0711591105

Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G., & Hayward, S. D. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. *Mol Cell Biol*, *20*(7), 2400-2410.

Zhou, S., & Hayward, S. D. (2001). Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex. *Mol Cell Biol*, *21*(18), 6222-6232.

8. ANNEXES

Annexe 3 : Protéines associées exclusivement à GFP-NIC1dC et identifiées par spectrométrie de masse suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1dC à partir d'un lysat total d'U2OS GFP-NIC1dC

Protéines identifiées dans l'immunoprécipitation GFP à partir de lysat total de cellules U2OS GFP-NIC1 non-induites (L) et U2OS GFP-NIC1dC induites (H).

Les peptides avec le ratio H/L supérieur ou égal à 2 à partir de lysat total ont été listés. Certaines catégories ont été présentées dans le tableau 12, les autres ont été mis dans cette annexe 1.

Catégories fonctionnelles	Gènes	Protéines
	RRP1	60S acidic ribosomal protein P1
	RPF2	Ribosome production factor 2 homolog
	NSA2	Ribosome biogenesis protein NSA2 homolog
	BOP1	Ribosome biogenesis protein BOP1
	PES1	Pescadillo homolog
	BRX1	Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog
	GTPBP4	Nucleolar GTP-binding protein 1
	ILF2	Interleukin enhancer-binding factor 2
	ILF3	Interleukin enhancer-binding factor 3
Régulation traductionnelle	NIP7	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog
	PDCD11	Protein RRP5 homolog
	DKC1	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4
	TRUB1	Probable tRNA pseudouridine synthase 1
	NAT10	N-acetyltransferase 10
	CYFIP1	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1
	STAU1	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1
	DHX30	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30
	EIF6	Eukaryotic translation initiation factor 6
	EBNA1BP2	EBNA1 binding protein 2, isoform CRA_d
	TRMT1	tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase
	NOP58	Nucleolar protein 58
	NOP56	Nucleolar protein 56
	NOL6	Nucleolar protein 6
	TEX10	Testis-expressed protein 10
RNA processing	RRP7A	Ribosomal RNA-processing protein 7 homolog A
	RRP9	U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2
	NOC4L	Nucleolar complex protein 4 homolog
	MPHOSPH10	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10
	NHP2L1	NHP2-like protein 1

WDR12	Ribosome biogenesis protein WDR12
WDR43	WD repeat-containing protein 43
WDR46	WD repeat-containing protein 46
UTP14A	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A
UTP15	U3 small nucleolar RNA-associated protein 15 homolog
SF3A1	Splicing factor 3A subunit 1
SF3A3	Splicing factor 3A subunit 3
SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1
SF3B2	Splicing factor 3B subunit 2
SF3B3	Splicing factor 3B subunit 3
HNRNPAB	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
HNRNPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
HNRNPH3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3
HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
HNRNPA0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0
HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2
HNRNPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
HNRNPUL2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2
HNRNPR	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
HNRNPF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
HNRNPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0
TRA2B	Transformer-2 protein homolog beta
SMU1	WD40 repeat-containing protein SMU1
SNRPD1	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1
SNRPD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2
SNRPD3	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3
SNRPB2	U2 small nuclear ribonucleoprotein B
RBM8A	RNA-binding protein 8A
RBM28	RNA-binding protein 28
PNO1	RNA-binding protein PNO1
MAGOHB	Protein mago nashi homolog 2
EFTUD2	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component
ELAVL1	ELAV-like protein 1
SRSF10	Serine/arginine-rich-splicing factor 10
PRPF8	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8
PRPF19	Pre-mRNA-processing factor 19
DHX15	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15
FBL	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin
SYNCRIP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q

	SNRNP200	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase
	LSM3	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3
	CWC25	Pre-mRNA-splicing factor CWC25 homolog
	SON	Protein SON
	ADAR	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase
	PABPN1	Polyadenylate-binding protein 2
	SRSF7	Serine/arginine-rich splicing factor 7
	LMNA	Prelamin-A/C
	LMNB1	Lamin-B1
	LMNB2	Lamin-B2
	ACTA1	Actin, alpha skeletal muscle
	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2
	ACTB	Actin, cytoplasmic 1
	ARPC2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2
	ACTR3	Actin-related protein 3
	ARPC4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4
	ACTR2	Actin-related protein 2
	CAPZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1
	CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta
	CTTN	Src substrate cortactin
	MYH9	Myosin-9
	MYH10	Myosin-10
	MYH14	Myosin-14
Cytoskeleton	MYL12A	Myosin regulatory light chain 12A
	MYL1	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform
	PDE6H	Myosin light polypeptide 6
	MYO1C	Unconventional myosin-Ic
	MYO6	Unconventional myosin-VI
	NES	Nestin
	NEFM	Neurofilament medium polypeptide
	CGN	Cingulin
	PLEC	Plectin
	DBN1	Drebrin
	NEXN	Nexilin
	VIM	Vimentin
	EPPK1	Epiplakin
	WDR66	WD repeat-containing protein 66
	CROCC	Rootletin
	PALLD	Palladin
	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain
	SPTAN1	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1

	DYNLL2	Dynein light chain 2, cytoplasmic
	HYDIN	Hydrocephalus-inducing protein homolog
	UGT2A3	UDP-glucuronosyltransferase 2A3
	FADS2	Fatty acid desaturase 2
	MUC19	Mucin-19
	RSL1D1	Ribosomal L1 domain-containing protein 1
	MROH1	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 1
	KIAA0020	Pumilio homolog 3
	FRMD4B	FERM domain-containing protein 4B
	NUP98	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96
	NUP62	Nuclear pore glycoprotein p62
	NUP214	Nuclear pore complex protein Nup214
	NUP133	Nuclear pore complex protein Nup133
	NUP205	Nuclear pore complex protein Nup205
	NUP93	Nuclear pore complex protein Nup93
	UBE2I	SUMO-conjugating enzyme UBC9
	TFP2	Tissue factor pathway inhibitor 2
	TPR	Nucleoprotein TPR
	RANGAP1	Ran GTPase-activating protein 1
	THY1	Thy-1 membrane glycoprotein
Divers	EFHD2	EF-hand domain-containing protein D2
	GPC1	Glypican-1
	RGPD5	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6
	SMG1	Serine/threonine-protein kinase SMG1
	GPR125	Probable G-protein coupled receptor 125
	ARMC9	LisH domain-containing protein ARMC9
	TTN	Titin
	HDC	Histidine decarboxylase
	DHRS2	Dehydrogenase/reductase SDR family member 2, mitochondrial
	NPM1	Nucleophosmin
	CALM2	Calmodulin
	FKBP1A	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A
	KPNA2	Importin subunit alpha-1
	PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
	GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2
	GFPT1	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1
	PDHX	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial
	PDPR	Pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit, mitochondrial
	MMTAG2	Multiple myeloma tumor-associated protein 2
	C7	Complement component C7

Annexe 4 : Protéines associées exclusivement à GFP-NIC1dC et identifiées par spectrométrie de masse suite à l'immunoprécipitation de GFP-NIC1dC à partir d'un extrait nucléaire d'U2OS GFP-NIC1dC

Protéines identifiées dans l'immunoprécipitation GFP à partir d'un extrait nucléaire de cellules U2OS GFP-NIC1 non-induites (L) et U2OS GFP-NIC1dC induites (H).

Les peptides avec le ratio H/L supérieur ou égal à 2 à partir d'extrait nucléaire ont été listés. Certaines catégories ont été présentées dans le tableau 13, les autres ont été mis dans cette annexe 2.

Catégories fonctionnelles	Gènes	Protéines
RNA processing	SUPV3L1	ATP-dependent RNA helicase SUPV3L1, mitochondrial
	PABPC4	Polyadenylate-binding protein 4
	PABPC5	Polyadenylate-binding protein 5
	SNRPD1	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1
	PUM1	Pumilio homolog 1
	PUM2	Pumilio homolog 2
	CASC3	Protein CASC3
	YBX1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1
	MEPCE	7SK snRNA methylphosphate capping enzyme
	UPF1	Regulator of nonsense transcripts 1
	YTHDF2	YTH domain-containing family protein 2
	ELAVL2	ELAV-like protein 2
	FAM120A	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1
	IGF2BP3	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3
	IGF2BP2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2
	STAU2	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2
Cytosquelette / adhésion cellulaire	MYO1B	Unconventional myosin-Ib
	MYO1C	Unconventional myosin-Ic
	MYO1D	Unconventional myosin-Id
	MYO19	Unconventional myosin-XIX
	CYR61	Protein CYR61
	EZR	Ezrin
	PKP2	Plakophilin-2
	SDC1	Syndecan-1
	LAMA5	Laminin subunit alpha-5
	NEGR1	Neuronal growth regulator 1
	NTM	Neurotrimin
	CDH13	Cadherin-13
	NES	Nestin
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	

	CAPZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1
	DSG2	Desmoglein-2
	JUP	Junction plakoglobin
	VTN	Vitronectin
	MACF1	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5
	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4
	TUBB2B	Tubulin beta-2B chain
	KTN1	Kinectin
	DST	Dystonin
	HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1A
	FOLR1	Folate receptor alpha
	WNK3	Serine/threonine-protein kinase WNK3
	GPRC5A	Retinoic acid-induced protein 3
	KIAA0355	Uncharacterized protein KIAA0355
	TTC37	Tetratricopeptide repeat protein 37
	SAPCD2	Suppressor APC domain-containing protein 2
	LYN	Tyrosine-protein kinase Lyn
	PEO1	Twinkle protein, mitochondrial
	ATXN2L	Ataxin-2-like protein
	PROCR	Endothelial protein C receptor
	SEMA7A	Semaphorin-7A
	GNAS	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short
	MSI2	RNA-binding protein Musashi homolog 2
	LRRC9	Leucine-rich repeat-containing protein 9
Divers	09-Sep	Septin-9
	ATP5J2	Pentatricopeptide repeat-containing protein 1
	THY1	Thy-1 membrane glycoprotein
	GNAO1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
	TTN	Titin
	GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2
	LRRC59	Leucine-rich repeat-containing protein 59
	MROH2B	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 2B
	C19orf66	UPF0515 protein C19orf66
	RRAS2	Ras-related protein R-Ras2
	G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1
	PRNP	Major prion protein
	CD59	CD59 glycoprotein
	YES1	Tyrosine-protein kinase Yes
	GNAI3	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha
	SSBP1	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial
	PGAM5	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial

	GNG12	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12
	ZFP62	Zinc finger protein 62 homolog
	C12orf75	Overexpressed in colon carcinoma 1 protein
	RTTN	Rotatin
	IMMT	MICOS complex subunit MIC60
	GNB2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2
	TENM1	Teneurin-1
	CHCHD3	MICOS complex subunit MIC19
	ABCD3	ATP-binding cassette sub-family D member 3
	SCN4A	Sodium channel protein
	LLPH	Protein LLP homolog
	RFTN1	Raftlin
	ZCCHC3	Zinc finger CCHC domain-containing protein 3
	CD55	Complement decay-accelerating factor
	IQGAP3	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3
	NOC3L	Nucleolar complex protein 3 homolog
	SAMM50	Sorting and assembly machinery component 50 homolog
	ZNF812	Putative zinc finger protein 812
	BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2
	GPATCH4	G patch domain-containing protein 4
	G3BP2	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2
	FMR1	Fragile X mental retardation protein 1
	ODF2	Outer dense fiber protein 2
	LEMD2	LEM domain-containing protein 2
	IPO5	Importin-5
	CCT8	T-complex protein 1 subunit theta
	FXR1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1
	CD44	CD44 antigen
	RCN2	Reticulocalbin-2
	PABPC1	Polyadenylate-binding protein 1
	GRSF1	G-rich sequence factor 1
	PTCD3	Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial
	DHX30	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30
	FASTKD2	FAST kinase domain-containing protein 2, mitochondrial
Régulation traductionnelle	EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E
	EIF3L	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L
	EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A
	EIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
	EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1
	LARP4	La-related protein 4
	ERAL1	GTPase Era, mitochondrial

CAPRIN1	Caprin-1
CSDE1	Cold shock domain-containing protein E1
ZFP36L1	Zinc finger protein 36, C3H1 type-like 1
LSM14B	Protein LSM14 homolog B
NCL	nucleolin
DAP3	28S ribosomal protein S29, mitochondrial
RPS28	40S ribosomal protein S28
RPS12	40S ribosomal protein S12
RPS10	40S ribosomal protein S10
RPS19	40S ribosomal protein S19
RPS3	40S ribosomal protein S3
RPS25	40S ribosomal protein S25
RPS21	40S ribosomal protein S21
RPS5	40S ribosomal protein S5
RPS18	40S ribosomal protein S18
RPS16	40S ribosomal protein S16
RPS29	40S ribosomal protein S29
RPS20	40S ribosomal protein S20
RPSA	40S ribosomal protein SA
RPS9	40S ribosomal protein S9
RPS8	40S ribosomal protein S8
RPS13	40S ribosomal protein S13
RPS24	40S ribosomal protein S24
RPS6	40S ribosomal protein S6
RPS2	40S ribosomal protein S2
RPS26	40S ribosomal protein S26
RPS23	40S ribosomal protein S23
RPS15	40S ribosomal protein S15
RPS17	40S ribosomal protein S17-like
RPS4X	40S ribosomal protein S4, X isoform
RPS14	40S ribosomal protein S14
RPS11	40S ribosomal protein S11
RPS15A	40S ribosomal protein S15a
RPL35	60S ribosomal protein L35
RPL27A	60S ribosomal protein L27a
RPL26	60S ribosomal protein L26
RPL10	60S ribosomal protein L10
RPL17	60S ribosomal protein L17
RPL26L1	60S ribosomal protein L26-like 1
RPL24	60S ribosomal protein L24
RPS3A	40S ribosomal protein S3a

RPL22L1	60S ribosomal protein L22-like 1
RPL19	Ribosomal protein L19
RPL5	60S ribosomal protein L5
RPL9	60S ribosomal protein L9
RPL28	60S ribosomal protein L28
RPL36	60S ribosomal protein L36
RPL13	60S ribosomal protein L13
RPL30	60S ribosomal protein L30
RPL11	60S ribosomal protein L11
RPL37A	60S ribosomal protein L37a
RPL12	60S ribosomal protein L12
RPL21	60S ribosomal protein L21
RPL14	60S ribosomal protein L14
RPLP2	60S acidic ribosomal protein P2
RPL18A	60S ribosomal protein L18a
RPL34	60S ribosomal protein L34
RPL13A	60S ribosomal protein L13a
RPL27	60S ribosomal protein L27
RPL3	60S ribosomal protein L3
RPL6	60S ribosomal protein L6
RPL4	60S ribosomal protein L4
RPS27	40S ribosomal protein S27
RPL15	Ribosomal protein L15
RPL8	60S ribosomal protein L8
RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0
RPL35A	60S ribosomal protein L35a
RPL10A	60S ribosomal protein L10a
RPL18	60S ribosomal protein L18
RPL32	60S ribosomal protein L32
FAU	40S ribosomal protein S30
RPL7A	60S ribosomal protein L7a
RPL7	60S ribosomal protein L7
RPS7	40S ribosomal protein S7
RPLP1	60S acidic ribosomal protein P1
RPL23A	60S ribosomal protein L23a
RPL29	60S ribosomal protein L29
RPS27L	40S ribosomal protein S27
MRPL15	39S ribosomal protein L15, mitochondrial
MRPL4	39S ribosomal protein L4, mitochondrial
MRPS16	28S ribosomal protein S16, mitochondrial
MRPS24	28S ribosomal protein S24, mitochondrial

MRPL24	39S ribosomal protein L24, mitochondrial
MRPL43	39S ribosomal protein L43, mitochondrial
MRPS14	28S ribosomal protein S14, mitochondrial
MRPS28	28S ribosomal protein S28, mitochondrial
MRPS9	28S ribosomal protein S9, mitochondrial
MRPS22	28S ribosomal protein S22, mitochondrial
MRPL22	39S ribosomal protein L22, mitochondrial
MRPS33	28S ribosomal protein S33, mitochondrial
MRPL49	39S ribosomal protein L49, mitochondrial
MRPS15	28S ribosomal protein S15, mitochondrial
MRPS27	28S ribosomal protein S27, mitochondrial
MRPL13	39S ribosomal protein L13, mitochondrial
MRPS26	28S ribosomal protein S26, mitochondrial
MRPS5	28S ribosomal protein S5, mitochondrial
MRPS31	28S ribosomal protein S31, mitochondrial
MRPS34	28S ribosomal protein S34, mitochondrial
MRPS6	28S ribosomal protein S6, mitochondrial
MRPL41	39S ribosomal protein L41, mitochondrial
MRPS23	28S ribosomal protein S23, mitochondrial
MRPL17	39S ribosomal protein L17, mitochondrial
MRPS25	28S ribosomal protein S25, mitochondrial
MRPS2	28S ribosomal protein S2, mitochondrial
MRPL12	39S ribosomal protein L12, mitochondrial
MRPL27	39S ribosomal protein L27, mitochondrial
MRPS7	28S ribosomal protein S7, mitochondrial
MRPL3	39S ribosomal protein L3, mitochondrial
MRPS18B	28S ribosomal protein S18b, mitochondrial
MRPS35	28S ribosomal protein S35, mitochondrial
MRPL38	39S ribosomal protein L38, mitochondrial
MRPL42	39S ribosomal protein L42, mitochondrial
MRPL23	39S ribosomal protein L23, mitochondrial
