

HAJER BOUTEJ

**IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE  
MODULATEURS NATURELS ET  
SYNTHETIQUES DU FACTEUR DE  
TRANSCRIPTION AIBZIP**

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en Physiologie-Endocrinologie  
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (PhD)

DÉPARTEMENT DE MÉDECINE MOLÉCULAIRE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2011

© HAJER BOUTEJ, 2011



## Résumé

Androgen-induced bZIP (AibZIP) a été identifié au début des années 2000 dans le cadre d'une étude visant à identifier des gènes régulés par les androgènes. Chez l'homme, ce facteur est très abondant au niveau de la prostate et présente une expression beaucoup plus importante au niveau des cellules cancéreuses prostatiques. L'analyse de la structure d'AibZIP a révélé la présence d'un domaine bZIP. Ce domaine constitue la signature de la famille ATF/CREB, d'où l'appartenance d'AibZIP à cette famille. Durant la dernière décennie, 4 autres membres de la famille ATF/CREB ont été découverts et, avec AibZIP, ils constituent la sous-famille de CREB3. Au-delà de l'homologie observée entre leurs domaines bZIP, les membres de cette sous-famille sont impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique (RE).

AibZIP est une protéine transmembranaire de type II localisée au RE sous sa forme inactive. En effet, la protéine AibZIP pleine longueur est ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique via son domaine transmembranaire et orientée de sorte que son domaine C-terminal se trouve dans la lumière du RE alors que son domaine N-terminal est projeté dans le cytoplasme. Des expériences réalisées par notre équipe ont montré qu'AibZIP est régulée par le mécanisme RIP. En effet, suite à l'altération des concentrations calciques, nous observons la migration de la forme pleine longueur d'AibZIP vers l'appareil de Golgi où elle va subir un clivage protéolytique par les protéases S1P et S2P. La forme active libérée migre au noyau où elle va réguler l'expression de ses gènes cible via les éléments de réponse UPRE et ERSEII.

Lors de mes études doctorales, j'ai tenté de déterminer comment AibZIP est impliquée dans le stress du RE des cellules prostatiques cancéreuses et quels sont les mécanismes impliqués dans son activation et dans la régulation de ses gènes cibles.

Dans un premier temps, j'ai tenté d'inhiber l'activité transcriptionnelle d'AibZIP. Pour ce faire, j'ai généré et caractérisé un dominant négatif en utilisant l'algorithme développé par Mason et collaborateurs. Ce dominant négatif est capable de lier la forme nucléaire d'AibZIP de type sauvage, de l'empêcher de lier les éléments de réponse et par conséquent d'inhiber son activité transcriptionnelle.

J'ai tenté, dans un deuxième temps, d'identifier les partenaires de la forme pleine longueur d'AibZIP, quand celle-ci se trouve au RE. Dans le but de mieux comprendre le mécanisme

d'action impliqué dans l'activation d'AibZIP, il était nécessaire de connaître les partenaires d'AibZIP au RE. Grâce à cette étude, plusieurs protéines ont été identifiées. Ces protéines sont localisées au RE ou à l'appareil de golgi. Elles sont transmembranaires ou solubles et peuvent être impliquées dans la rétention d'AibZIP au RE ou dans son transport vers les autres organites.

Dans un troisième temps, j'ai tenté d'identifier les partenaires de la forme nucléaire d'AibZIP. *WD repeat domain 5* (WDR5) est une des partenaires d'AibZIP au noyau. WDR5 présente 7 répétitions WD40 formant une structure rigide nécessaire pour les interactions protéine-protéine. De plus, elle est impliquée dans la tri-méthylation de l'histone H3. En réponse au stress du RE déclenché par une déplétion des concentrations calciques, AibZIP est activée par le mécanisme RIP. Une fois au noyau, la forme active d'AibZIP, sous forme de dimères, recrute WDR5 au niveau de l'ADN. Ce recrutement est nécessaire pour modifier la chromatine, la rendre accessible à la machinerie de la transcription et par conséquent activer l'expression des gènes cibles d'AibZIP.

Ensemble, toutes ces données permettront de mieux comprendre la régulation d'AibZIP et la régulation de ses gènes cibles et ainsi cerner son rôle dans la réponse au stress du RE dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines.

## **Abstract**

Androgen-induced bZIP (AibZIP) was identified in 2002 as an androgen-regulated gene. In humans, AibZIP is more abundant in the prostate and has a much higher expression level in prostate cancer cells. AibZIP belongs to the ATF/CREB family. Indeed, the analysis of its structure revealed the presence of a bZIP domain, the signature of this transcription factor's family. During the last decade, four other members from the ATF/CREB family were discovered and, with AibZIP, they constitute the CREB3 subfamily. Beyond the homology observed between their bZIP domains, members of this subfamily are involved in endoplasmic reticulum stress (ER).

AibZIP is a type II transmembrane protein localized to the ER in its inactive form. Indeed, the full length protein AibZIP is anchored to the endoplasmic reticulum membrane via its transmembrane domain. Its C-terminal domain is located in the ER lumen, whereas its N-terminal domain is projected into the cytoplasm. We have shown that AibZIP is regulated by the RIP mechanism. Following the alteration of calcium concentrations, the active form of AibZIP is released by a proteolytic cleavage into the nucleus, where it will regulate the expression of its target genes.

During my doctoral studies I examined how AibZIP is involved in ER stress in prostate cancer cells and what mechanisms are involved in its activation and regulation of its target genes.

First, I tried to inhibit the transcriptional activity of AibZIP. To do this, I generated and I characterized a dominant negative inhibitor using the algorithm developed by Mason and Coll. This dominant negative is able to bind to the wild type nuclear form of AibZIP and thereby inhibit its transcriptional activity.

Then, I tried to identify partners of AibZIP when it is localised to the ER to better understand the mechanism involved in its activation. Through this study, several proteins that localized to the ER or Golgi apparatus were identified. These proteins are transmembrane or soluble and can be involved in the retention of AibZIP to the ER or in its transport to other organelles.

Finally, I tried to identify protein partners of the nuclear form of AibZIP. WD repeat domain 5 (WDR5) is the first identified partner of AibZIP. WDR5 has seven WD40 repeats necessary for protein-protein interactions. In addition, it is involved in the tri-methylation

of histone H3. In response to ER stress triggered by depletion of calcium concentrations, AibZIP is activated by the RIP mechanism. Once into the nucleus, the active dimeric form of AibZIP recruits WDR5 at the DNA. This recruitment is necessary to modify the chromatin, making it accessible to the transcription machinery and therefore activate the expression of target genes of AibZIP.

Together, these data will allow us to better understand the activation of AibZIP and the regulation of its target genes and thus identify its role in the response to ER stress in human prostate cancer cells.

## **Avant-Propos**

*Rédigez «l'Avant-Propos» a constamment été repoussé à plus tard mais concrètement, ces quelques lignes soulignent la fin d'une aventure et le début d'une autre. Une aventure qui a commencé le 02 septembre 2002 quand je suis arrivée à Québec pour faire une maîtrise en Physiologie-Endocrinologie. Cette aventure m'a permis de faire de nouvelles connaissances et de découvrir une nouvelle culture.*

*Tout d'abord, j'exprime toute ma gratitude à mon directeur de thèse, le Dr Claude Labrie, qui m'a permis d'entreprendre cette formation scientifique en m'accueillant dans son laboratoire. Je tiens aussi à le remercier pour sa confiance, ses conseils et surtout pour son optimisme. Un optimisme qui m'a grandement aidé à toujours garder le moral.*

*Un grand merci à mes collègues de travail et amis: Andréa Fournier, Mélissa Pelletier, Julie Lessard, Sonia Ben Aïcha, Sonia Djebbar, Jin Choi, Nicolas Leveillé, Christine Bareil, Éliane Lavergne et toutes les personnes que je croise tous les jours au 3<sup>ème</sup> étage du bloc T. Merci pour votre aide, pour vos conseils et surtout pour les bons moments qu'on a passé ensemble, pour les discussions pertinentes et moins pertinentes, les fou rires, les gaffes et j'en passe. Grâce à vous, ces années étaient beaucoup plus joyeuses malgré certaines périodes remarquablement difficiles au niveau scientifique.*

*Merci également à mes amis ici à Québec et à Tunis de votre soutien, de votre écoute et de tous ces moments incroyables partagés avec vous.*

*Je dois mille mercis à mon papa Houcine, à ma maman Jouda ainsi qu'à mon frère Mahdi pour leur support moral, leur encouragement et leur présence malgré qu'ils soient très loin physiquement. Merci à mes tantes, à mes oncles, à mes cousins et cousines pour leurs encouragements. À mes beaux-parents Abdelkader et Henda, merci de toujours vous faire du souci pour nous.*

*Merci à toi Saïd pour ton amour, ta patience, ton encouragement et aussi pour ta compréhension pour mes nombreuses heures de travail et surtout pendant la dernière année. Merci de m'appuyer dans tout ce que j'entreprends et de m'encourager dans toutes mes aventures.*

*Enfin je dédie cette thèse aux victimes de la révolution Tunisienne (Décembre 2010/Janvier 2011). Un merci du coeur au grand peuple Tunisien pour la révolution historique qu'il a menée avec bravoure et courage. Aujourd'hui, le destin nous appartient mais le chemin est encore long.*



***Ce n'est pas la force, mais  
la persévérance, qui fait les  
grandes œuvres.***

*Samuel Johnson*

***Laisser vivre vos rêves.***



# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Avant-Propos</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xii</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>xiii</b>
<b>Liste des abréviations :</b>	<b>xvi</b>
<b>Chapitre 1: Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1. Mise en situation</b>	<b>1</b>
<b>2. Réticulum endoplasmique</b>	<b>3</b>
2.i Généralités	3
2.ii Rôle du RE dans une cellule en état normal	5
2.iii Rôle du RE suite à un stress	10
2.iii.i Le RE est un bon détecteur de stress	10
2.iii.ii Réponse au stress du réticulum endoplasmique	12
2.iv À la vie, à la mort: décision du réticulum endoplasmique	15
2.v Réticulum endoplasmique : entre santé et maladies	17
<b>3. Le noyau</b>	<b>19</b>
3.i Généralités	19
3.ii La transcription	20
3.ii.i Facteurs de transcription	21
3.ii.i.i Définition	21
3.ii.i.ii La dimérisation	23
3.ii.i.iii La dimérisation : une cible thérapeutique	24
3.ii.ii Co-activateurs et co-répresseurs	24
3.ii.iii Modification de l'ADN	24
3.ii.iii.i Acétylation des histones	24
3.ii.iii.ii Phosphorylation des histones	25
3.ii.iii.iii Méthylation des histones	25
<b>4. La famille ATF/CREB</b>	<b>27</b>
4.i Introduction : famille des bZIP	27
4.ii Structure du domaine bZIP :	28
4.iii Membres de la sous-famille de CREB3	30
4.iv CREB3:	33
4.iv.i CREB3 est un partenaire du facteur HCF-1	33
4.iv.ii Caractérisation du facteur de transcription CREB3	34
4.iv.iii CREB3 est impliquée dans le stress du RE	35
4.iv.iv Zhangfei est un inhibiteur puissant de CREB3	36
4.iv.v CREB3 lie la protéine du virus de l'hépatite C	37
4.iv.vi HCF-like: un autre inhibiteur de l'activité de CREB3	37
4.iv.vii CCR-1: un autre partenaire de CREB3	38
4.iv.viii CREB3 est séquestrée au noyau par la protéine LRF	40
4.iv.ix HDAC3 inhibe l'activité de CREB3	40

4.iv.x	La protéine DC-STAMP lie le domaine régulateur de CREB3	41
4.v	OASIS	42
4.v.i	Caractérisation de la protéine OASIS	42
4.v.ii	OASIS est impliquée dans le développement des os et du bourgeon dentaire	43
4.v.iii	OASIS est impliquée dans la réponse au stress du RE	43
4.v.iv	Souris déficiente OASIS <sup>-/-</sup>	47
4.v.v	La protéine Syncytine-1 régule l'expression d'OASIS	47
4.v.vi	Les facteurs CREB et OASIS régulent l'expression du facteur de transcription GMCa	48
4.vi	BBF2H7	50
4.vi.i	Identification du facteur chimère FUS-BBF2H7	50
4.vi.ii	BBF2H7 est régulée par le mécanisme RIP	51
4.vi.iii	Le rôle de BBF2H7 dans le cerveau endommagé	53
4.vi.iv	Souris déficiente Bbf2h7 <sup>-/-</sup>	54
4.vi.v	Sec23a est un gène cible de BBF2H7	54
4.vi.vi	BBF2H7 régule l'expression du facteur ATF5, un autre membre de la famille ATF/CREB	56
4.vi.vii	Identification de la protéine de fusion BBF2H7-PPAR $\gamma$	56
4.vii	CREBH :	58
4.vii.i	Caractérisation du facteur de transcription CREBH	58
4.vii.ii	Homologues de CREBH chez <i>C. elegans</i> et chez la souris	59
4.vii.iii	Caractérisation de la forme murine de CREBH	60
4.vii.iv	CREBH est régulée par le mécanisme RIP	61
4.vii.v	Gènes cibles de CREBH	62
4.vii.vi	Le facteur HNF4 $\alpha$ régule l'expression de CREBH	62
4.vii.vii	L'expression de la protéine CREBH est régulée par les nutriments	63
5.	<b>AlbZIP</b>	<b>65</b>
5.i	Prostate et cancer de la prostate	65
5.ii	Gènes régulés par les androgènes	68
5.iii	AlbZIP	69
5.iii.i	Introduction	69
5.iii.ii	Structure	69
5.iii.iii	AlbZIP est régulé par les androgènes	71
5.iii.iv	Profil d'expression d'AlbZIP	73
5.iii.v	Surexpression d'AlbZIP au niveau du cancer de la prostate	75
5.iii.vi	AlbZIP chez les autres espèces	77
5.iii.vii	AlbZIP est régulée par le mécanisme RIP	82
5.iii.viii	Gènes régulés par AlbZIP	84
6.	<b>Approches expérimentales</b>	<b>88</b>
6.i	Introduction	88
6.ii	Lignée cellulaire LNCaP	88
6.iii	Système inductible :	89
6.iv	Génération de dominants négatifs :	90
6.v	Purification par affinité en tandem et Immunopurification	91
7.	<b>Problématique et objectifs de recherche</b>	<b>94</b>
<b>Chapitre 2: Combining an acidic extension with an optimized leucine zipper produces a potent dominant negative inhibitor of a stress-regulated bZIP transcription factor</b>		<b>96</b>
1.	<b>Résumé</b>	<b>97</b>
2.	<b>Abstract</b>	<b>97</b>

<b>3.</b>	<b>Introduction</b>	<b>98</b>
<b>4.</b>	<b>Materials and methods</b>	<b>100</b>
4.i	Cell lines	100
4.ii	Estimation of T <sub>m</sub> values	101
4.iii	Firefly luciferase reporter constructs and luciferase assays	101
4.iv	Expression vectors	101
4.v	Immunoblotting	102
4.vi	Immunofluorescence	103
4.vii	Co-immunoprecipitation	103
<b>5.</b>	<b>Results</b>	<b>104</b>
5.i	<i>In silico</i> optimization of the AlbZIP leucine zipper	104
5.ii	Optimized leucine zippers exert dominant negative activity <i>in vivo</i>	107
5.iii	Combining optimized zippers with acidic amphipathic helices	109
5.iv	Inhibitory activity of AZM15N in stable cell lines	113
5.v	Specificity of AZM15N	114
<b>6.</b>	<b>Discussion</b>	<b>115</b>
<b>Chapitre 3 : Protéines qui interagissent avec la forme pleine longueur d'AlbZIP</b>		<b>121</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction</b>	<b>121</b>
<b>2.</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>125</b>
2.i	Lignées cellulaires	125
2.ii	Extraction des protéines solubles et purification des partenaires d'AlbZIP	125
2.iii	Digestion des protéines	126
2.iv	Spectrométrie de masse	127
2.v	Recherche dans la base de données	127
2.vi	Critères pour l'identification des protéines	128
2.vii	Analyse et validation des résultats	128
2.viii	Immunoprécipitation	129
2.ix	Production, purification des protéines de fusion GST, synthèse <i>in vitro</i> et pull down	129
2.x	Immunofluorescence	131
<b>3.</b>	<b>Résultats</b>	<b>131</b>
3.i	Partenaires d'AlbZIP (clone 43-3)	131
3.ii	Candidats choisis dans la liste des gènes régulés par la forme nucléaire d'AlbZIP	132
3.iii	Localisation subcellulaire des candidats	133
3.iv	La forme pleine longueur d'AlbZIP interagit <i>in vivo</i> avec ses partenaires	135
3.v	Les candidats identifiés s'associent à la forme pleine longueur d'AlbZIP <i>in vitro</i>	136
<b>4.</b>	<b>Discussion</b>	<b>139</b>
<b>5.</b>	<b>Matériel supplémentaire</b>	<b>142</b>
<b>Chapitre 4: Protéines qui interagissent avec la forme nucléaire d'AlbZIP</b>		<b>146</b>
<b><i>WDR5, a histone methyltransferase adaptor protein, participates in transcriptional activation by the processed form of the ER stress-regulated transcription factor AlbZIP</i></b>		<b>151</b>
<b>1.</b>	<b>Résumé</b>	<b>151</b>
<b>2.</b>	<b>Abstract</b>	<b>152</b>
<b>3.</b>	<b>Introduction</b>	<b>152</b>

<b>4.</b>	<b>Materials and methods</b>	<b>154</b>
4.i	Cell lines	154
4.ii	Whole cell extracts	154
4.iii	Large scale co-immunoprecipitation experiment	155
4.iv	Protein in-gel digestion	155
4.v	Mass spectrometry	155
4.vi	Database searching	156
4.vii	Criteria for protein identification	156
4.viii	Candidate protein validation by co-IP	157
4.ix	Production of GST fusion proteins	158
4.x	Pull down assays	158
4.xi	Luciferase assays	158
4.xii	Antibodies	159
4.xiii	ChIP	159
4.xiv	Immunostaining	159
4.xv	WDR5 knockdown in LNCaP cells	160
<b>5.</b>	<b>Results</b>	<b>160</b>
5.i	AlbZIP interacts with WDR5	160
5.ii	WDR5 interacts directly with AlbZIP	163
5.iii	WDR5 contributes to transcriptional activation by AlbZIP	164
5.iv	AlbZIP recruits WDR5 to the promoters of AlbZIP target genes	166
<b>6.</b>	<b>Discussion</b>	<b>168</b>
<b>Chapitre 5: Discussion et Conclusion</b>		<b>177</b>
<b>1.</b>	<b>Discussion</b>	<b>177</b>
<b>2.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>194</b>
<b>Bibliographie</b>		<b>196</b>

# Liste des tableaux

## Chapitre 1

Tableau 1 : liste des familles de chaperonnes du RE.....7

Tableau 2: Agents de stress. ....11

Tableau 3 : Gènes cibles d'AlbZIP sélectionnés pour la validation..... 85

## Chapitre 2

Table 1: The sequence of the wild-type leucine zipper of AlbZIP (aa 242-283) is shown above the sequences of the modified leucine zippers (M1 to M15).....105

## Chapitre 3

Tableau 1: Liste des partenaires de la forme pleine longueur d'AlbZIP.....132

Tableau 2: Liste des partenaires d'AlbZIP qui sont régulées par sa forme nucléaire.....133

Tableau 3 : Tableau récapitulatif.....141

# Liste des figures

## Chapitre 1

### Section 2

Figure 1-2-1 : Organisation d'une cellule eucaryote .....	3
Figure 1-2-2 : Illustration en 3 dimensions du réticulum endoplasmique en continuité avec le noyau .....	4
Figure 1-2-3 : Rôle des chaperonnes dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées .....	6
Figure 1-2-4 : Cycle Calreticuline/Calnexine .....	9
Figure 1-2-5 : Agents pharmacologiques provoquant un stress du RE .....	11
Figure 1-2-6 : Structure des trois effecteurs de l'UPR chez les mammifères .....	12
Figure 1-2-7 : La réponse au stress du RE : UPR .....	14
Figure 1-2-8 : Induction des voies de signalisation pro-apoptotiques de l'UPR .....	16
Figure 1-2-9 : La double face de la réponse au stress du RE .....	17

### Section 3:

Figure 1-3-1 : Organisation du noyau cellulaire chez les mammifères .....	20
Figure 1-3-2 : La chromatine .....	21
Figure 1-3-3 : Modèle de régulation transcriptionnelle .....	22
Figure 1-3-4 : Régulation de la transcription .....	26

### Section 4 :

Figure 1-4-1 : Représentation schématique et structure d'un dimère de glissière de leucine .....	30
Figure 1-4-2: Aligement des 5 membres de la sous-famille de CREB3 et comparaison des domaines bZIP des membres de la sous-famille de CREB3 .....	31



Figure 1-4-3: Probabilité d'appariement des membres de la sous-famille de CREB3 (OASIS, CREBH, CREB3 et CREB4/AIbZIP).....	32
--	----

### Section 5 :

Figure 1-5-1 : Représentation schématique de la protéine AIbZIP .....	70
Figure 1-5-2 : Localisation subcellulaire de la protéine AIbZIP .....	71
Figure 1-5-3 : AIbZIP est régulé par les androgènes .....	72
Figure 1-5-4: Profil d'expression d'AIbZIP .....	74
Figure 1-5-5 : AIbZIP est surexprimée au niveau du cancer de la prostate .....	76
Figure 1-5-6 : Représentation schématique de Tisp40 $\alpha$ et Tisp40 $\beta$ .....	78
Figure 1-5-7 : AIbZIP est régulée par le mécanisme RIP .....	84

### Section 6 :

Figure 1-6-1: Représentation schématique linéaire des vecteurs du système RhéoSwitch (original et modifié).....	90
Figure 1-6-2: Représentation schématique de la cassette TAP en N-ter .....	92
Figure 1-6-3: Vue d'ensemble de la stratégie de purification avec la résine Flag et avec la résine HA .....	93

## **Chapitre 2**

Figure 2-1: The AIbZIP leucine zipper .....	106
Figure 2-2: Dominant negative activity of optimized AIbZIP leucine zippers in LNCaP cells .....	108
Figure 2-3: Dominant negative activity of the AIbZIP leucine zipper fused to an acidic amphipathic extension .....	110
Figure 2-4: Dominant negative activity of the M15 leucine zipper fused to an acidic amphipathic extension .....	112
Figure 2-5: Inhibitory activity of AZM15N in a stable cell line .....	113
Figure 2-6: Interaction profile of AIbZIP and AZM15N with ER-bound CREB3-like transcription factors .....	115

### Chapitre 3

Figure 3-1 : Représentation schématique des différentes protéines de fusion utilisées pour la purification des partenaires de la forme pleine longueur d'AlbZIP .....	124
Figure 3-2: Localisation subcellulaire de la forme pleine longueur d'AlbZIP et de ses différents partenaires .....	134
Figure 3-3: La protéine AlbZIP interagit avec ses partenaires in vivo .....	136
Figure 3-4 : Validation des résultats de co-IP par essai de type «pull down» .....	137
Figure 3-5 : DNAJC12, KDELR3 et PLA2G2A interagissent directement avec AlbZIP .....	138

### Chapitre 4

Figure 4-I: CALCOCO1/COCOA, un nouveau partenaire d'AlbZIP identifié par spectrométrie de masse .....	149
Figure 4-1: Schematic domain structure of human WDR5 and AlbZIP.....	161
Figure 4-2: Transiently expressed WDR5 interacts with AlbZIP .....	161
Figure 4-3: WDR5 interacts with AlbZIP in vivo .....	162
Figure 4-4: WDR5 interacts directly with AlbZIP .....	164
Figure 4-5: WDR5 contributes to transcriptional activation by AlbZIP .....	166
Figure 4-6: Processed AlbZIP recruits WDR5 to regulatory elements .....	168
Supplementary Figure 1:WDR5 co-localizes with the processed form of AlbZIP in LNCaP cells .....	175
Supplementary Figure 2: Large scale co-immunoprecipitation experiment .....	176

### Chapitre 5

Figure 5-1 : Représentation schématique du promoteur du gène de CREB3 et COPZ1 ....	190
Figure 5-2 : Figure récapitulative .....	192

## Liste des abréviations :

aa : acides aminés

AARE: Amino acid response element

ADN: Acide désoxyribonucléique

AIbZIP: Androgen-Induced bZIP

AK: Acide kaïnique

ApoE : Apolipoprotéine E

APS/PSA: Antigène spécifique de la prostate

ARE: Androgen response elements

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ASCT1: Récepteur de la Syncytine

ASK1: Apoptosis signal-regulating kinase 1

Atcl1: Attaching to CRE-like 1

ATF/CREB: Activating transcription factor/ cAMP response element binding protein

ATF1: Activating transcription factor-1

ATF2: Activating transcription factor-2

ATF4: Activating transcription factor-4

ATF5: Activating transcription factor-5

ATF6: Activating transcription factor-6

ATP: Adénosine triphosphate

Bak: bcl-2 homologous antagonist-killer

Bax: Bcl-2-associated X protein

BBF2H7: BBF2 human homolog on chromosome 7

Bcl-2: factor B cell lymphoma-2

bHLH: basic Helix-loop-helix

BIP: immunoglobulin heavy-chain binding protein

BMP-2: Bone morphogenetic protein2

bZIP: basic leucine zipper domain

Cbfa1: Core binding factor alpha 1

CCR-1: C-C chemokine receptor type 1  
CCR-2: C-C chemokine receptor type 2  
Cf: Caféine  
CHOP: C/EBP homologous protein  
CNX : Calnexine  
COPII: Coat protein complex II  
CPI : Complexe de préinitiation  
CRE: cAMP response element  
CREB: cAMP-responsive element-binding protein  
CREB3: cAMP responsive element binding protein 3  
CREBH: CRE-binding and hepatocyte-specific factor  
CREM: cAMP-responsive element modulator  
CRP: Protéine C-réactive  
CRT: Calréticuline  
C-ter: COOH-terminal  
CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4  
DC-STAMP: Dendritic cell-specific transmembrane protein  
DHEA: Déhydroépiandrostérone  
DHEAS: Déhydroépiandrostérone sulfate  
DHT: Dihydrotestostérone  
DTT: Dithiothréitol  
DU145: Human prostate carcinoma epithelial like cell line  
E4BP4: E4 promoter-binding protein 4  
EDEM: ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like  
Egr1: Early growth response 1  
eIF2: Translation initiation factor 2  
Endo H: Endoglycosidase H  
ERAD: ER-associated degradation  
ERSE: ER stress response element  
FOS: FBJ osteosarcoma oncogene  
FSH: Hormone folliculo-stimulante

FTGs: Facteurs de transcription généraux  
FUS: Fused in sarcoma  
GFAP: Glial fibrillary acidic protein  
GFP: Green fluorescent protein  
Glycan: N-acetylglucosamine<sub>2</sub>-mannose<sub>9</sub>-glucose<sub>3</sub>  
GMCa: Chorion specific transcription factor  
GPT: GlcNAc phosphotransferase  
GRIP1: Glucocorticoid receptor interacting protein-1  
H3K4 : Lysine 4 de l'histone H3  
HATs: Histones acétyltransférases  
HBM: HCF-binding motif  
HCF-1: Host cell factor1  
HDACs: Histones déacétylases  
HEK293: Human Embyronic Kidney 293  
HeLa: Human epithelial carcinoma cell line  
Herp/Mif1: Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein  
HIRA: HIR histone cell cycle regulation defective homolog A  
HMTs: Méthyltransférases  
HNF4 $\alpha$ : Hepatocyte nuclear factor alpha  
HOS/CCR1: Human osteosarcoma expressing CCR1  
Hsp70: Heat shock protein 70  
Hsp90: Heat shock protein 90  
I : Ionomycine  
IL-6: Interleukine 6  
IL- $\beta$ : Interleukine  $\beta$   
iNOS: inducible nitric oxide synthase  
Ire1: Inositol-requiring enzyme 1  
I $\kappa$ B $\alpha$ : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha  
JNK: c-Jun N-terminal kinase  
JUN: Jun-proto-oncogene  
KO: knock out

Lkn-1: leukotactin-1  
LNCaP: lymph Node Carcinoma of the Prostate  
LPS: Lipopolysaccharide  
LRF: Lymphoma related factor  
MLL1: Mixed-lineage leukemia 1  
MLL2: mixed-lineage leukemia 2  
ND10: Nuclear domain 10  
NEF: Nucleotide exchange factor  
NF $\kappa$ B: nuclear factor of kappa B  
N-ter: NH<sub>2</sub>-terminal  
OASIS: old astrocyte specifically-induced substance  
Oct-1: Octamer transcription factor 1  
OST: Oligosaccharyltransferase  
PAP: Phosphatase acide prostatique humaine  
PAR/JTB : Jumping translocation breakpoint  
PC3: Prostate cancer cell line  
PCR: Polymerase chain reaction  
PDEF: Prostate derived ets transcription factor  
PDI: Disulfide isomérase  
PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase  
PERK: Pancreatic ER kinase (PKR)-like kinase  
PKA: Phosphokinase A  
PNGaseF: N-Glycosidase F  
Pol II: ARN polymérase II  
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor  
PPAR $\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma  
PPRE: Peroxisome proliferator responsive element  
RA: Récepteur des androgènes  
RE : réticulum endoplasmique  
RIP: Regulated Intramembrane Proteolysis  
RXR: Retinoid X receptor

RYR: Récepteur à la ryanodine  
S/T Kinase: sérine/thréonine kinase  
S1P: Site-1 protease  
S2P: Site-2 protease  
SAM: S-adénosine-méthionine  
SAP: Protéine amyloïde sérique  
SCAP: SREBP cleavage-activating protein  
SCIRR69: Spinal cord injury and regeneration related protein No.69  
SERCA: Sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase  
SFMBG: Sarcome fibromyxoïde de bas grade  
SREBP: Sterol regulatory element binding protein  
TAFs: Transcription-associated factors  
TAP: Tandem affinity purification  
TBP: boîte TATA  
TEV: Virus Etch du tabac  
Tg: Thapsigargine  
THP-1: Human acute monocytic leukemia cell line  
Tisp40: Transcript induced in spermiogenesis 40  
Tm: Tunicamycine  
TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha  
TORC1: Transducer of regulated CREB activity  
TP1: Protéines de transition 1  
TP2: Protéines de transition 2  
TRAF2: Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2  
TSH: thyroïdostimuline  
TUNEL: dUTP nick end labeling  
U937: Human leukemic monocyte lymphoma cell line  
UGT1: UDP-glucuronosyl transferase 1  
uORFs: upstream open reading frame  
UPR: unfolded protein response  
UPRE: Unfolded protein response element

VHC: Virus de l'hépatite C

VHS: Virus de l'herpès simplex

XBP1: Xbox-binding protein 1



# Chapitre 1: Introduction

## 1. Mise en situation

Androgen Induced **bZIP** (A**IbZIP**) a été découvert en 2002 par l'équipe du Dr. Claude Labrie dans le cadre d'études portant sur l'identification des gènes régulés par les androgènes au niveau des cellules cancéreuses prostatiques humaines. À ce moment là, tout était à découvrir sur ce nouveau gène et le défi était de taille. Au cours des dix dernières années, 4 autres membres de la famille ATF/CREB ont été identifiés et avec A**IbZIP** ils forment la sous-famille de CREB3. Ce regroupement se compose de CREB3/Luman (*cAMP responsive element binding protein 3*), d'OASIS/CREB3L1 (*old astrocyte specifically-induced substance*), de BBF2H7/CREB3L2 (*BBF2 human homolog on chromosome 7*), de CREBH/CREB3L3 (*CRE-binding and hepatocyte-specific factor*) et d'A**IbZIP**/CREB3L4. Au-delà de la forte homologie observée entre leurs domaines bZIP, ces facteurs de transcription incarnent une sous-famille de bZIP impliquée dans le stress du réticulum endoplasmique (RE). En effet, la perturbation de l'homéostasie de la cellule entraîne une réponse adaptative appelée *unfolded protein response* (UPR) dont le joueur clé est le mécanisme RIP (*Regulated Intramembrane Proteolysis*). Les différents membres de la sous-famille de CREB3 sont activés par ce mécanisme mais chacun est sollicité dans un contexte particulier.

La caractérisation d'A**IbZIP** a révélé plusieurs points intéressants pour la suite de l'étude de son rôle dans la cellule. A**IbZIP** est régulée par les androgènes et chez l'homme, la protéine est exprimée faiblement dans plusieurs tissus mais elle est très abondante au niveau de la prostate. De surcroît, son expression est beaucoup plus importante au niveau des cellules cancéreuses prostatiques comparativement aux cellules saines. De plus, en décortiquant la structure d'A**IbZIP**, nous avons constaté la présence de deux domaines fonctionnels importants pour son mécanisme d'action. Le premier, en N-terminal, comporte le domaine d'activation de la transcription et le domaine bZIP et le deuxième, en C-terminal, comprend le domaine régulateur et le domaine transmembranaire.

Dans le but de comprendre le mécanisme d'action d'A**IbZIP**, j'ai dans un premier temps tenté d'inhiber l'activité transcriptionnelle d'A**IbZIP** en générant un dominant négatif qui

va lier avec une grande affinité sa glissière de leucine. Cette dernière a d'ailleurs servi comme matrice pour la conception du dominant négatif. Pour ce faire la composition en acides aminés de la glissière d'AlbZIP a été modifiée dans le but d'augmenter son affinité pour la glissière de leucine naturelle. L'hétérodimère (AlbZIP-mutant) qui va se former ne pourra pas lier l'élément de réponse au niveau du promoteur du gène cible. J'ai utilisé l'algorithme développé par le Dr Mason pour estimer la température de fusion de chaque hétérodimère. De plus, l'activité et l'affinité des mutants les plus prometteurs ont été testées à l'aide d'essai luciférase.

Toujours dans l'optique de déterminer le mécanisme d'action d'AlbZIP, j'ai dans un deuxième temps tenté d'identifier les partenaires *in vivo* d'AlbZIP. Nous savons que sous sa forme inactive AlbZIP est ancrée au réticulum endoplasmique de sorte que son domaine C-terminal est plongé dans la lumière de ce dernier et que son domaine N-terminal est orienté vers le cytoplasme. Nous pensons qu'à l'image de la chaperonne BIP (*Binding immunoglobulin protein*) pour ATF6 (*activating transcription factor 6*), de SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) pour SREBP (*Sterol regulatory element binding protein*) et de DC-STAMP (*Dendritic cell-specific transmembrane protein*) pour CREB3, il y a une protéine de nature indéterminée qui lierait le domaine C-terminal d'AlbZIP et jouerait un rôle régulateur. Nous savons aussi qu'un stress du RE provoqué par une perturbation des niveaux calciques entraîne la libération de la forme active d'AlbZIP. Cette dernière s'en va au noyau où elle va lier l'élément de réponse, former un complexe protéique avec ses co-facteurs et recruter la machinerie de transcription pour activer l'expression de ses gènes cibles. Ceci m'amène au deuxième volet de mes travaux qui a porté sur l'identification des protéines qui interagissent avec les domaines C et N terminaux. Pour ce faire, les protéines associées à AlbZIP ont été purifiées par chromatographie puis séquencées par spectrométrie de masse. Les résultats de ces deux volets seront présentés plus loin dans cette thèse. Ils seront d'abord précédés par une introduction qui abordera les deux compartiments cellulaires d'AlbZIP qui sont le réticulum endoplasmique et le noyau, la famille ATF/CREB et la sous-famille de CREB3.

## 2. Réticulum endoplasmique

### 2.i Généralités

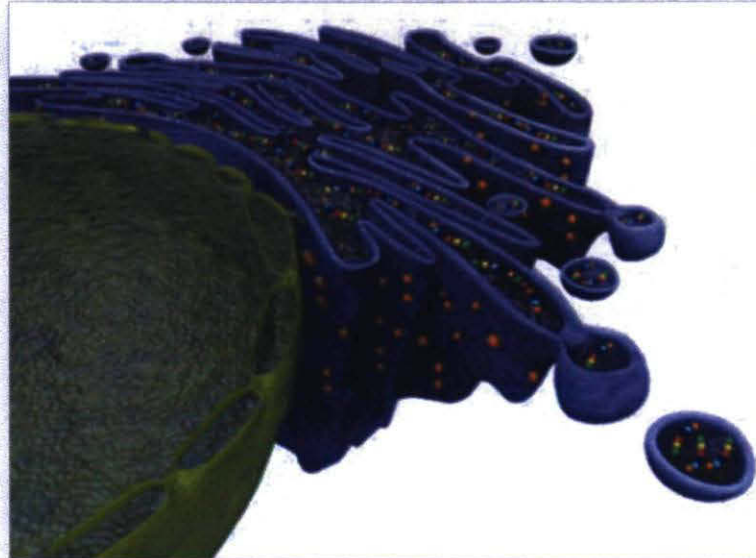
L'organisation structurée de la cellule eucaryote attribue à chaque compartiment une fonction spécialisée. Cette compartimentation est due à la présence de membranes intracellulaires qui définissent les différents organites (Mandl, Meszaros et al. 2009) (Figure 1-2-1).

Malgré cette délimitation, la cellule eucaryote constitue un espace d'échanges important. En effet, la communication entre les différents compartiments se fait grâce à la continuité des membranes permettant ainsi un échange de matériaux entre eux.



**Figure 1-2-1:** Organisation d'une cellule eucaryote. Noyau (1), réticulum endoplasmique (2), appareil de golgi (3), mitochondrie (4), cytoplasme (5), centrosomes (6). Adaptée de « *La cellule animale, un voyage au cœur du vivant* »; numéro 67, avril 2008.

Le premier organe qui nous intéresse dans le cadre de cette thèse est le réticulum endoplasmique (RE).



**Figure 1-2- 2:** Illustration en 3 dimensions du réticulum endoplasmique en continuité avec le noyau. Adaptée de « *La cellule animale, un voyage au cœur du vivant* »; numéro 67, avril 2008.

Le RE constitue notamment 50 % des membranes cellulaires totales chez les eucaryotes. Il est en continuité avec l'enveloppe nucléaire (Figure 1-2-2) et en relation avec l'appareil de Golgi. Il s'agit d'un microenvironnement créé par la compartimentation de la cellule eucaryote qui est divisée en plusieurs sous-domaines selon leur fonction ou leur localisation (Fagone and Jackowski 2009). La membrane du RE est un ensemble de 2 couches bilipidiques riche en protéines entourant une lumière constituant une plateforme importante pour diverses réactions enzymatiques comme, par exemple, la synthèse du cholestérol et des phospholipides. Une partie de la membrane du RE est recouverte de ribosomes et présente un aspect rugueux d'où l'appellation RE rugueux. L'autre partie est sans ribosomes, il s'agit alors du RE lisse. De plus, cette membrane présente une perméabilité sélective, ne permettant ainsi qu'un transport sélectif de molécules, ce qui explique les

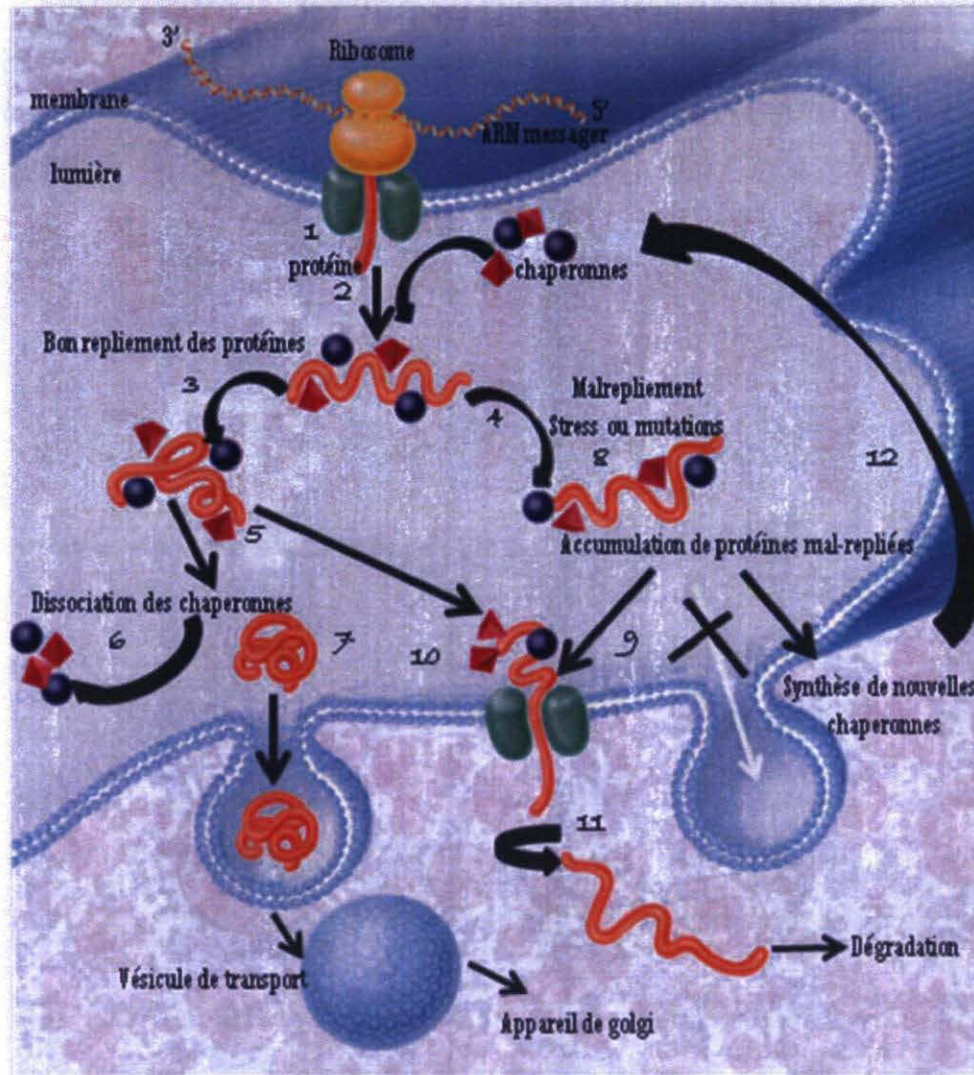
caractéristiques particulières de la lumière du RE (Mandl, Meszaros et al. 2009). En effet, le RE est le principal site de réserve de calcium. Ce calcium peut être libéré dans le cytoplasme en réponse à différents stimuli extracellulaires et servir de messager intracellulaire. Au niveau de la lumière, la concentration du calcium est plus importante qu'au niveau du cytosol grâce au transport actif par les pompes calcium-ATPases dépendantes. Ce calcium est essentiel au fonctionnement des chaperonnes impliquées dans le bon-repliement et le transport des protéines (Burdakov, Petersen et al. 2005). De plus, l'environnement de la lumière du RE est oxydatif (transfert des électrons du groupement cysteinyl-thiol vers l'oxygène par les oxydoréductases locales), caractéristique essentielle à la formation des ponts disulfures lors du repliement des protéines et formation de leur conformation tertiaire (Xu, Bailly-Maitre et al. 2005).

Le RE a suscité beaucoup d'intérêts ces dernières années parce qu'il est le siège de plusieurs processus essentiels à la cellule mais aussi parce qu'il s'est avéré important pour la communication entre les différents organites cellulaires.

## **2.ii Rôle du RE dans une cellule en état normal**

Tout d'abord, le RE est le site majeur de la synthèse des protéines membranaires ou destinées à la sécrétion. Au niveau du RE rugueux il y a assemblage des polypeptides. Les peptides nouvellement synthétisés passent dans le RE via le translocon (Nicchitta 2002). Le translocon est formé d'une partie centrale composée de plusieurs sous-unités de la protéine Sec61 et de ses protéines associées. L'ensemble constitue un canal cylindrique aligné avec la large sous-unité du ribosome formant ainsi un pore à environnement aqueux (Malhotra and Kaufman 2007) (figure 1-2-3). Une fois synthétisée, la protéine membranaire est intégrée à la couche bi-lipidique du RE alors que la protéine soluble est injectée dans la lumière du RE afin de subir sa maturation. Il a été observé que le repliement des protéines *in vitro* est spontané, ce qui démontre que l'information nécessaire à la configuration tridimensionnelle finale est présente au niveau de la séquence en acides aminés (Kuznetsov and Nigam 1998). Ce phénomène est assuré par une panoplie de protéines résidentes au niveau du RE, on peut citer les chaperonnes (BiP, Hsp70, Hsp40, Hsp90), les enzymes de repliement (ERp72, grp58) et les facteurs de contrôle qualité (Calreticuline, Calnexine),

tableau 1. Une des chaperonnes les plus étudiées est BiP (GRP78/HSPA5). Elle interagit avec la plupart des protéines au niveau du RE lors de leur maturation. Cette interaction est brève si le repliement se passe bien mais dans le cas contraire, l'interaction devient stable et suivie d'une dégradation (Kuznetsov and Nigam 1998).



**Figure 1-2-3:** Rôle des chaperonnes dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées. Le peptide synthétisé au niveau des ribosomes est introduit dans la lumière du RE via le translocon (1). Ces peptides sont alors pris en charge par les chaperonnes (2) et ainsi le processus de repliement commence. Une fois que la protéine a subi toutes les modifications post-traductionnelles (5), les chaperonnes (6) se dissocient de la protéine native (7) qui est transportée vers l'appareil de golgi par les vésicules de transport. Par contre, le mal-repliement des protéines (4) suite à une mutation ou à un stress provoque la

retenue des protéines mal-repliées au niveau du RE (8). Par conséquent, il y a synthèse de nouvelles chaperonnes (12) pour aider la cellule à surmonter l'accumulation de protéines mal-repliées. De plus ces dernières sont transportées vers le cytoplasme (9, 10) pour y être dégradées (11). Adaptée de « *Folding of secretory and membrane proteins* »; *The New England Journal of Medicine*, 1998.

Tableau 1: Liste des familles de chaperonnes du RE

Facteurs	Chez les mammifères
<b>Hsp70 : impliquée dans le contrôle qualité et assure le bon repliement des nouvelles protéines</b>	BiP/GRP78
<b>Hsp40 : est composée de 5 membres</b>	Erdj1-5
<b>NEF : catalyse la conversion de la GDP en GTP</b>	BAP (BiP associated protein)
<b>Hsp90 : assure le bon repliement des protéines</b>	Grp94
<b>Thiol oxidoréductases : catalysent l'oxydation, l'isomérisation et la réduction des ponts dissulfures</b>	PDI, PDIp, ERp57, ERp72
<b>Lectines : impliquées dans le système de contrôle qualité et la dégradation</b>	Calnexin, Calreticulin, EDEM1-3

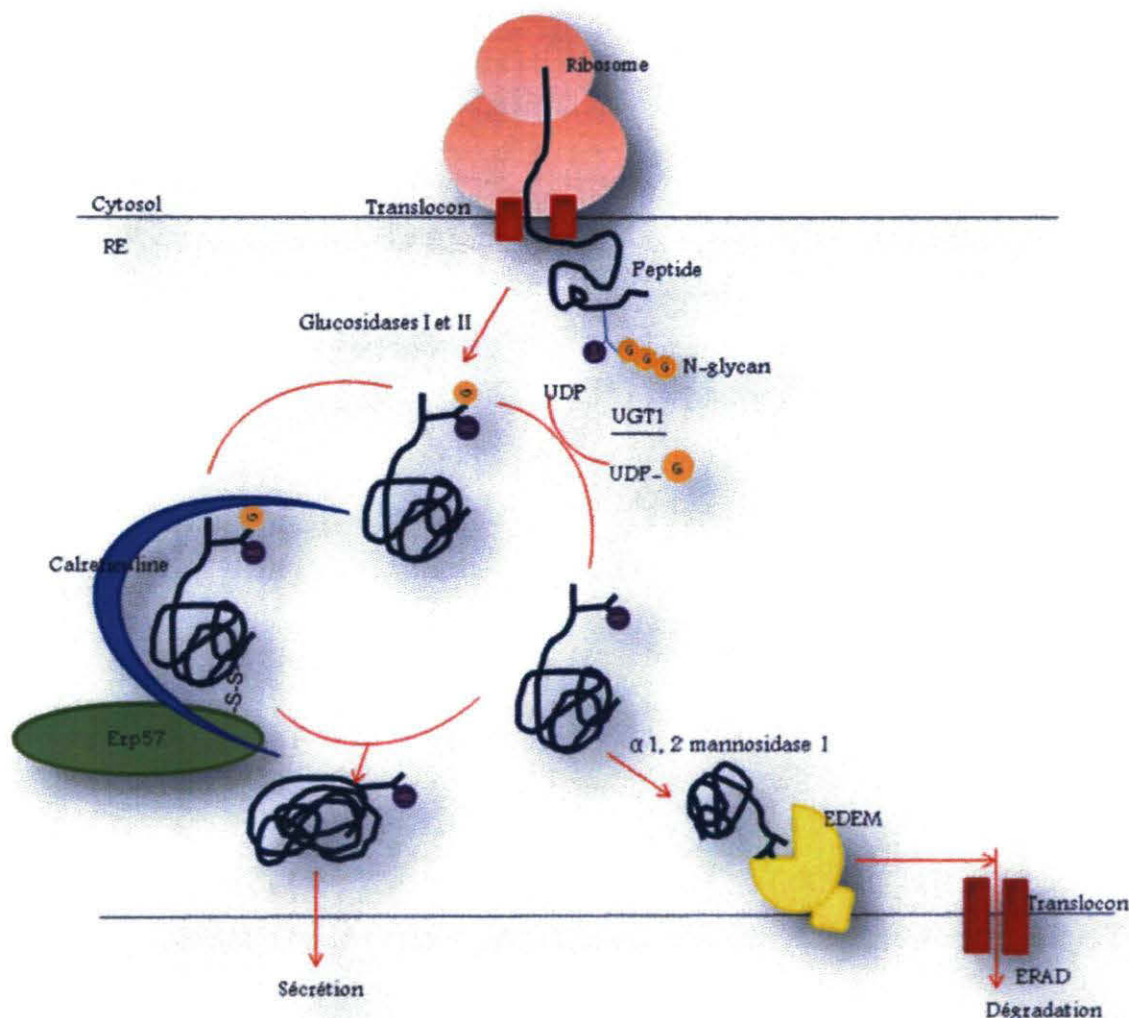
Une fois dans la lumière du RE, les protéines présentant la séquence Asn-X-Ser/Thr seront d'abord glycosylées par ajout de l'oligosaccharide N-acetylglucosamine<sub>2</sub>-mannose<sub>9</sub>-glucose<sub>3</sub> grâce à l'oligosaccharyltransferase (OST). Par la suite, les enzymes  $\alpha$  glucosidase I et II enlèvent deux résidus glucose pour obtenir un glycan monoglycosylé (Malhotra and Kaufman 2007) (figure 1-2-4). Les protéines monoglycosylées sont alors retenues au niveau du RE jusqu'à ce qu'elles subissent un bon repliement afin d'acquérir leur structure secondaire et tertiaire. Cette forme, qu'on appelle forme native, peut alors accéder à sa destination finale et bien assurer sa fonction. Il s'agit là d'une autre fonction importante du RE qu'on appelle le contrôle qualité. La monoglycosylation constitue, dans ce système, un

des moyens de marquage des protéines qui n'ont pas encore atteint leur conformation finale, c'est la première étiquette utilisée au niveau du RE pour signaler qu'une protéine n'est pas encore prête pour quitter le RE. Cette protéine est alors détectée par plusieurs effecteurs du RE et sera liée par une matrice de chaperonnes impliquant une interaction dynamique avec ce réseau.

Un des systèmes de contrôle de la qualité les plus décrits dans la littérature est le système calreticuline/calnexine (Ellgaard and Helenius 2003). Les protéines calreticuline et calnexine sont des lectines qui résident au niveau du RE. La première est une protéine soluble dans la lumière du RE alors que la deuxième est une protéine transmembranaire. Elles ont toutes les deux la particularité de lier les protéines monoglycosylées. À ce complexe calnexine/calreticuline-glycoprotéine s'ajoute la protéine Erp57, une oxidoréductase capable de former des ponts dissulfures de façon transitoire via un domaine en forme de bras ce qui aide au bon repliement des protéines (figure 1-2-4). Le complexe calnexine/calreticuline-glycoprotéine entre ensuite dans un cycle de déglucosylation/reglucosylation. D'une part, la glucosidase II dissocie la glycoprotéine de la calnexine ou de la calreticuline en hydrolysant le glucose du glycan et d'autre part, la glucosyltransferase : UDP-glucose (UGT1) remet le glucose au substrat permettant ainsi la réassociation de la glycoprotéine avec le complexe calnexine/calreticuline. Ce cycle continue jusqu'à ce que la protéine atteigne sa maturation ou qu'elle soit ciblée pour la dégradation (figure 1-2-4). À ce niveau, on parle de la deuxième étiquette utilisée par le système de contrôle qualité du RE qui est l'ubiquitination : modification nécessaire pour la dégradation. Pour ce faire, l'enzyme alpha 1,2-mannosidase I coupe un ou plusieurs mannoses situés au niveau du glycan (N-acetylglucosamine<sub>2</sub>-mannose<sub>9</sub>-glucose<sub>3</sub>) ce qui rend la protéine plus courte pour être reconnue pour la reglucosylation. La protéine mal repliée devient cible pour la rétrotranslocation au cytoplasme et, par conséquent, pour la dégradation par le mécanisme ERAD (*ER-associated degradation*) au niveau du protéasome 26s. L'ERAD constitue en effet la fonction centrale de dégradation des protéines de la cellule eucaryote (Dejgaard, Nicolay et al. 2004) et met en œuvre plusieurs effecteurs, entre autre le translocon, la machinerie d'ubiquitination, les protéines AAA ATPases (jouent le rôle de protéases), les chaperonnes du RE et du cytosol et leurs cofacteurs. Une des protéines largement caractérisée est EDEM (*ER degradation-*



*enhancing alpha-mannosidase-like*). Elle est localisée au RE, elle interagit avec le domaine COOH de la calnexine et ne présente pas d'activité mannosidase. Son expression est régulée positivement suite à un stress du RE via le facteur XBP1 ce qui accélère la dégradation des glycoprotéines mal repliées (Mast, Diekman et al. 2005). Une fois que la glycoprotéine est détachée du cycle calnexine/calreticuline, elle interagit alors avec EDEM et d'autres chaperonnes qui vont la rétrotransloquer au cytosol où elle sera ubiquitinée et dégradée par le protéasome (figure 1-2-4).



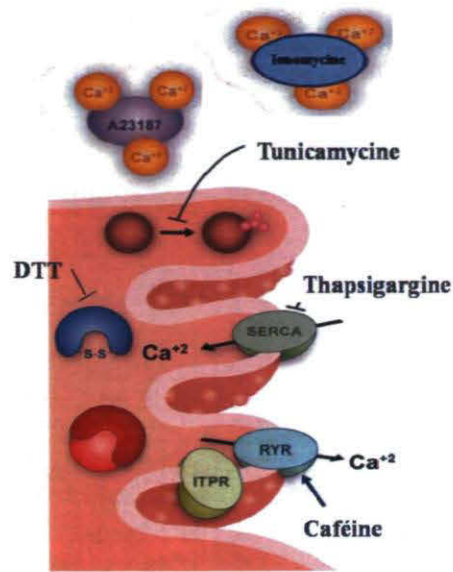
**Figure 1-2-4:** Cycle Calreticuline/Calnexine (pour la simplicité seule la calreticuline a été schématisée). Après l'ajout de l'oligosaccharide  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (Glc, G : glucose, cercle violet; Man, M : mannose, cercle orange et GlcNAc : N-acetylglucosamine) au peptide nouvellement synthétisé, deux glucoses sont enlevés par les glucosidases I et II. Nous obtenons une glycoprotéine monoglucosylée qui interagit avec la calreticuline et la

calnexine. Au complexe glycoprotéine-calréticuline/calnexine s'ajoute la chaperonne ERp57 nécessaire à la formation des ponts dissulfures. Le clivage du dernier glucose libère la glycoprotéine native du cycle calréticuline/calnexine qui sera destinée à la sécrétion. En parallèle si l'état mal-replié persiste, la protéine entre alors dans un cycle de reglucosylation/déglucosylation jusqu'à ce qu'elle atteigne la maturation. Dans le cas contraire, l'enzyme  $\alpha$  1,2 mannosidase I enlève un mannose pour qu'elle soit reconnue par la protéine EDEM (*ER degradation-enhancing 1,2-mannosidase-like protein*) et ciblée pour la dégradation par le mécanisme ERAD (*ER-associated degradation*). Adaptée de « *Quality Control In The Endoplasmic Reticulum* »; *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. (Ellgaard and Helenius 2003).

### 2.iii Rôle du RE suite à un stress

#### 2.iii.i Le RE est un bon détecteur de stress

Le réticulum endoplasmique est un organite métabolique impliqué dans toutes les voies du métabolisme cellulaire. Il est équipé d'un système d'adaptation qui permet de maintenir la balance équilibrée entre la demande en protéines bien repliées et la capacité d'en produire. La perturbation du niveau d'énergie cellulaire, de l'état de redox, de l'apport en nutriments ou en oxygène ou de la concentration du calcium suite à une hypoxie, à un stress oxydatif ou à une hypoglycémie réduit la capacité du RE à replier les protéines nouvellement synthétisées et par conséquent provoque une accumulation de protéines mal repliées, d'où l'observation d'un stress du RE (Ma and Hendershot 2002; Mandl, Meszaros et al. 2009). Plusieurs agents pharmacologiques sont disponibles pour mimer l'effet d'un stress du RE. Ces agents peuvent affecter la concentration calcique du RE, la glycosylation ou la formation des ponts disulfures (figure 1-2-5, tableau 2). Toutefois, la cellule développe des capteurs et des mécanismes de signalisation adaptés pour donner des réponses appropriées. Ces réponses servent à réajuster le métabolisme aux changements de l'environnement. Dans ce cas-ci on parle de l'UPR : *Unfolded protein response*.



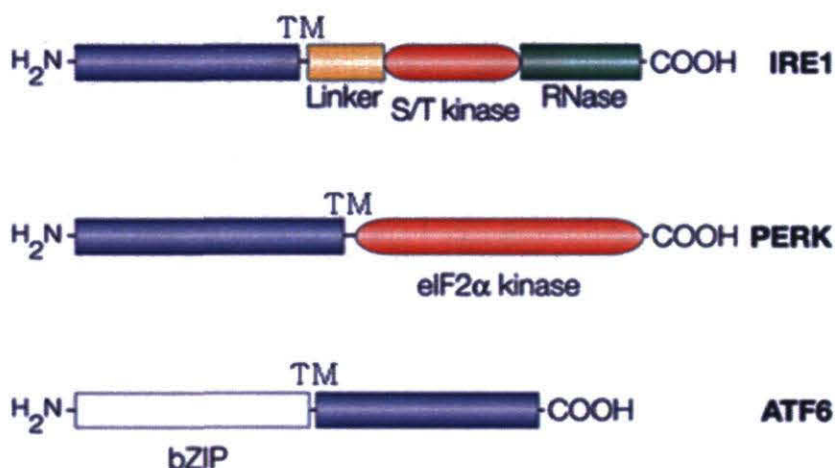
**Figure 1-2-5 :** Agents pharmacologiques provoquant un stress du RE. A23187 et l'ionomycine sont deux ionophores. La thapsigargine (Tg) bloque les pompes SERCA. La Caféine (Cf) provoque le relâchement du calcium par le récepteur à la ryanodine (RYR). La tunicamycine (Tm) inhibe la glycosylation nécessaire à la maturation des protéines nouvellement synthétisées. Le dithiothréitol (DTT) inhibe la formation des ponts disulfures.

Tableau 2 : Agents de stress.

Agent de stress	Rôle
<b>Bréfeldine A (BA)</b>	Permet la fusion des membranes du RE et de l'appareil de golgi ce qui relocalise le contenu de ce dernier dans le RE.
<b>Thapsigargine (Th)</b>	Déplétion du calcium au RE en bloquant les pompes SERCA.
<b>Tunicamycine (Tu)</b>	Inhibe la N-glycosylation en bloquant l'enzyme GlcNAc phosphotransférase (GPT).
<b>Caféine (Cf)</b>	Permet le relâchement du calcium par le récepteur à la ryanodine
<b>A23187</b>	Ionophore, capte le calcium à l'extérieur du RE
<b>Ionomycine</b>	Ionophore
<b>DTT (dithiothréitol)</b>	Agent réducteur, inhibe la formation des ponts disulfures nécessaire au repliement des protéines

### 2.iii.ii Réponse au stress du réticulum endoplasmique

La réponse au stress lié au mal repliement des protéines est une réponse adaptative qui tend à rétablir l'homéostasie du RE. Tandis que la réponse au stress chez la levure dépend d'un seul détecteur de stress, Ire1, l'UPR chez les mammifères est complexe et compte sur trois effecteurs qui permettent une régulation sur le plan transcriptionnel et traductionnel. On les nomme: PERK (*Pancreatic ER kinase (PKR)-like kinase*), ATF6 (*Activating transcription factor 6*) et Ire1 (*Inositol-requiring enzyme 1*) (figure 1-2-6).

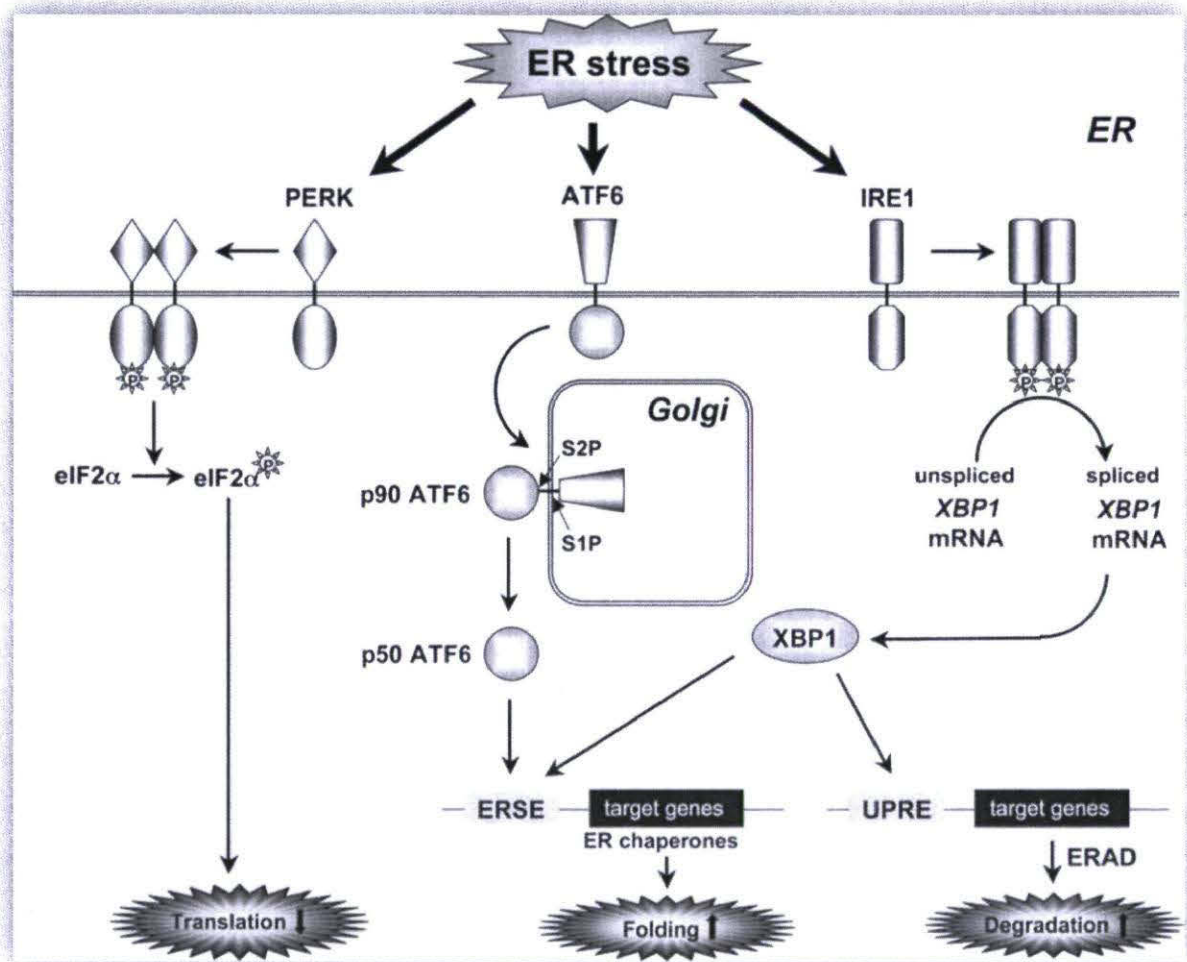


**Figure 1-2-6** : Structure des trois effecteurs de l'UPR chez les mammifères. TM: domaine transmembranaire; S/T Kinase: sérine/thréonine kinase; les domaines projetés dans la lumière du RE sont colorés au violet. Adaptée de « *The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation* »; *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002 (Kaufman, Scheuner et al. 2002).

Les trois facteurs sont des protéines transmembranaires du RE qui lient la chaperonne BiP sous leur forme inactive. L'accumulation de protéines mal repliées au niveau de la lumière du RE suite à des changements de l'environnement de ce dernier provoque tout d'abord l'activation de PERK. Cette kinase se dimérise, s'auto-phosphoryle et phosphoryle par la suite le facteur d'initiation de la traduction eIF2 (*Translation initiation factor 2*) au niveau de sa sous-unité alpha. Cette activation va provoquer une immédiate diminution de la traduction et ainsi la dégradation des protéines de courte demi-vie. Malgré l'atténuation généralisée de la traduction, la phosphorylation d'eIF2 par PERK active la traduction de l'ARNm codant la protéine ATF4. Il s'agit d'un membre de la famille ATF/CREB qui

présente une séquence régulatrice au niveau de la région non codante en 5' de son ARNm (*upstream open reading frame*, uORFs) lui permettant d'échapper à cette régulation et d'activer à son tour l'expression de gènes impliqués dans la synthèse et le transport des acides aminés, dans les réactions redox et dans l'apoptose. Par la suite, ATF6 et Ire1 activent la transcription des gènes codant pour des protéines qui vont favoriser le repliement, l'export et la dégradation des protéines. Tout d'abord, le facteur de transcription ATF6 est lui aussi détaché de BiP, il est alors transloqué vers l'appareil de golgi où il va subir un clivage protéolytique par les protéases S1P (*Site-1 protease*) et S2P (*Site-2 protease*). ATF6 est régulée par le phénomène RIP (*Regulated intramembrane proteolysis*). Brièvement, le mécanisme RIP est un mécanisme conservé depuis la bactérie qui influence plusieurs processus comme par exemple la différenciation cellulaire, le métabolisme des lipides et la réponse à l'accumulation de protéines mal-repliées. Il permet l'activation de certains facteurs de transcription transmembranaires par protéolyse et ce grâce à des protéases comme la S1P et la S2P, (Brown, Ye et al. 2000). Ces deux protéases sont localisées au niveau de l'appareil de golgi où elles clivent les facteurs de transcription libérés au niveau des séquences consensus (Arg-X-X-Leu) et (Leu-X-X-X-X-Leu-X-X-X-Pro) respectivement. Le domaine cytoplasmique libéré s'en va vers le noyau où il va réguler l'expression de gènes cibles. En effet, la forme active libérée d'ATF6 va alors migrer au noyau où elle va réguler l'expression de la protéine BiP, mais aussi l'expression de gènes codant la protéine XBP1 (*Xbox-binding protein 1*) et CHOP (*C/EBP homologous protein*) via les éléments de réponse UPRE (*Unfolded protein response element*; TGACGTGG) et ERSE (*ER stress response element*; CCAAT(N9)CCACG). Enfin, Ire1 libère BiP, se dimérise, s'autophosphoryle et clive un intron de 26 nucléotides au niveau de l'ARNm de XBP1. Cette forme épissée code pour la protéine active de XBP1 qui, au noyau, va réguler l'expression de gènes codant pour des chaperonnes ou des protéines de dégradation ainsi que le membre de la famille des HSP40 P58<sup>IPK</sup>. Lors de la réponse au stress du RE, les gènes codant des protéines impliquées dans l'ERAD constituent la seconde classe des gènes cibles de l'UPR. Les facteurs de transcription ATF6 et ATF4 sont impliqués dans l'induction de la protéine Herp/Mif1. Cette protéine pourrait être impliquée dans le recrutement du protéasome 26s au niveau de la membrane du RE.

En résumé, la réponse au stress vise d'abord à diminuer la traduction pour limiter l'engorgement du RE, augmente l'expression des gènes codant les chaperonnes qui vont aider au bon repliement des protéines et accentue la dégradation des protéines mal repliées. Toutefois, quand cette réponse est insuffisante, une réponse apoptotique est déclenchée ((Ma and Hendershot 2002), (Kaufman, Scheuner et al. 2002) , (Shen, Zhang et al. 2004), (Schroder and Kaufman 2005), (Szegezdi, Logue et al. 2006)) (figure 1-2-7).



**Figure 1-2-7:** La réponse au stress du RE : UPR. Suite à l'accumulation de protéines mal-repliées au niveau du RE, la chaperonne BiP libère PERK, IRE1 $\alpha$  et ATF6 pour lier les protéines mal-repliées afin qu'elles ne forment pas d'agrégats. PERK se dimérise et s'autophosphoryle et phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ , provoquant l'atténuation générale de la traduction. Par contre, les ARNm qui possèdent des séquences régulatrices appelées uORFs comme ATF4 seront traduits. ATF4 migre ensuite vers le noyau où elle va réguler l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés, dans la réponse au stress oxydatif et dans l'apoptose. De plus, ATF6 est transloquée vers l'appareil de Golgi où elle va subir un clivage protéolytique par les

protéases S1P et S2P. Finalement, Ire1 se dimérise, s'autophosphoryle et clive un intron de 26 nucléotides au niveau de l'ARNm de XBP1. La forme active code pour un facteur de transcription puissant. La forme clivée d'ATF6 (p50) et XBP1 migrent au noyau où elles vont lier les éléments de réponse ERSE ou ERSE et UPRE respectivement et activer l'expression de gènes codant les chaperonnes et les facteurs impliqués dans la dégradation des protéines mal-repliées. Adaptée de « *Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces* »; *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008 (Kitamura 2008).

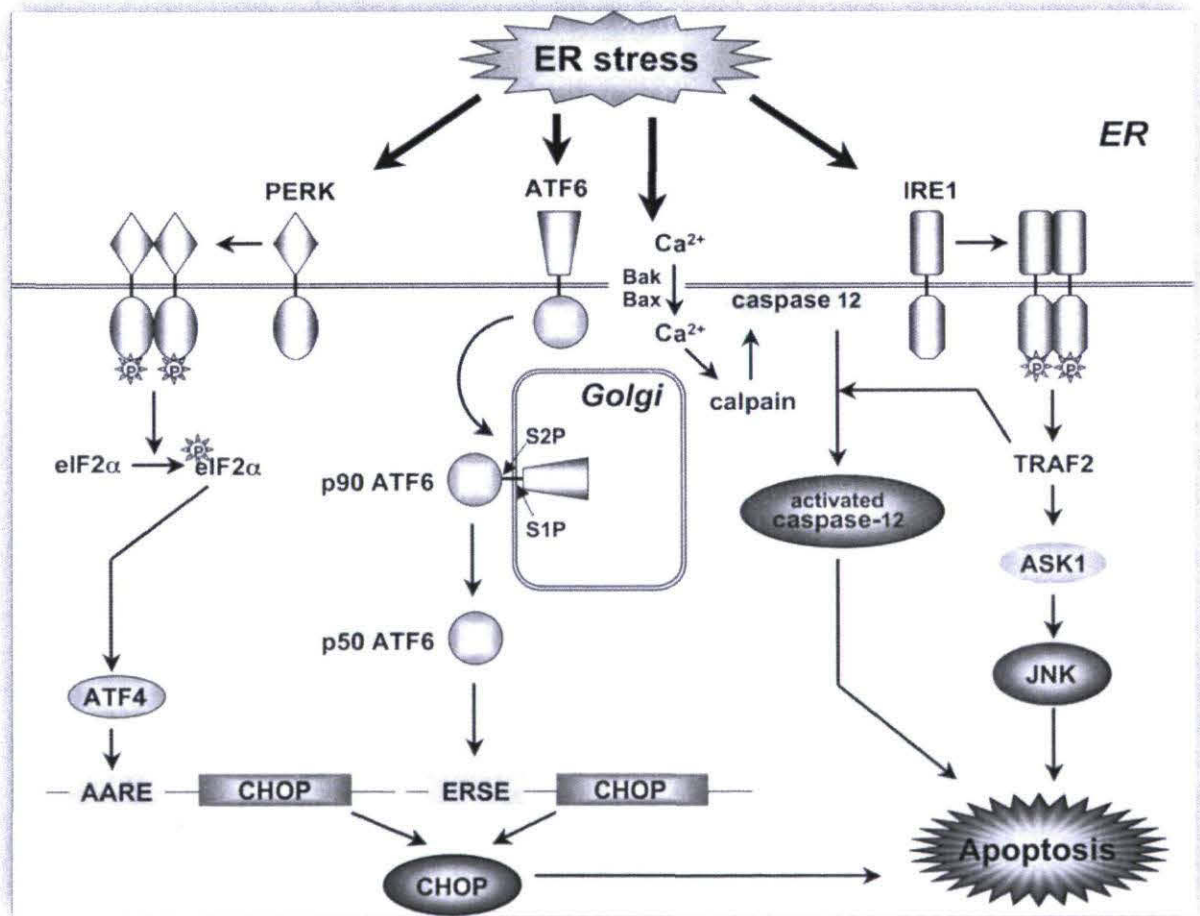
## 2.iv À la vie, à la mort: décision du réticulum endoplasmique

D'un point de vue général, le RE est pro-survie. Les premières réponses mises en place tentent de rétablir l'homéostasie du RE et de surmonter le problème du mal repliement.

Tout d'abord, le système de contrôle qualité essaye de résoudre le problème grâce aux chaperonnes de repliement et au système ERAD. Si le problème persiste, 3 effecteurs transmembranaires sont activés et activent à leur tour des voies de signalisation différentes qui tentent de diminuer la traduction, d'éliminer les protéines mal repliées, d'augmenter la capacité du RE en repliement et ainsi d'augmenter les chances de survie de la cellule (figure 1-2-7).

Si toutes ces tentatives sont infructueuses, ces mêmes facteurs transmembranaires activent alors d'autres voies. Il s'agit de réponses tardives pour éliminer l'effet toxique d'un stress soutenu. Déterminer ce qui provoque le changement de l'orientation des signalisations de la pro-survie vers la pro-apoptose mérite encore beaucoup d'investigations mais certaines études rapportent que dans l'ordre chronologique du déclenchement de la réponse au stress, IRE1 semble être la dernière voie à être activée (Szegezdi, Logue et al. 2006). Ceci laisse croire que les autres voies PERK et ATF6 tentent d'abord de résoudre le stress avant l'activation de IRE1 qui débute par l'activation de XBP1 et se termine par la surexpression de P58<sup>IPK</sup>. Il a été rapporté que la protéine P58<sup>IPK</sup> serait impliquée dans la transition du RE vers un état pro-apoptotique. La surexpression de cette protéine est régulée par le facteur XBP1 épissé et elle survient quelques heures après la phosphorylation de PERK et eIF2. Il a été démontré que P58<sup>IPK</sup> lie la kinase PERK et inhibe son expression. Il s'agit alors d'un rétrocontrôle négatif qui souligne l'arrêt de la réponse au stress (Szegezdi, Logue et al. 2006). L'apoptose constitue la forme la plus importante de mort cellulaire chez les métazoaires. Elle nécessite l'activation des caspases et des membres de la famille Bcl-2 (*factor B cell lymphoma-2*). Le stress du RE provoque l'oligomérisation des protéines Bak

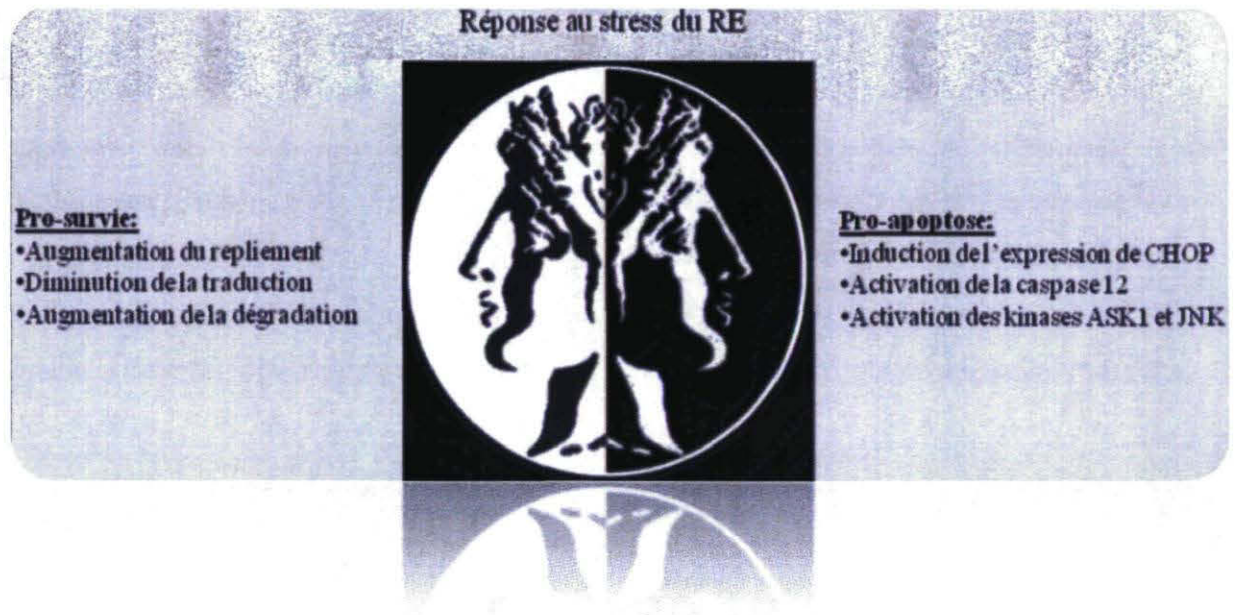
(*bcl-2* homologous antagonist-killer) et Bax (*Bcl-2-associated X protein*) au niveau de la membrane du RE induisant la libération du calcium dans le cytoplasme ce qui active la protéase calpain. A son tour, elle va cliver la procaspase 12 en caspase 12 au niveau du RE. La caspase 12 active alors une cascade de procaspases (procaspase 9 et procaspase 3). De plus, la voie de signalisation IRE1-TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*)/ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*)/JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) est impliquée dans l'induction de l'apoptose. La formation du complexe IRE1-TRAF2-ASK1 est toutefois nécessaire pour l'activation de la kinase JNK (Xu, Bailly-Maitre et al. 2005), (figure 1-2-8).





**Figure 1-2-8 :** Induction des voies de signalisation pro-apoptotiques de l'UPR. L'activation de la voie PERK-eIF2 $\alpha$  induit l'expression du facteur de transcription ATF4 qui a son tour active l'expression du facteur CHOP (*CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein*) via l'élément de réponse AARE (*amino acid response element*). De plus ATF6 active l'expression de CHOP via l'élément de réponse ERSE. Le stress du RE active la caspase 12 via l'interaction de Ire1 avec le facteur TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*). L'interaction Ire1 et TRAF2 permet le recrutement et l'activation de la kinase ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) et de la kinase JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). Toutes ces voies déclenchent l'apoptose. Adaptée de « *Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces* »; *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008 (Kitamura 2008).

En conclusion, la réponse au stress du RE est une réponse à double face. Elle déclenche des voies de signalisation anti-apoptotique et pro-apoptotique (Kitamura 2008) (figure 1-2-9).



**Figure 1-2-9 :** La double face de la réponse au stress du RE

## 2.v Réticulum endoplasmique : entre santé et maladies

Le bon fonctionnement du RE dépend de son système d'adaptation qui permet de maintenir l'équilibre entre la demande en protéines bien repliées et la capacité d'en produire. L'activation de la réponse au stress UPR est très importante lors de la différenciation des cellules et la maturation de certaines cellules spécialisées, comme par exemple, les

lymphocytes B mais aussi au niveau des cellules à forte capacité sécrétrice comme dans le cas des cellules  $\beta$  du pancréas et des hépatocytes (Foufelle and Ferre 2007). En effet, l'apport physiologique en nutriments stimule la synthèse et la sécrétion de l'insuline au niveau des cellules  $\beta$ . Cette surcharge du RE provoque un stress et déclenche la réponse UPR. Cette réponse tente alors de rééquilibrer la balance entre la demande en insuline et la capacité du RE à en produire (Mandl, Meszaros et al. 2009). D'un autre côté, l'apport soutenu de nutriments, caractéristique de l'obésité, induit un stress excessif et destructeur des cellules  $\beta$  : une synthèse accrue d'insuline mène à un stress soutenu du RE qui fera entrer la cellule en apoptose. De plus, dans le cas d'obésité, le stress du RE a été observé au niveau des hépatocytes et des adipocytes et contribue à la résistance à l'insuline en interférant avec les voies de signalisation de cette dernière. Le stress du RE augmente également la production de glucose par les hépatocytes, soutient le dépôt de gras et favorise la croissance du tissu adipeux par stimulation de la différenciation des pré-adipocytes. Ces phénomènes réunis ensemble pourront potentiellement entraîner un diabète de type II, (Mandl, Meszaros et al. 2009). Toutefois, la voie de dégradation des protéines par le mécanisme ERAD est aussi un facteur important du système d'adaptation du RE. D'ailleurs, plusieurs maladies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer, sont causées par une exposition chronique au mal-repliement des protéines ainsi qu'à la formation d'agrégats au niveau du cytoplasme en raison d'un dysfonctionnement de la voie de dégradation par le protéasome 26s (Foufelle and Ferre 2007).

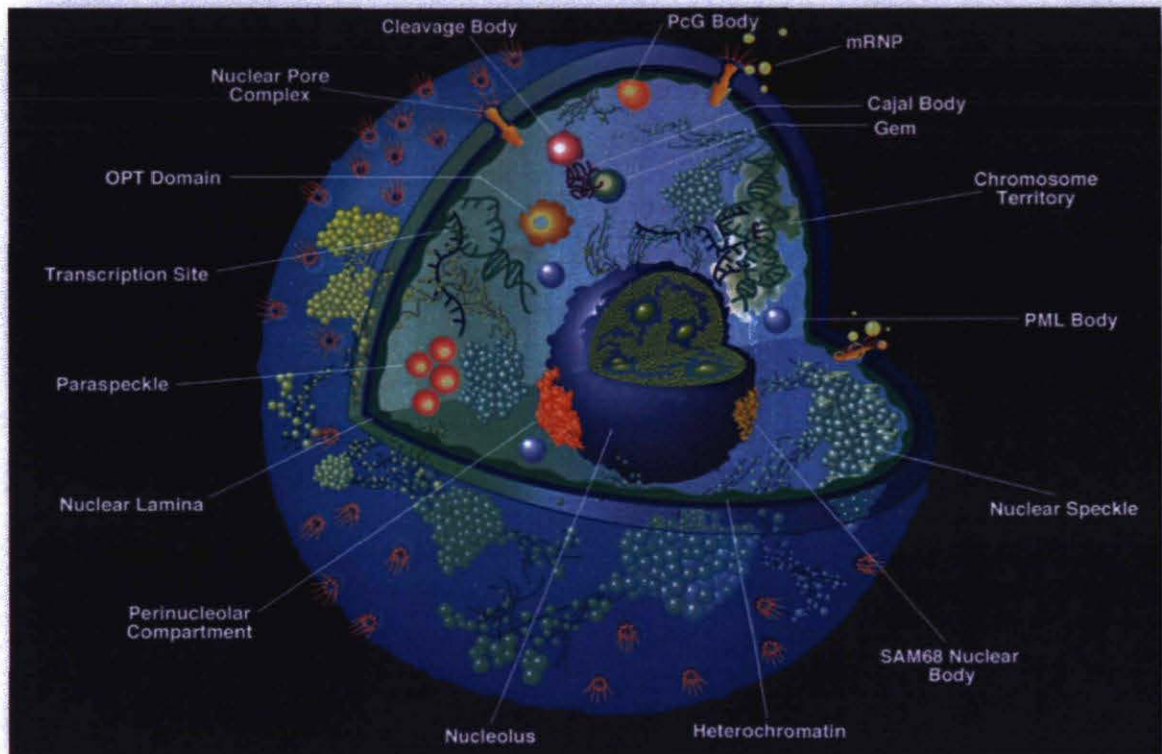
Malgré une contribution du stress du RE dans plusieurs pathologies, il n'est cependant pas encore clair s'il s'agit de la cause primaire de la maladie ou d'un phénomène secondaire.

### 3. Le noyau

#### 3.i Généralités

Dans la même logique de l'évolution et de la complexification de la cellule eucaryote, le confinement de l'ADN dans un compartiment à fonction spécialisée appelé noyau fût un événement qui a sans doute marqué la séparation des cellules eucaryotes des cellules procaryotes (Newport and Forbes 1987). Cette structure organisée permet de stocker et d'utiliser l'information génétique en séparant l'ADN des processus cytoplasmiques. De plus, elle assure un transport sélectif via les pores nucléaires créant ainsi un environnement biochimique exclusif. Le noyau est entouré par une enveloppe nucléaire formée de deux membranes cellulaires parallèles: une membrane externe et une membrane interne. Ces deux membranes, qui représentent une interface d'échanges passifs, sont séparées par un espace péri-nucléaire qui fusionne par endroits pour former des structures appelées les pores nucléaires représentant la plus importante structure d'échanges actifs de macromolécules au niveau de la cellule (Spector 2001). L'observation de l'enveloppe nucléaire montre que la membrane extérieure du noyau est en continuité avec celle du RE et présente des ribosomes sur sa face cytoplasmique. Quant à la membrane intérieure, elle est liée au niveau de sa surface interne avec un maillage fibrillaire appelé lamina. La lamina est un réseau polymérique formé de différentes protéines appelées les lamines servant à stabiliser l'enveloppe nucléaire et à fixer la chromatine à cette dernière. Au niveau du nucléoplasme, la chromatine est divisée en deux formes: l'euchromatine sous forme diffuse correspondant à la région active du génome qui se réplique tôt durant la phase S et l'hétérochromatine sous forme plus condensée représentant la zone inactive et se répliquant plus tard pendant la phase S. Au cours de la mitose, les deux types de chromatines forment les chromosomes et se positionnent sous forme de bandes alternées (Carmo-Fonseca 2002). Au niveau de l'espace interchromatinien du nucléoplasme se trouvent les protéines et les ribonucléoprotéines impliquées dans le métabolisme de l'ARNm, généralement expulsées des nucléoles: site de biogenèse des composants des ribosomes (Carmo-Fonseca 2002) (figure 1-3-1). Le contrôle du mouvement des molécules entre le noyau et le cytoplasme est une manière efficace pour contrôler l'expression des gènes. En effet, un signal spécifique

peut entraîner l'accumulation de facteurs activateurs au niveau du noyau ou inversement d'exporter des facteurs inhibiteurs vers le cytoplasme (Carmo-Fonseca 2002).

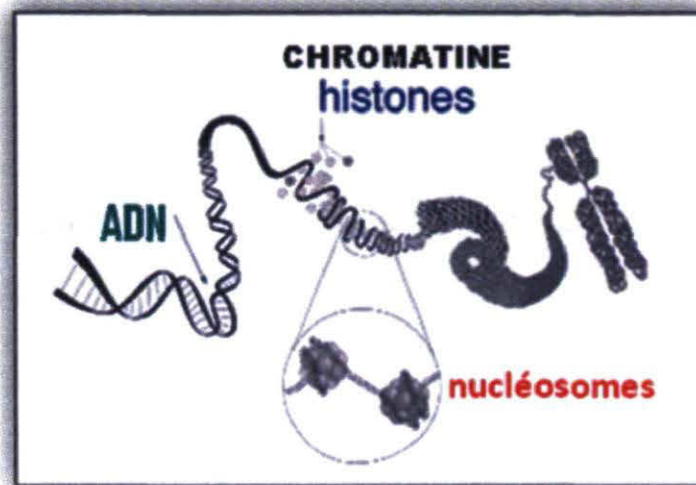


**Figure 1-3-1 :** Organisation du noyau cellulaire chez les mammifères. Le noyau cellulaire contient la machinerie essentielle pour l'expression des gènes. L'enveloppe nucléaire est formée d'une double membrane fusionnée au niveau des pores nucléaires permettant le transit de matériel entre le noyau et le cytoplasme. La lamina nucléaire est composée des lamines A/C et B et elle régule la structure de l'enveloppe nucléaire. Au niveau du nucléoplasme, les chromosomes sont arrangés au niveau de territoires chromosomiaux. L'hétérochromatine correspondant à la chromatine inactive est associée à la lamina nucléaire. Les nucléoles sont le site de synthèse de l'ARNr et de l'assemblage des sous unités du ribosome. Adaptée de «*Nuclear domains*»; *J. Cell Science*, 2001 (Spector 2001).

### 3.ii La transcription

Un gène est une entité composée d'une région codante composée d'exons, d'une région promotrice qui assure le niveau basal de la transcription et de sites modulateurs qui comprennent des séquences amplificatrices (enhancers) ou atténuatrices (silencers) (Berg

2008). La transcription est le processus de synthèse d'une molécule d'ARN à partir de l'ADN et ce grâce à l'ARN polymérase et des facteurs de transcription. Elle est contrôlée à plusieurs niveaux et dépend de l'accessibilité de la chromatine (figure 1-3-2).



**Figure 1-3-2 :** La chromatine. L'acide désoxyribonucléique (ADN) se présente sous forme de chromatine dans le noyau. Elle correspond à l'association de l'ADN avec les histones pour former les nucléosomes. Les chromosomes constituent la forme la plus condensée de l'ADN qu'on observe lors de la mitose.

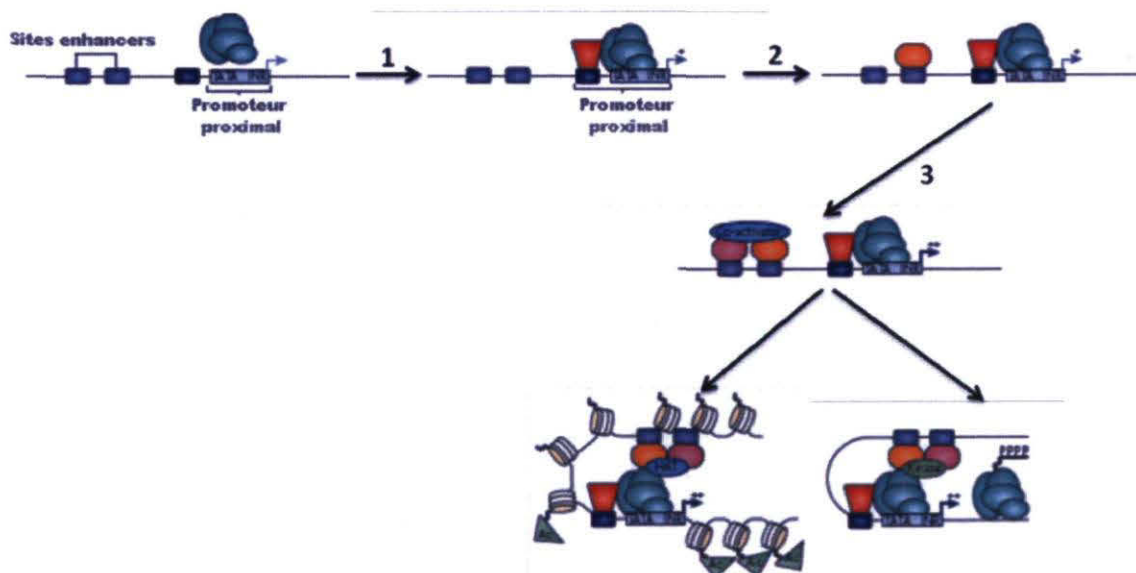
### 3.ii.i. Facteurs de transcription

#### 3.ii.i.i Définition

Les facteurs de transcription sont des protéines capables de lier l'ADN au niveau de séquences consensus du promoteur, ils agissent au cœur de la machinerie transcriptionnelle afin de transmettre le phénotype cellulaire en réponse aux signaux extracellulaires (Berg 2008). À partir d'un petit nombre de gènes, différents phénotypes peuvent émerger dépendamment de leur expression spatiotemporelle, de leur épissage et de la modification postraductionnelle de leurs produits (protéines). Les facteurs de transcription sont les contrôleurs de l'initiation de la transcription et influencent les fonctions biologiques de la cellule comme la régulation génique, le développement et la différenciation (Amoutzias, Robertson et al. 2008).

Il existe deux types de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes chez les eucaryotes : les facteurs de transcription généraux et les facteurs de transcription gène-spécifique (Berg 2008). Chez la cellule eucaryote, la phase d'initiation

de la transcription dépend d'une interaction spatio-temporelle coordonnée entre la machinerie de transcription et les éléments de réponse. Tout d'abord, la transcription débute par la formation du complexe de préinitiation (CPI), ce complexe étant composé de l'ARN polymérase II (Pol II) et des facteurs de transcription généraux (FTGs): TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH. Le facteur TFIID est en fait un complexe protéique composé de protéines qui lient la boîte TATA (TBP) et de ses facteurs associés (TAFs) (Warren 2002). Par la suite, les facteurs de transcription gène-spécifique lient les éléments du promoteur proximal, les éléments du promoteur distal, les sites amplificateurs (enhancers) ou les sites atténuateurs (silencers) qui peuvent être à des milliers de nucléotides en amont ou en aval du promoteur (Mees, Nemunaitis et al. 2009) et se mettent par la suite en contact avec l'ARN polymérase II par l'intermédiaire du médiateur: un complexe protéique composé d'une vingtaine de protéines. Dans le cas d'une activation de la transcription, les facteurs de transcription recrutent des co-activateurs qui vont acétyler les résidus lysine des queues des histones afin de lever la répression provoquée par la structure condensée de l'ADN (Berg 2008) (figure 1-3-3).



**Figure 1-3-3 :** Modèle de régulation transcriptionnelle. Le complexe de pré-initiation de la transcription CPI lie la boîte TATA au niveau de la région promotrice (formes ovales vertes). L'activité du promoteur proximal est augmentée suite à l'interaction du facteur de transcription avec son site spécifique (1) ce qui stabilise le recrutement de la machinerie de transcription. Liaison du facteur de transcription (octogone orange) au site spécifique au

niveau de la région amplificatrice (enhancer) (2). Toutefois, cette étape n'est pas suffisante pour assurer une haute activité transcriptionnelle, ce qu'induit le recrutement de partenaires (octogone violet) au niveau de la même région qui, ensemble, vont recruter des co-activateurs (3). Les facteurs amplificateurs peuvent alors recruter des enzymes de modification des histones (bas, à gauche) pour créer un environnement favorable à la transcription, ou des kinases (bas, à droite) pour phosphoryler (P) le domaine C-terminal de l'ARN polymérase et stimuler l'élongation. Ac: histone acétylé, HAT: histone acétyltransférase. Adaptée de « *Insights from genomic profiling of transcription factors* », *Nat. Rev. Genetics*, 2009 (Farnham 2009).

Il existe 4 familles de facteurs de transcription : la famille hélice-tour-hélice (*helix-turn-helix*), la famille des protéines à doigts de zinc (*zinc finger*), la famille des facteurs à glissière à leucine (*leucine zipper and the basic DNA binding domain*) et la famille hélice-boucle-hélice (*helix-loop-helix : HLH*) (Latchman 1990). En général, les membres de ces familles lient l'élément de réponse au niveau de l'ADN sous forme de dimères ou tétramères. Les membres de la famille ATF/CREB forment des homo ou des hétérodimères d'où l'intérêt porté à la dimérisation.

### 3.ii.i.ii La dimérisation

La dimérisation au niveau des systèmes biologiques est définie par la formation d'un complexe fonctionnel composé de deux sous unités (Amoutzias, Robertson et al. 2008), ce complexe est dynamique et permet des changements réversibles. Dépendamment du choix du partenaire et du contexte cellulaire, chaque dimère active une suite d'événements engendrant une situation cellulaire particulière. Il y a plusieurs familles de facteurs de transcription qui peuvent se dimériser dont bHLH, bZIP, NR, MADS-box, HD-ZIP, NFkB et STATs. Les membres des familles des facteurs de transcription qui se dimérisent transmettent leurs signaux via des domaines de liaison à l'ADN et des domaines de dimérisation très conservés. Un seul monomère de facteur de transcription peut avoir divers partenaires qui, en formant un dimère, vont avoir des propriétés distinctes et réaliser des fonctions spécifiques, ce qui permet une régulation différentielle du gène. Dans un tel cas, c'est la concentration de chaque monomère au niveau de la cellule, ses modifications post-traductionnelles et son affinité de liaison avec l'autre monomère qui vont déterminer quel dimère va se former et quel processus va primer sur les autres (Amoutzias, Robertson et al. 2008).

### 3.ii.i.iii *La dimérisation : une cible thérapeutique*

Chez plusieurs cancers chez l'homme, un petit nombre de facteurs de transcription oncogéniques, généralement des dimères, présente une suractivité par rapport à la large majorité des oncoprotéines. Le blocage de la dimérisation des facteurs de transcription est une nouvelle stratégie pour le développement de nouvelles générations de drogues. L'inhibition de la dimérisation des facteurs de transcription de la famille des bZIP et bHLH a été réalisée par l'utilisation de dominants négatifs. Ces peptides synthétiques ne présentent pas de domaine de liaison à l'ADN, ce qui perturbe d'une part la dimérisation endogène des facteurs et favorise, d'autre part, la formation d'hétérodimère avec le dominant négatif ce qui empêche la liaison à l'ADN (Amoutzias, Robertson et al. 2008).

### 3.ii.ii. **Co-activateurs et co-répresseurs**

Au niveau de la cellule, l'information génétique est empaquetée sous forme de chromatine. L'unité fondamentale de la chromatine appelée nucléosome consiste en 147 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) (Pfluger and Wagner 2007); (Grant 2001). Le recrutement des coactivateurs ou des corépresseurs par les facteurs de transcription est un mécanisme de régulation de la transcription très conservé (Warren 2002) qui permet de modifier l'ADN, ce qui provoque un changement structural dynamique de la chromatine permettant d'activer ou de réprimer la transcription (Grant 2001).

### 3.ii.iii. **Modification de l'ADN**

La queue des histones est le siège de diverses modifications post-traductionnelles (l'acétylation, la phosphorylation et la méthylation). Il est intéressant de noter que ces modifications définissent les interactions des histones avec d'autres protéines et qu'elles sont impliquées dans plusieurs fonctions nucléaires comme la régulation de la transcription (Grant 2001).

#### 3.ii.iii.i *Acétylation des histones*

L'acétylation est une réaction qui permet le transfert d'un groupement acétyl (CH<sub>3</sub>-CO-) d'une molécule d'acétylcoenzyme A vers le groupe amine ε de la lysine de l'histone, cette réaction étant catalysée par la famille des acétyltransférases (HATs) (Grant 2001).



L'acétylation et la désacétylation ont toujours été liées à l'activité transcriptionnelle. En effet, l'acétylation des histones est associée généralement à l'activation de la transcription alors qu'en revanche, la désacétylation est le signe d'une chromatine inactive. Elle est assurée par la famille des histones déacétylases (HDACs). L'acétylation des histones transforme les charges basiques de la queue en charges neutres ce qui semble diminuer l'affinité des histones à l'ADN et par conséquent contribue à altérer l'interaction entre les nucléosomes rendant ainsi l'environnement permissif pour la transcription. De surcroît, les histones acétylées deviennent plus accessibles aux autres protéines et sont utilisées comme une plateforme pour émettre leurs signaux (Grant 2001) (figure 1-3-4).

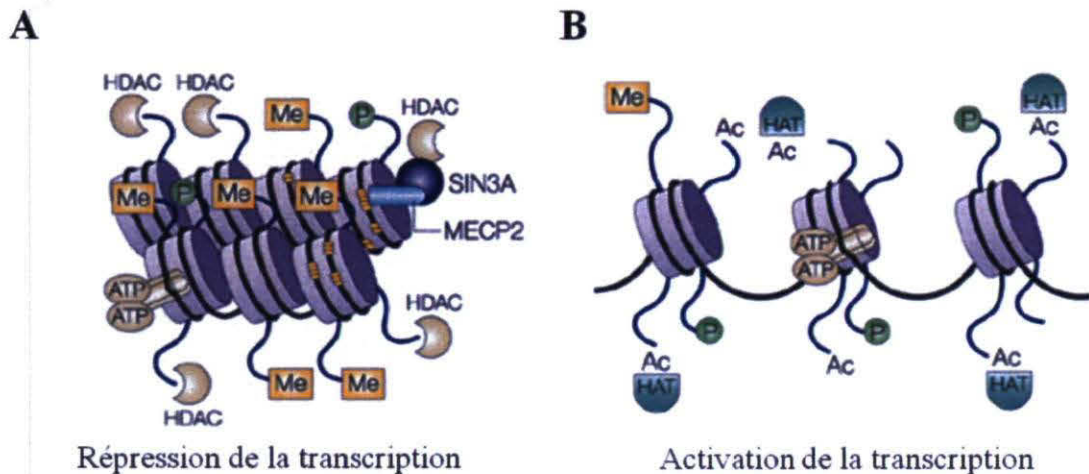
### *3.ii.iii.ii Phosphorylation des histones*

La phosphorylation des histones consiste en l'ajout d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP (adénosine triphosphate) vers un résidu sérine ou thréonine et cette réaction est catalysée par la famille des histones kinases. La phosphorylation pourrait être impliquée elle aussi dans l'activation de la transcription. En effet, l'ajout de la charge négative du groupement phosphate neutralise la charge positive de la queue et réduit l'affinité des histones à l'ADN. De plus, la phosphorylation pourrait contribuer dans l'activation de la transcription en stimulant l'activité des histones acétyltransférase (Grant 2001) (figure 1-3-4).

### *3.ii.iii.iii Méthylation des histones*

La méthylation est une réaction de transfert d'un groupement méthyl (CH<sub>3</sub>) à partir d'une molécule de S-adénosine-méthionine (SAM) vers un résidu lysine ou arginine. La méthylation du di-nucléotide CpG est la majeure modification épigénétique au niveau du génome des mammifères et elle est impliquée dans « *l'imprinting* », l'inactivation du chromosome X, le développement embryonnaire et dans la carcinogenèse (Warren 2002). En général, la méthylation est associée à la répression de la transcription mais la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est un marqueur d'activation de la transcription. Cette modification est assurée par la famille des méthyltransférases (HMTs) dont certains membres sont considérés comme gènes essentiels à la cellule. En effet, l'inactivation du gène codant la protéine MLL1 (mixed-lineage leukemia 1) ou MLL2 (mixed-lineage leukemia 2), deux HMTs, provoque des défauts sévères dans le développement

embryonnaire. De plus, il a été proposé qu'au niveau de la cellule eucaryote, la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est nécessaire pour lutter contre l'environnement général inhibiteur imposé par la méthylation des lysines 9 et 27. La méthylation du résidu lysine de l'histone peut se faire à plusieurs degrés. En effet le résidu peut être mono-, di- ou triméthylé ce qui ajoute une complexité potentielle au statut post-traductionnel des histones (Grant 2001) (figure 1-3-4).



**Figure 1-3-4** : Régulation de la transcription. Les modifications post-traductionnelles des queues des histones comme l'acétylation (Ac), la phosphorylation (P) et la méthylation (Me) peuvent altérer la structure du nucléosome. La structure du nucléosome peut être régulée par l'action opposée des histones acétyltransférases (HATs) et les histones déacétylases (HDACs). En général la méthylation est associée à la répression de la transcription. Les protéines interagissant avec le groupement méthyl, lient l'ADN méthylé (jaune) et recrutent les HDACs. a. La déacétylation des histones induit une configuration serrée de la chromatine et réprime la transcription. b. L'acétylation des histones permet le relâchement de la chromatine ce qui induit la transcription. Adaptée de « *Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer* », *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002 (Johnstone 2002)

## 4. La famille ATF/CREB

### 4.i Introduction : famille des bZIP

La famille des facteurs de transcription bZIP constitue une des plus grande classe de facteurs de transcription de type activateurs de la transcription (Deppmann, Alvania et al. 2006). Chez les vertébrés, ces facteurs sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires critiques à la fonction de l'organisme. Par exemple, pendant l'embryogenèse chez les animaux, certains facteurs bZIP sont nécessaires pour le développement des organes et des tissus (foie, cœur) (Deppmann, Alvania et al. 2006). Chez l'animal adulte, certains facteurs sont impliqués dans le métabolisme, le rythme circadien, l'apprentissage et la mémoire (Deppmann, Alvania et al. 2006). Chez les plantes, les facteurs bZIP sont importants pour le développement de la graine et pour la maturation de la fleur. Chez la levure, on trouve des facteurs nécessaires pour la différenciation sexuelle et l'entrée en phase stationnaire. A part les fonctions spécifiques selon les espèces, les facteurs de la famille ATF/CREB ont des fonctions plus généralisées comme, par exemple, l'initiation des réponses au stress. La conservation de la présence de cette famille à travers les eucaryotes additionnée à leurs multitudes de fonctions cellulaires nous donne une idée quant à l'importance de cette famille de facteurs de transcription (Deppmann, Alvania et al. 2006). Grâce à leur domaine bZIP, les facteurs de la famille ATF/CREB sont capables de lier des éléments de réponse spécifiques double brin sous forme d'homo ou hétérodimères et ce de manière spécifique résultant dans la formation de centaines de dimères avec un effet unique sur la transcription. La famille ATF/CREB peut être divisée en trois groupes. Le premier regroupe les facteurs de transcription qui présentent une forte préférence pour l'homodimérisation (PAR, CREB, OASIS et ATF6). Au niveau du deuxième groupe on trouve les facteurs de transcription qui n'ont pas de préférence pour le type de dimérisation (ATF4, ATF2, JUN). Le troisième groupe, par contre, présente des préférences pour l'hétérodimérisation (FOS) (Vinson, Myakishev et al. 2002). À la fin des années 80, plusieurs protéines chez les mammifères ont été purifiées par chromatographie d'affinité en utilisant des séquences d'ADN double brin. Ensuite les ADNc codant ces protéines ont été clonés. Les premiers dimères clonés furent l'hétérodimère AP-1 constitué des facteurs c-FOS et c-JUN, l'homodimère CREB et l'homodimère C/EBP. Suite à ceci, ces dimères ont

été utilisés comme sondes pour identifier de nouvelles séquences consensus que pourraient lier ces facteurs de transcription. De plus, d'autres protéines ont été isolées suite au criblage de bibliothèques d'expression en utilisant les séquences consensus connues comme sondes radioactives. Ces expériences ont permis d'identifier plusieurs protéines bZIP et la famille ATF/CREB compte aujourd'hui plus d'une cinquantaine de gènes (Vinson, Myakishev et al. 2002).

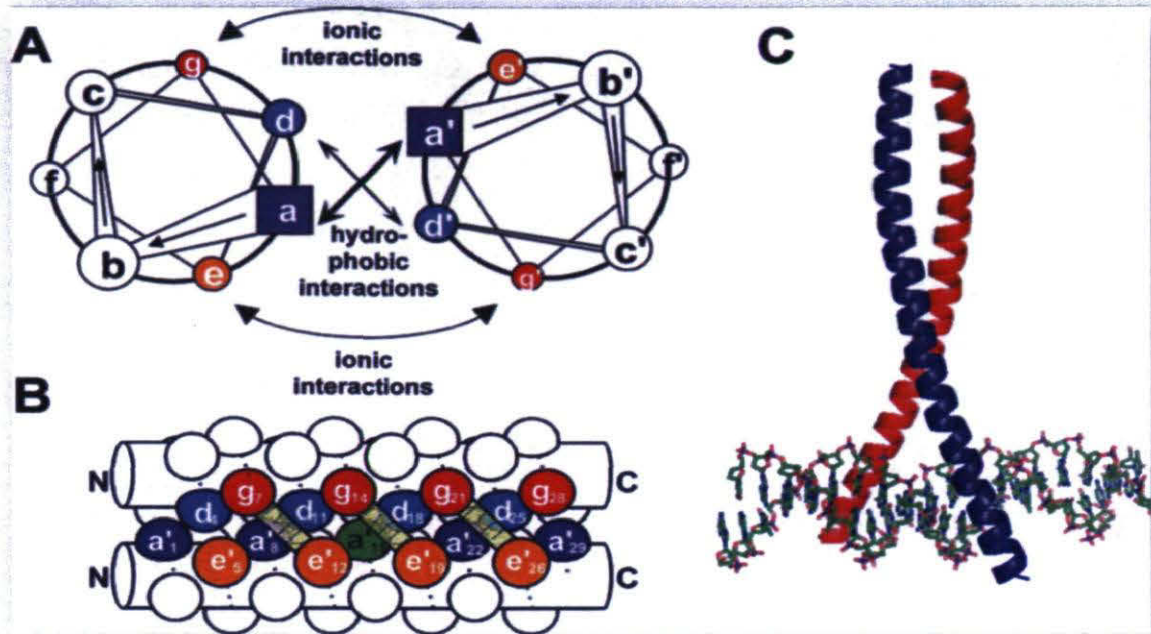
#### **4.ii Structure du domaine bZIP :**

Le domaine bZIP est un domaine de 60 à 80 aa, composé de deux régions. Une région en N-terminal composée d'un groupe d'acides aminés basiques, riches en charges positives, responsable de la liaison à l'ADN au niveau des groupes phosphates et une région en C-terminal contenant une séquence amphipathique riche en résidus hydrophobes de longueur variable avec un résidu leucine positionné après chaque répétition de 7 aa (Deppmann, Alvania et al. 2006) (figure 1-4-1).

Le motif de glissière de leucine est une hélice de type alpha. L'hélice alpha constitue une des deux grandes structures secondaires qui forme la structure générale de la protéine. Elle est formée de l'enroulement régulier d'une chaîne polypeptidique sur elle-même. Les atomes d'azote et d'oxygène sont reliés entre eux par des liaisons hydrogènes parallèles à l'axe de l'hélice. Plusieurs types d'acides aminés contribuent à la stabilité de la structure hélicoïdale comme par exemple la leucine, le tryptophane et la phénylalanine. Cette stabilisation permet de minimiser l'énergie interne de la protéine. Le motif de glissière de leucine est constitué de 4 à 5 répétitions.

Chaque répétition est composée de 7 acides aminés enroulés en deux tours puisqu'un tour d'hélice correspond à 3,6 résidus. Les 7 acides aminés sont désignés a, b, c, d, e, f et g. Les acides aminés a et d se trouvent au niveau du même plan de l'hélice alpha et sont généralement hydrophobes tandis que les résidus en position b, c, et f se trouvent au niveau de la face hydrophile de l'hélice (Deppmann, Alvania et al. 2006) (figure 4-1). D'une façon générale, le dimère de bZIP forme une structure en Y au niveau de laquelle les deux glissières de leucine constituent la tige et les deux régions basiques forment les branches qui vont lier l'ADN (figure 4-1). Ce sont les résidus en position a, d, e et g qui régulent

l'oligomérisation des glissières de leucine, sa stabilité ainsi que sa spécificité. Le résidu en position d est à 83% des cas une leucine et cette fréquence élevée suggère que cette position est impliquée dans la stabilité du dimère plutôt que dans sa spécificité. En contrepartie, l'acide aminé en position a est beaucoup plus variable ce qui laisse penser que cette position concerne la spécificité. Pour former le dimère, les acides aminés a et d du premier monomère interagissent avec les acides aminés en position complémentaire a' et d' du second monomère, ce qui crée un cœur hydrophobe nécessaire à la stabilité du dimère. En revanche, les acides aminés en position e et g sont habituellement des acides aminés chargés. Il a été montré par cristallographie aux rayons X que l'acide aminé g lie l'acide aminé e' de charge opposée. Ces interactions électrostatiques entre les résidus g et e' peuvent générer de l'attraction ou de la répulsion selon les charges et ainsi peuvent réguler l'homo et l'hétérodimérisation. En fait l'analyse des acides aminés en position g et e' au niveau des 4 premières répétitions des protéines bZIP chez les mammifères révèle l'existence de 3 groupes d'interactions électrostatiques (Vinson, Myakishev et al. 2002): groupe acide-basique, groupe acide-acide ou basique-basique et un groupe à une seule charge. 76% des positions g et e sont occupées par un des 4 acides aminés à longue chaîne comme l'acide glutamique ou l'arginine. Le changement des acides aminés chargés en position g et e par des alanines au niveau du domaine bZIP du facteur de transcription PAR (JTB : jumping translocation breakpoint) résulte en la formation d'un tétramère à la place d'un dimère. Ainsi, la charge des acides aminés en position g et e inhibe un haut degré d'oligomérisation qui peut arriver si ces acides aminés forment une surface hydrophobe avec les acides aminés en position a et d (Vinson, Myakishev et al. 2002).



**Figure 1-4-1** : Représentation schématique et structure d'un dimère de glissière de leucine. A. Diagramme représentant deux répétitions en forme hélicoïdale vue du bas. Les répétitions sont nommées a-g et a'-g' respectivement. B. Vue de profil d'un dimère de glissières de leucines. C. Structure du domaine bZIP du dimère c-Jun/c-Fos. Adaptée de « *iPEP: peptides designed and selected for interfering with protein interaction and function* ». *Biochemical Society Transactions*, 2008 (Mason, K et al. 2008)

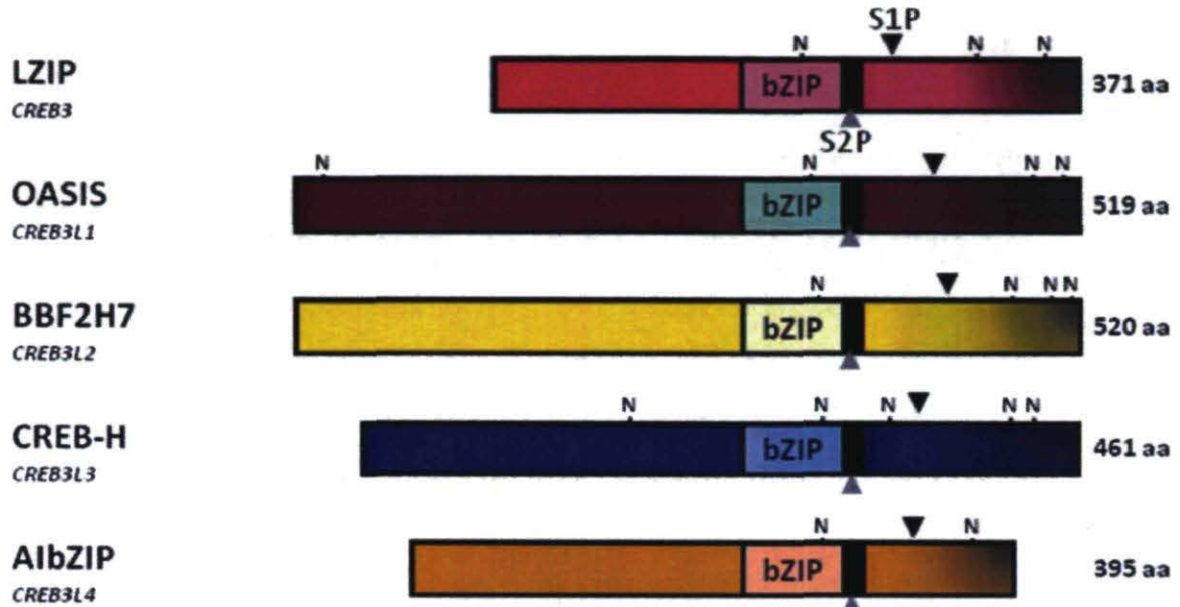
La comparaison de la séquence en acides aminés de tous les facteurs de la famille ATF/CREB nous amène à diviser cette superfamille en sous-groupes de facteurs. Chaque sous-famille regroupe des facteurs de transcription présentant une forte homologie au niveau du domaine bZIP mais aussi un certain pourcentage de similitudes de part et d'autre de ce domaine central. AlbZIP appartient à la sous-famille de CREB3.

#### 4.iii Membres de la sous-famille de CREB3

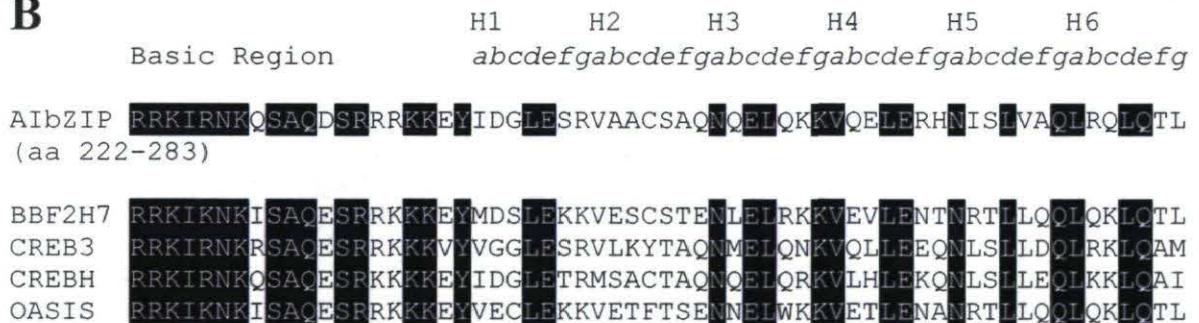
La sous-famille de CREB3 (*Cyclic AMP-response element-binding protein 3*) fait partie de la grande famille des facteurs de transcription ATF/CREB (*Activating transcription factor/ cAMP response element binding protein*). Elle englobe 5 facteurs qui partagent une forte

homologie au niveau du domaine bZIP (Labrie, Lessard et al. 2008), la signature de cette famille, ainsi que de part et d'autre de ce domaine, d'où ce regroupement (figure 1-4-2).

**A**

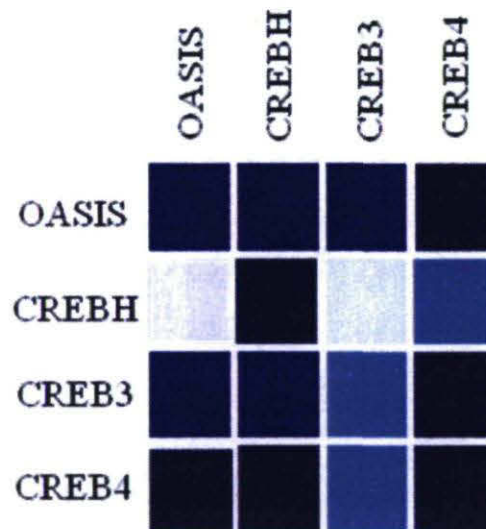


**B**



**Figure 1-4-2:** A. Alignement des 5 membres de la sous-famille de CREB3. Les 5 membres de cette sous-famille présentent chacun un domaine NH2-terminal constitué du domaine d'activation de la transcription et du domaine bZIP et séparé du domaine COOH-terminal par un domaine transmembranaire. Il y a aussi des sites potentiels pour la protéase S1P désignés par une flèche noire et pour la protéase S2P désignés par des flèches grises ainsi que des sites potentiels de glycosylation désignés par la lettre N. B. Comparaison des domaines bZIP des membres de la sous-famille de CREB3. La comparaison du domaine bZIP des 5 membres montre la présence d'une forte homologie au niveau du domaine basique. De plus, certains acides aminés au niveau du motif de glissière de leucine sont bien conservés pour les 5 facteurs de transcription.

Ces protéines ont été identifiées durant la dernière décennie. S'ajoute à leur homologie, une même localisation subcellulaire au niveau du RE additionnée à une activation par le mécanisme RIP (*Regulated intramembrane proteolysis*). Ces facteurs peuvent moduler des voies de signalisation communes lors d'un stress du RE mais peuvent aussi avoir individuellement un rôle bien spécifique (Labrie, Lessard et al. 2008). Il a été rapporté dans un article publié en 2003 grâce à des puces utilisant 49 domaines bZIP humains et 10 domaines bZIP de la levure que les membres de la sous-famille de CREB3 présentent une préférence pour la formation de dimères entre eux. Par contre, la probabilité qu'ils forment des dimères avec d'autres membres de la famille ATF/CREB est presque nulle sauf pour le cas de CREB3, OASIS et CREBH qui présentent une probabilité d'appariement appréciable avec le facteur de transcription E4BP4 (*E4 promoter-binding protein 4*) (Newman and Keating 2003) (figure 1-4-3).



**Figure 1-4-3:** Probabilité d'appariement des membres de la sous-famille de CREB3 (OASIS, CREBH, CREB3 et CREB4/AIbZIP). Les peptides bZIP incorporant la fluorescence sont indiqués en haut de la figure alors que les peptides bZIP liés au support solide sont indiqués sur le côté à gauche. La probabilité d'appariement est indiquée par la couleur utilisée. Le Bleu foncé indique une forte probabilité d'appariement alors que le blanc indique l'absence complète de probabilité de dimérisation. Adaptée de « *Comprehensive Identification of Human bZIP Interactions with Coiled-Coil Arrays* ». *Science*, 2003 (Newman and Keating 2003).



Au niveau de cette section seront développés les quatre membres de la sous-famille de CREB3 dans l'ordre suivant : CREB3, CREB3L1/OASIS, CREB3L2/BBF2H7 et CREB3L3/CREBH. Le facteur de transcription CREB3L4/AlbZIP sera développé dans le chapitre suivant.

#### 4.iv CREB3:

##### 4.iv.i CREB3 est un partenaire du facteur HCF-1

CREB3/Luman/LZIP est le premier facteur découvert de la sous-famille de CREB3 qui porte son nom. En 1997, des études effectuées par plusieurs équipes pour élucider les fonctions du gène HCF-1 (*Host cell factor 1*) ont permis d'identifier le facteur CREB3 comme partenaire de HCF. L'identification de CREB3 a été obtenue par double hybride chez la levure en utilisant une librairie d'ADNc provenant des cellules HeLa (Lu, Yang et al. 1997); (Freiman and Herr 1997). Initialement, la protéine HCF-1 a été identifiée comme facteur nécessaire pour le virus VP-16 afin d'induire l'activation des gènes impliqués dans le cycle viral. En effet, après une infection virale avec le virus de l'herpès simplex (VHS) le transactivateur viral VP-16 est relâché au niveau de la cellule infectée et va s'associer avec le facteur HCF-1. Une fois le complexe formé, il s'associe avec le domaine de liaison à l'ADN POU du facteur de transcription Oct-1 (*Octamer transcription factor 1*) et ensemble ils lient le motif TAATGARAT ce qui initie une cascade d'expression de gènes viraux immédiats précoces (*immediate early genes*) (Zoppe, Frattini et al. 1996), (Johnson, Mahajan et al. 1999). L'interaction entre VP-16 et le facteur HCF-1 est très stable et a été conservée depuis les invertébrés. De plus, CREB3 et VP16 sont deux partenaires de HCF1 et les deux lient le même domaine au niveau du facteur HCF, il s'agit d'un domaine de 380 aa situé au niveau du domaine NH2-terminal appelé HCF VIC (Freiman and Herr 1997). Il existe une mutation au niveau du domaine NH2-terminal de HCF appelée mutation P134S observée chez les cellules tsBN67 (lignée cellulaire de hamster) qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire au stade G0/G1. Lors de température non permissive (39.5°C), VP-16 n'est pas capable de lier le facteur HCF et par le fait même n'est pas capable d'induire l'expression de ses gènes cibles au niveau des cellules tsBN67. Comme VP-16, CREB3 n'est pas capable de lier le mutant P134S par essai de type pull down (Freiman and Herr 1997), (Lu, Yang et al. 1997), (Lu, Yang et al. 1998).

L'analyse de la séquence protéique de CREB3 montre la présence d'un motif conservé entre les espèces. Il s'agit d'un motif de 4 acides aminés D/EHXY. Ce motif se trouve aussi au niveau de la séquence de VP16 ainsi qu'au niveau d'autres virus herpès alpha. Ce domaine est en fait le domaine de liaison au facteur HCF1 appelé motif HBM (*HCF-binding motif*). De plus au niveau du domaine d'activation de la transcription de CREB3, il y a deux motifs LxxLL (11-DLLAFLL-17) et (52-DLLCSLL-58) conservés chez la souris et l'humain. Ces motifs ressemblent beaucoup au motif se trouvant au niveau des coactivateurs qui lient les récepteurs nucléaires hormonaux. Il a été démontré, à l'aide de plusieurs mutants CREB3 au niveau desquels les deux derniers leucines de chaque motif ont été échangés par des alanines, que ces motifs influent l'activité transcriptionnelle de CREB3 mais que leur délétion ne supprime pas l'interaction de CREB3 avec le facteur HCF (Luciano and Wilson 2000).

#### 4.iv.ii *Caractérisation du facteur de transcription CREB3*

CREB3 est un facteur de transcription de la superfamille des bZIPs. La protéine humaine présente 71% d'homologie avec la protéine de souris. De plus, une forte homologie a été observée avec la protéine BBF-2/dCREB-A chez la drosophile. La structure de la protéine CREB3 comporte deux domaines fonctionnels : un domaine NH<sub>2</sub>-terminal comprenant un domaine d'activation de la transcription situé au niveau des 100 premiers acides aminés (Lu, Yang et al. 1998) en amont d'un domaine bZIP et un domaine COOH-terminal dont le rôle régulateur a été déterminé plus tard. Une expérience de retard sur gel montre que la protéine CREB3 lie l'élément de réponse CRE (5'-GCCGGTGACGTCATCGCAT) comme la plupart des membres de la famille ATF/CREB. De plus, la protéine CREB3 lie faiblement l'élément de réponse C/EBP (5'-GGTATTGCGTAATTGATAT) mais ne lie pas celui de AP-1 (5'-ACCGGTGACTCAATGGCT). L'ARNm de CREB3 a été observé au niveau de tous les tissus adultes et embryonnaires testés ce qui laisse penser que CREB3 pourrait avoir une expression ubiquitaire (Lu, Yang et al. 1997). Un anticorps dirigé contre les résidus 350-371 a été ultérieurement utilisé pour vérifier si l'expression de la protéine CREB3 est également ubiquitaire (Jin, Wang et al. 2000), ce qui n'a pas pu être vérifié. Toutefois, l'étude réalisée par Jang et collaborateurs montre qu'il y a présence d'un niveau basal de la protéine CREB3 au niveau de 5 lignées cellulaires différentes U937 (*Human leukemic monocyte lymphoma cell line*), THP-1 (*Human acute monocytic leukemia cell*

line), HeLa (*Human epithelial carcinoma cell line*), HOS/CCR1 (*human osteosarcoma expressing CCR1*) et HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) et cette expression est plus importante au niveau des cellules THP-1 (Jang, Kim et al. 2007).

#### 4.iv.iii CREB3 est impliquée dans le stress du RE

Le facteur de transcription CREB3 est une protéine transmembranaire glycosylée de type II ancrée au niveau du RE via son domaine COOH-terminal comme c'est le cas de tous les autres membres de la sous-famille de CREB3. Or la délétion de ce domaine provoque la translocation de la forme clivée vers le noyau. Ce clivage pourrait avoir lieu grâce au mécanisme RIP suite à un stress particulier. En effet, le traitement des cellules Vero (cellules rénales de singe vert africain) avec la Brefeldin A ou l'inhibiteur du protéasome (MG132) provoque l'apparition d'une forme plus courte qui migre au même niveau que le délétant sans le domaine COOH-terminal (Raggio, Rapin et al. 2002). Cette forme constitue la forme active nucléaire de CREB3. De plus, la surexpression de la forme pleine longueur de CREB3 provoque l'apparition de la forme clivée qui migre au même niveau que la forme nucléaire, ce qui indique que la surexpression provoque un clivage constitutif (Liang, Audas et al. 2006).

Suite à l'étude réalisée par DenBoer et ses collaborateurs en 2005, il a été montré que la forme nucléaire de CREB3, comme le facteur XBP1, est capable d'activer la transcription du gène rapporteur de la luciférase via l'élément de réponse UPRE 30 fois comparativement au contrôle et ce en liant spécifiquement le site UPRE in vitro. Une expérience de réaction en chaîne par polymérase en temps réel montre que la transfection de la forme nucléaire de CREB3 au niveau des cellules HEK293 augmente le niveau d'ARNm d'EDEM (ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein) mais aucun effet n'est observé sur d'autres gènes cibles de l'UPR. Toutefois, les expériences réalisées par cette équipe dans le but de déterminer si les agents de stress Tm, Tg et DTT sont impliqués dans le clivage protéolytique de la forme transfectée de CREB3 ont échoué (DenBoer, Hardy-Smith et al. 2005).

Grâce à un essai sur micropuces à ADN réalisé dans le but d'identifier les gènes cibles de CREB3, le gène codant la protéine Herp/Mif1 (homocysteine-induced ER protein) s'est révélé le plus régulé parmi une liste de 108 gènes identifiés. Il s'agit d'une ubiquitine-ligase

liée à la membrane du RE régulée positivement lors d'un stress de ce dernier et impliquée dans la régulation du mécanisme ERAD (ER-associated degradation) (Kim, Kim et al. 2008). Ajouté aux éléments de réponse CRE, C/EBP et UPRE, l'élément de réponse ERSEII (ER stress response element II; ATTGG-N-CCACG) est un autre site de réponse lié par la protéine CREB3 *in vitro* et *in vivo* au niveau du promoteur du gène *Herp*. Il a été rapporté auparavant que la protéine *Herp* joue un rôle important dans l'augmentation de la tolérance des cellules au stress du RE les protégeant ainsi contre l'apoptose induite par ce dernier (Hori, Ichinoda et al. 2004). De plus, la surexpression de la forme nucléaire de CREB3 suite à un traitement avec la Tm (mais pas la staurosporine) réduit l'apoptose de 27% ce qui suggère que CREB3 prévient l'apoptose et ce en induisant l'expression de la protéine *Herp* durant un stress du RE (Liang, Audas et al. 2006).

En résumé, ces résultats suggèrent que CREB3 pourrait jouer un rôle important dans la signalisation du mécanisme de dégradation ERAD lors d'un stress du RE.

#### 4.iv.iv *Zhangfei est un inhibiteur puissant de CREB3*

Zhangfei est une autre protéine de la superfamille des bZIP qui interagit avec le facteur HCF-1 (Lu and Misra 2000). Cette protéine ne présente pas de similitudes frappantes avec la protéine CREB3 mis à part qu'elle possède, comme tous les facteurs de cette famille, un domaine d'activation de la transcription situé au niveau des 30 premiers acides aminés et un domaine bZIP. Or, des expériences de retard sur gel ont montré que cette protéine n'est pas capable de lier les éléments de réponse CRE (5'-GCCGGTGACGTCATCGCAT), AP-1 (5'-ACCGGTGACTCAATGGCT) ou C/EBP (5'-GGTATTGCGTAATTGATAT) et cette incapacité de lier ces sites pourrait être expliquée par une région basique différente (Lu and Misra 2000). Toutefois, la protéine Zhangfei pourrait lier l'ADN en formant un dimère avec un autre facteur de transcription. La protéine Zhangfei présente le motif (D/E)-HXY-(S/A) déjà observé au niveau de CREB3 et VP-16. De plus, elle est capable de lier le facteur HCF *in vitro* et *in vivo* mais pas le mutant HCF-P134S préalablement défini. Il a été démontré que Zhangfei est un puissant inhibiteur de CREB3 et ce en séquestrant le facteur HCF1. En effet, le mutant Zhangfei qui n'est pas capable de lier HCF1 échoue à inhiber l'activité de CREB3. De plus, c'est spécifiquement l'activité de CREB3 via l'élément de réponse UPRE, dépendante de HCF1, que Zhangfei est capable d'inhiber puisqu'elle n'a aucun effet sur l'activité transcriptionnelle de la protéine de fusion GAL4-

CREB3 sur l'élément de réponse GAL4 sachant que cette activité est indépendante de HCF1. De plus, Zhangfei n'a aucun effet sur le facteur de transcription ATF6 probablement parce que ce dernier ne lie pas le facteur HCF1. En conclusion, cette inhibition de l'activité de CREB3 par Zhangfei est dépendante de l'interaction avec HCF1 (Misra, Rapin et al. 2005).

#### 4.iv.v *CREB3 lie la protéine du virus de l'hépatite C*

En 2000, l'équipe du Dr. Jeang a réalisé un double hybride chez la levure pour identifier les protéines qui interagissent avec la protéine VHC en utilisant une librairie d'ADNc de foie humain (Jin, Wang et al. 2000). L'hépatite C est une maladie infectieuse provoquée par un virus à ARN transmissible par le sang. Elle se caractérise par une inflammation du foie qui peut évoluer en une hépatite chronique et provoquer ainsi une cirrhose et un cancer du foie. Ce virus appartient à la famille des Flaviviridae et la protéine VHC qu'il encode présente l'habilité à former des homo voir des multimères. Le complexe protéique viral est localisé au niveau du cytoplasme où il semble associé au RE, aux gouttelettes de lipides, au récepteur lymphotoxine-béta et au récepteur du facteur de nécrose tumorale. Grâce à cette expérience de double hybride, l'ADNc de CREB3/LZIP a été identifié parmi une panoplie d'ADNc. D'après cette étude, la protéine CREB3 est un transactivateur localisé au niveau du noyau où elle lie l'élément de réponse CRE pour activer l'expression de ses gènes cibles. L'interaction de CREB3 avec le cœur de la protéine VHC réprime l'activité de CREB3. Cette interaction prévient la formation d'un homodimère actif nécessaire à la liaison à l'ADN et ce en séquestrant la protéine CREB3 au cytoplasme. De plus, l'effet de prolifération observé suite à la cotransfection de CREB3 avec un dominant négatif CREB3-DN (sans domaine d'activation de la transcription) a été augmenté par l'ajout de la protéine VHC. En conclusion, cette interaction provoque l'inactivation des fonctions activatrices de CREB3 par une séquestration subcellulaire accompagnée d'une prolifération cellulaire et une transformation morphologique anormale ce qui pourrait définir la protéine CREB3 comme un suppresseur de tumeur (Jin, Wang et al. 2000).

#### 4.iv.vi *HCF-like: un autre inhibiteur de l'activité de CREB3*

En 2001, une nouvelle protéine « HCF-like » de 406 acides aminés a été identifiée et nommée HCLP-1. Cette protéine lie CREB3 in vitro et in vivo mais ne lie pas VP-16

contrairement à HCF1. De plus, cette interaction est spécifique à CREB3 car HCLP-1 ne lie aucun autre facteur bZIP comme, par exemple, CREB, ATF4, ATF6, c-Jun ou c-Fos. Il s'agit d'une interaction directe mais qui ne se fait pas via le motif HBM. Mieux encore, cette association entre HCLP-1 et la protéine CREB3 inhibe le potentiel activateur de cette dernière et ce en liant son domaine bZIP ce qui empêche CREB3 de lier l'ADN au niveau du site consensus CRE de la même manière que le virus de l'hépatite C (Zhou, Wong et al. 2001).

#### 4.iv.vii *CCR-1: un autre partenaire de CREB3*

En 2004, l'équipe du Dr. Na a réalisé un double hybride chez la levure pour identifier les protéines qui interagissent avec le récepteur des chémokines CCR-1 (Ko, Jang et al. 2004). En général, il existe deux groupes majeurs de récepteurs de chémokines : CXCR et CCR via lesquels les chémokines transmettent leur signal. Ces dernières sont des protéines sécrétées de petite taille impliquées dans le trafic homéostatique des leucocytes ainsi que leur afflux au niveau des sites de blessure et d'inflammation. Elles sont impliquées dans plusieurs processus comme l'hématopoïèse, l'angiogenèse, la métastase, le rejet des tumeurs, etc. La protéine CREB3 a été identifiée comme partenaire du récepteur CCR-1 et cette interaction a été par la suite confirmée par immunoprécipitation (Ko, Jang et al. 2004). Les deux protéines CREB3 et CCR-1 transfectées au niveau des cellules HEK293 ou endogènes exprimées au niveau des monocytes co-localisent au niveau de la membrane cytoplasmique. En mesurant l'activité chimotactique du CC chémokine leukotactin-1 (Lkn-1) impliqué dans le trafic des leucocytes et le développement de l'inflammation, via le récepteur CCR-1, il s'est avéré que l'ajout de CREB3 au niveau des cellules module l'activité de Lkn-1, ce qui provoque la migration des cellules. Toutefois, la protéine CREB3 agit spécifiquement sur l'activité de Lkn-1 et cette activité est accompagnée d'une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium. Cet effet indique que CREB3 participe à l'induction de la transduction du signal via le chémokine Lkn-1, possiblement en régulant les protéines impliquées dans cette voie de signalisation (Ko, Jang et al. 2004). De plus, il est connu que Lkn-1 transduit son signal entre autre via le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B. Sachant que CREB3 régule spécifiquement l'activité chimotactique de Lkn-1, il était intéressant de connaître l'implication de la protéine CREB3 dans cette voie de signalisation. En effet, l'expression du gène rapporteur NF $\kappa$ B augmente 24 fois en présence

de CREB3 et Lkn-1 comparativement aux contrôles or cet effet n'est pas observé en présence d'un chémokine autre que Lkn-1. De plus, l'inactivation de CREB3 par un ARN d'interférence provoque l'inhibition de l'activation de NFκB. En temps normal, la translocation du facteur NFκB a lieu suite à une dégradation par protéolyse de la protéine IκBα qui le séquestre au cytoplasme. D'ailleurs, au niveau des cellules transfectées avec CREB3, Lkn-1 augmente la dégradation de la protéine IκBα, ce qui augmenterait par conséquent sa translocation vers le noyau et, par le fait même, sa liaison à l'ADN au niveau des cellules HOS et des monocytes THP-1 (Jang, Kim et al. 2007). De plus, l'expression basale de CREB3 au sein de certaines lignées cellulaires (THP-1, U937, HeLa, HEK293 et HOS/CCR1) augmente de 2.5 à 6 fois en ajoutant différents chémokines. Évidemment Lkn-1 donne le plus d'effet et celui-ci est dose-dépendant. Ceci indique que Lkn-1 induit l'expression de la protéine CREB3. L'étude du promoteur du gène CREB3 a révélé des sites de liaison de plusieurs facteurs impliqués dans le processus de l'inflammation et de la régulation du système immunitaire incluant NFκB. Des expériences de retard sur gel en présence ou en absence du peptide inhibiteur de NFκB SN50 ont montré que le facteur NFκB lie l'élément de réponse au niveau de la région -589 à -568 du promoteur du gène CREB3 et induit l'expression de la protéine via l'hétérodimère p65-p50 ou l'homodimère p65 et cette liaison à l'ADN est augmentée par l'ajout du chémokine Lkn-1. Ceci nous indique une boucle dans la régulation de la mobilité des monocytes par CREB3 via Lkn-1 et ainsi dans le contrôle de l'inflammation (Jang, Kim et al. 2007). Curieusement, la surexpression de la protéine CREB3 au niveau des cellules THP-1 provoque l'augmentation du niveau de l'ARNm et de la protéine des récepteurs CCR-1 et CCR-2. Le récepteur CCR-2 est hautement exprimé au niveau des monocytes, des macrophages et des lymphocytes T et joue un rôle important dans la circulation des leucocytes et dans le développement de l'athérosclérose. L'augmentation de l'expression du récepteur CCR-2 peut être expliquée par la présence d'un élément de réponse C/EBP au niveau de sa région promotrice que lie CREB3 in vitro. De plus, comme il a déjà été démontré que la protéine CREB3 augmente la migration des cellules THP-1 en réponse au chémokine Lkn-1 (Ko, Jang et al. 2004), un effet similaire est observé en réponse au chémokine MCP-1 (Sung, Kim et al. 2008). Éventuellement, la protéine CREB3 serait impliquée dans le développement de l'athérosclérose (Sung, Kim et al. 2008).

#### 4.iv.viii *CREB3 est séquestrée au noyau par la protéine LRF*

Un double hybride chez la levure utilisant le domaine bZIP de CREB3 a permis d'identifier la protéine LRF comme partenaire de CREB3 (Audas, Li et al. 2008). LRF est une protéine de 639 aa très conservée à travers l'évolution. Elle présente plus de 95% d'homologies avec la protéine de souris et de rat. La structure de la protéine présente un domaine hautement acide au niveau des acides aminés 355 et 399 et un domaine bZIP entre les acides aminés 521 et 576 avec un deuxième motif qui ressemble au zipper de leucine situé avant le domaine bZIP. Les deux protéines interagissent ensemble *in vivo* et *in vitro* via le domaine C-terminal de LRF. C'est plus spécifiquement via les deux zipper de leucine que l'interaction se fait et c'est au noyau qu'elle a lieu. Des expériences d'immunofluorescence montrent que la protéine LRF est nucléaire et forme des corps nucléaires qui co-localisent parfaitement avec la protéine GRIP1 (glucocorticoid receptor interacting protein-1) qui elle-même s'associe avec les corps de ND10 (*Nuclear domain 10*). En effet, la co-expression des deux protéines au niveau des cellules HEK293 montre que LRF recrute CREB3 au niveau de ces corps nucléaires. Ce recrutement est accompagné d'une diminution de la demi-vie de la protéine CREB3 alors que le niveau de l'ARNm ne change pas ce qui indique que cette diminution pourrait être causée par une augmentation de la dégradation de CREB3 et non par la diminution de sa transcription. De plus, LRF séquestre CREB3 au niveau des corps nucléaires pour la réprimer et ce en excluant le facteur HCF-1. En fait ce que propose l'équipe du Dr Lu est que suite à un stress particulier, CREB3 est clivée et migre vers le noyau où elle lie le facteur HCF-1 et régule l'expression de gènes cibles impliqués dans la réponse au stress UPRE comme les gènes codant Herp ou EDEM (Audas, Li et al. 2008). À un temps précis de la réponse au stress, le niveau d'expression de LRF augmente au noyau où il va séquestrer CREB3 au niveau des corps nucléaires l'empêchant d'activer la transcription de ces gènes cibles et promeut sa dégradation par le protéasome (Audas, Li et al. 2008).

#### 4.iv.ix *HDAC3 inhibe l'activité de CREB3*

Suite à une expérience de double hybride chez la levure, CREB3 a été identifiée comme partenaire de l'histone déacétylase HDAC3. Cette enzyme participe à la désacétylation des protéines non histones comme par exemple p53, NFkB et Smad7 ((Monte, Simonatto et al.



2006), (Choi, Jung et al. 2009), (Tabata, Kokura et al. 2009)). De plus, parmi la classe I des HDACs, CREB3 interagit spécifiquement avec HDAC3 in vitro et in vivo (Kim, Choi et al.) Au niveau des cellules MDA-MB-231, la surexpression de CREB3 induit l'expression du récepteur CXCR4 par hyperacétylation des histones de l'élément de réponse CRE au niveau du promoteur de CXCR4 suite à la dissociation de HDAC3. De plus, l'ajout d'un ARN d'interférence dirigé contre HDAC3 augmente l'effet activateur de CREB3 sur CXCR4 (Kim, Choi et al. 2010). Ensemble, ces informations nous indiquent que HDAC3 inhibe l'activité transcriptionnelle de CREB3.

#### 4.iv.x *La protéine DC-STAMP lie le domaine régulateur de CREB3*

Au niveau des cellules dendritiques, la protéine CREB3 a été identifiée comme partenaire de la protéine DC-STAMP, une protéine impliquée dans la différenciation des myéloïdes et dans la formation des cellules géantes (Eleveld-Trancikova, Sanecka et al. 2010). Les deux protéines transfectées au niveau des cellules HEK293 et CHO co-localisent au niveau du RE. De plus, la protéine CREB3 a été observée au niveau du RE des cellules dendritiques immatures. Une fois la maturation complétée, il se produit un clivage protéolytique de CREB3 qui transloque alors au noyau où probablement elle va réguler l'expression de ses gènes cibles. Cette maturation est accompagnée aussi d'une migration de la protéine DC-STAMP vers l'appareil de golgi et d'après l'étude de l'équipe du Dr. Adema, cette translocation est influencée par la protéine OS9, un autre partenaire de DC-STAMP et de la protéine CREB3 (Eleveld-Trancikova, Sanecka et al. 2010). De plus, la surexpression de DC-STAMP au niveau des cellules CHO, n'exprimant pas DC-STAMP, provoque la modulation du clivage de CREB3 suite à un traitement avec la BA. En conclusion, au niveau des cellules dendritiques immatures, CREB3 et DC-STAMP forment un complexe au niveau de la membrane du RE. Suite à la maturation de ces cellules, le complexe va migrer vers l'appareil de golgi où CREB3 va subir le clivage par les protéases S1P et S2P. La forme clivée libérée migre alors au noyau pour réguler la transcription de ses gènes cibles (Eleveld-Trancikova, Sanecka et al. 2010).

## 4.v OASIS

La population cellulaire du système nerveux est hétérogène et est formée de cellules neuronales et de cellules gliales. Les astrocytes sont des cellules gliales de forme étoilée qui présentent l'habilité de proliférer durant des conditions de stress et ce grâce à leur capacité d'activer la réponse au stress UPR (Saito, Hino et al. 2007). La gliose est une inflammation caractéristique des astrocytes en réponse à une blessure au niveau du système nerveux central. Ce dommage peut résulter d'une manipulation chirurgicale, d'un traumatisme crânien aigu ou des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Afin de mieux comprendre ce phénomène, l'équipe de Wanaka a réalisé un criblage de gènes spécialement induits au niveau de vieux astrocytes utilisés comme modèle de gliose in vitro (Honma, Kanazawa et al. 1999). Le gène codant la protéine OASIS : « old astrocyte specifically-induced substance » a été identifié parmi les gènes exprimés au niveau d'astrocytes de souris en culture pendant une longue période (11 ou 12 semaines sans passage) appelés vieux astrocytes.

### 4.v.i *Caractérisation de la protéine OASIS*

La protéine OASIS murine est un facteur de transcription de 508 acides aminés codés par un ADNc de 1524 paires de bases présentant un domaine bZIP, d'où son appartenance à la famille ATF/CREB. Chez la souris, son profil d'expression varie selon le stade de développement. En effet, l'ARNm d'OASIS est d'abord exprimé au niveau des glandes salivaires, du bourgeon dentaire et du cartilage de l'embryon. Au jour 0 après la naissance, l'expression d'OASIS est forte au niveau des poumons et des reins. Deux semaines après la naissance, le niveau d'ARNm est important au niveau du cerveau mais diminue pendant l'âge adulte. Cependant, le buvardage de type «northern» montre que l'ARNm d'OASIS est quand même présent au niveau de plusieurs tissus de souris adulte (Honma, Kanazawa et al. 1999) de même chez l'humain où on observe une expression ubiquitaire accompagnée d'un signal intense au niveau de la prostate et du pancréas (Omori, Imai et al. 2002). Ceci suggère un rôle pour ce facteur dans la régulation générale de la transcription au niveau des

tissus normaux. Toutefois, une induction de l'expression d'OASIS est observée en réponse à une blessure au niveau du cortex cérébral de la souris adulte et ce au niveau de la région entourant le tissu nécrosé (Honma, Kanazawa et al. 1999). La distribution du patron d'expression des cellules qui expriment OASIS au niveau de ce cortex endommagé est très similaire au patron d'expression de la protéine acide fibrillaire gliale : la GFAP (glial fibrillary acidic protein), marqueur de l'activation astrocytaire. Ainsi, la protéine OASIS pourrait jouer un rôle dans la gliose (Honma, Kanazawa et al. 1999).

4.v.ii *OASIS est impliquée dans le développement des os et du bourgeon dentaire*

De plus, chez l'embryon de souris, la protéine OASIS présente le même profil d'expression que la protéine ostéopontine. Cette protéine fait partie de l'ensemble de protéines non collagéniques de la matrice osseuse qui s'exprime durant les stades tardifs du développement de l'os si on la compare à l'expression de la protéine *Cbfa1* (*core binding factor alpha 1*) qui régule les premières phases de différenciation. Ceci impliquerait la protéine OASIS dans la phase tardive de la différenciation des ostéoblastes (Nikaido, Yokoya et al. 2001). De plus, le profil d'expression de la protéine OASIS présente une certaine analogie au niveau de certains tissus avec celui du facteur de transcription XBP-1, un autre membre de la famille ATF/CREB. Les deux facteurs de transcription pourraient se dimériser au niveau des tissus où ils colocalisent pour réguler l'expression de gènes cibles nécessaires au développement du squelette (Nikaido, Yokoya et al. 2001). De plus, le patron d'expression spatio-temporel des protéines Decorin et Syndecan-3, deux protéoglycanes exprimés au niveau du germe dentaire, coïncide parfaitement avec celui de la protéine OASIS. Tout ceci suggère que l'expression du gène codant la protéine OASIS pourrait être liée directement ou indirectement à l'expression de ces protéoglycanes et pourrait jouer un rôle important dans la différenciation des odontoblastes (Hikake, Mori et al. 2003).

4.v.iii *OASIS est impliquée dans la réponse au stress du RE*

En 2002, l'équipe de Sugano a utilisé la séquence murine d'OASIS comme marqueur de séquence exprimée (EST) pour chercher l'équivalent humain d'OASIS. L'ADNc de la protéine pleine longueur code pour 519 acides aminés présentant 84.8% de similitudes avec

la protéine murine (Omori, Imai et al. 2002). L'activité transcriptionnelle d'OASIS a été mesurée en utilisant le gène rapporteur de la luciférase et montre qu'OASIS est un activateur de la transcription et son domaine transactivateur est situé au niveau des premiers 60 acides aminés. Cet effet sur la transcription est accentué suite à la délétion du domaine COOH terminal considéré comme un domaine régulateur (Omori, Imai et al. 2002). Étant membre de la famille ATF/CREB, il était impératif de tester si la protéine OASIS pouvait lier l'élément de réponse CRE mais aussi l'élément box-B (TTACGTGT) (Honma, Kanazawa et al. 1999), et les éléments du facteur ATF6 (TGACGTGG) (Omori, Imai et al. 2002). Ainsi, il a été démontré par l'intermédiaire des expériences de retard sur gel et d'essai luciférase que la protéine OASIS lie ces trois éléments de réponse *in vitro* et, par le fait même, active l'expression du gène de la luciférase via ces éléments.

Par la suite, la localisation subcellulaire d'OASIS a été démontrée par immunofluorescence au niveau des cellules Hela. La protéine pleine longueur transfectée a été observée au niveau des structures réticulaires déterminées par une coloration à la Rhodamine alors que la protéine sans le domaine C-terminal était diffuse dans toute la cellule avec une coloration intense du noyau (Omori, Imai et al. 2002). En vue de déterminer l'effet du stress du RE sur la localisation d'OASIS, des cellules de gliome C6 exprimant de façon stable la protéine OASIS ont été traitées ou non par la thapsigargine. La protéine OASIS localise au niveau du RE des cellules non stressées et migre au noyau après un traitement des cellules avec la thapsigargine pendant 12h (Kondo, Murakami et al. 2005). Suite au même traitement, l'équipe d'Imaizumi observe par immunobuvardage, en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine OASIS endogène, l'apparition d'une forme plus courte d'OASIS correspondant à la forme active nucléaire d'OASIS. D'abord un clivage constitutif d'OASIS a été observé suite à une surexpression de la protéine pleine longueur au niveau des cellules du rein COS7. Ceci prédisait déjà une régulation protéolytique de la protéine semblable aux facteurs ATF6 et SREBP (Omori, Imai et al. 2002). Les expériences réalisées plus tard ont montré que ce clivage est assuré par les protéases S1P et S2P et suggèrent ainsi que la protéine OASIS est régulée par le mécanisme RIP suite à un stress du RE dû au mal repliement des protéines et étonnamment cette régulation est spécifique aux astrocytes malgré une expression ubiquitaire de la protéine (Kondo, Murakami et al. 2005).

Une immunohistochimie réalisée après 7 jours sur une lésion au niveau du cortex cérébral d'une souris montre l'induction du niveau de l'ARNm d'OASIS aux alentours du tissu nécrosé. La localisation de la protéine OASIS correspond parfaitement à celle de BiP ce qui nous indique qu'OASIS se trouve au niveau de RE des cellules entourant la lésion. De plus, la forme clivée d'OASIS est observée par immunobuvardage au niveau du cortex endommagé. Tout ceci nous amène à penser que l'expression de la protéine OASIS au niveau des astrocytes pourrait être impliquée dans l'activation de l'UPR au niveau de la lésion du cortex. De surcroît, le niveau d'expression de la protéine BiP diminue de 50% après la transfection d'un ARN d'interférence dirigé contre OASIS au niveau des cellules de gliome C6 traitées avec la thapsigargine. Donc, la protéine OASIS est importante pour l'induction de la chaperonne BiP particulièrement durant les phases tardives de la réponse au stress et ce directement via les éléments de réponse ERSE et CRE situés au niveau du promoteur du gène de la chaperonne. Par contre, il n'y a pas de diminution rapportée des niveaux d'expression des autres gènes impliqués dans le stress du RE hormis la protéine disulfide isomérase (PDI) impliquée dans la formation des ponts disulfures lors du repliement des protéines (Kondo, Murakami et al. 2005).

Il a déjà été rapporté que la chaperonne BiP possède un rôle protecteur sur la cellule (Reddy, Mao et al. 2003). L'induction de l'expression de la chaperonne BiP par OASIS augmente l'effet protecteur au niveau des astrocytes stressés. En effet, la surexpression de la protéine OASIS confère une résistance à l'induction de l'apoptose suite au stress du RE. Cet effet est aboli en diminuant l'expression d'OASIS par ARN d'interférence. Ainsi la protéine OASIS est nécessaire pour la survie des astrocytes après le stress du RE mais les mécanismes par lesquels elle agit ne sont pas encore élucidés (Murakami, Kondo et al. 2006); (Saito, Hino et al. 2007). Toujours dans le but de démontrer l'effet protecteur d'OASIS au niveau des astrocytes, Chihara et collaborateurs ont utilisé l'acide kaïnique (AK) pour prouver cette idée (Chihara, Saito et al. 2009). Il a été démontré dans des études préalables que cet acide, analogue de l'acide glutamique, provoque la mort cellulaire des neurones au niveau du système limbique (Coyle, Ferkany et al. 1983). Cet effet toxique peut être attribué directement à une stimulation du récepteur de l'acide glutamique ou indirectement en augmentant la libération des acides aminés excitateurs par les

terminaisons nerveuses (Ferkany, Zaczek et al. 1984). De plus, il a été lié récemment à l'induction du stress du RE in vitro et in vivo (Sokka et al. 2007) en perturbant l'homéostasie du calcium (Pearce et al. 1986). Fait intéressant, l'injection du AK induit le niveau de l'ARNm de BiP in vivo au niveau des neurones pyramidaux et des astrocytes ce qui indique la présence d'un stress du RE. Cette induction est accompagnée par celle de l'ARNm d'OASIS au niveau des astrocytes. Cependant, les astrocytes provenant de souris déficiente OASIS <sup>-/-</sup> (qui sera développé dans le prochain paragraphe) prolifèrent moins en présence de la tunicamycine comparativement au contrôle, d'où, l'effet protecteur d'OASIS au niveau des astrocytes.

Jusqu'à récemment, les astrocytes étaient considérés comme un support d'échafaudage inerte pour les neurones et leurs interactions. Mais il s'avère de plus en plus qu'ils exercent une influence majeure sur l'environnement extracellulaire et sont essentiels pour les interactions neuro-gliales critiques à leur tour pour les maladies neurodégénératives (Zhong, Ramaswamy et al. 2009). Les astrocytes sont la source majeure de l'apolipoprotéine E (apoE) au niveau du cerveau non stressé. Une des 3 isoformes connues de cette protéine est l'apoE4. Cette protéine est la plus instable des trois et a tendance à former des agrégats, ce qui expose son site d'interaction. De plus, elle présente le plus haut risque associé à la formation de la maladie d'Alzheimer. En générant une souris apoE4-Arg61 qui exprime l'apoE4 présentant une arginine au niveau de l'acide aminé en position 61, il était possible d'apprécier la relation entre cette protéine et les maladies neurodégénératives. En absence de stress, les souris apoE4-Arg61 présentent moins de protéines apoE4-Arg61 secrétées. En effet, le domaine d'interaction de cette protéine est reconnu par le système de contrôle qualité du RE comme une protéine mal repliée, ce qui active une réponse à ce stress et affecte en conséquence la fonction des astrocytes. Cette réponse active à son tour 3 effecteurs : IRE1, PERK et OASIS et leurs gènes cibles. Étonnamment, le clivage de la protéine OASIS dépend de l'âge de la souris montrant que la réponse au stress spécifique aux astrocytes est âge-dépendante. Autrement dit, les astrocytes de souris jeunes non exposées à un stress quelconque arrivent à maintenir le contrôle qualité au niveau du RE et assument bien leurs fonctions. Cependant, quand l'effet s'accumule à cause de l'âge, du stress oxydatif ou de l'ischémie, les astrocytes seront

appelés à produire plus de protéines apoE4 pour la réparation neuronale. Au niveau de la souris apoE4-Arg61, cet effet augmente le stress du RE, observé suite à l'augmentation de l'expression d'OASIS ainsi qu'à son clivage, ce qui rend le support de ces astrocytes aux neurones moins efficace. Sans le support des astrocytes, les neurones continuent d'exprimer l'apoE mais dans le cas de l'apoE4, cette expression provoque la génération de fragments C-terminaux neurotoxiques ce qui augmente le dommage neuronal et la dégénération et ultimement l'apparition de la maladie d'Alzheimer (Zhong, Ramaswamy et al. 2009).

#### 4.v.iv *Souris déficiente OASIS<sup>-/-</sup>*

En analysant davantage la souris déficiente OASIS<sup>-/-</sup>, il était intéressant de constater une ostéopénie sévère accompagnée d'un retard de la croissance. Ce phénotype est causé par une diminution de la formation osseuse associée à un délai dans la maturation des ostéoblastes. Une analyse par microscopie électronique de sections fines du tibia révèle la présence d'un réticulum endoplasmique rugueux anormalement élargi. Néanmoins, ce phénomène n'a pas été observé au niveau d'autres types cellulaires comme, par exemple, les chondrocytes ou les ostéocytes. Cette forme anormale est due à une accumulation des protéines de la matrice osseuse procollagène1a1 et osteocalcine au niveau du RE (au lieu d'être secrétées) ce qui contribue à l'ostéopénie. Grâce à une expérience de micropuces d'ADN, il a été démontré que le niveau d'ARNm de procollagène1a1 diminue de 30 à 40% au niveau du tissu osseux de la souris OASIS<sup>-/-</sup> (Murakami, Saito et al. 2009). Donc, le gène codant la protéine du procollagène1a1 pourrait être régulé par OASIS. En effet, ce facteur bZIP lie directement l'élément de réponse *UPRE-like* (CGACGTGG) situé au niveau de la région promotrice -1.5 et -1.6 Kb. Autre fait intéressant, l'ARNm d'OASIS ainsi que son clivage sont induits au niveau des ostéoblastes suite à un traitement avec la protéine BMP-2 (*Bone morphogenetic protein2*), protéine nécessaire à la formation de l'os et à la différenciation des ostéoblastes. Ce traitement induit un stress atténué au niveau du RE probablement dû à une forte demande en protéines lors de la différenciation des ostéoblastes et ce stress joue un rôle fondamental dans le processus physiologique de la formation osseuse (Murakami, Saito et al. 2009).

#### 4.v.v *La protéine Syncytine-1 régule l'expression d'OASIS*

Chez les patients atteints de sclérose en plaques, l'effet protecteur de la protéine OASIS n'a pas été observé. En effet, chez ces individus, on observe la surexpression d'une protéine appelée la Syncytine-1 au niveau du système nerveux central. Cette protéine est en fait une glycoprotéine d'enveloppe rétrovirale, codée par l'ADN du rétrovirus humain endogène HERV-W, impliquée dans la formation du syncytium au niveau du placenta afin de faciliter son développement. Par contre, chez les patients atteints de sclérose en plaques, cette protéine régule toute la cascade inflammatoire et qui à son tour, est elle-même régulée par les facteurs pro-inflammatoires comme, par exemple, le facteur TNF $\alpha$  au niveau des astrocytes (Antony, Ellestad et al. 2007). L'étude de l'équipe du Dr Power montre que la surexpression de la syncytine-1 provoque l'induction du facteur de transcription OASIS qui, à son tour, régule positivement l'expression de la chaperonne BiP, de la protéine de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et du répresseur Egr1 (*early growth response 1*) (Antony, Ellestad et al. 2007). On observe aussi une libération de cytotoxines par les oligodendrocytes et une diminution de l'expression de la protéine de la myéline. Associé à tout ceci, une diminution de l'expression du récepteur de la Syncytine : ASCT1, et non du récepteur ASCT2, augmente probablement l'effet pathogénique de la protéine Syncytine-1. Tout ceci implique la protéine OASIS dans la neuroinflammation en augmentant l'effet pathogénique des cellules résidentes du système nerveux central incluant les microglies et les macrophages ainsi que les astrocytes dans cette maladie (Antony, Ellestad et al. 2007).

#### 4.v.vi *Les facteurs CREB et OASIS régulent l'expression du facteur de transcription GMCa*

Au niveau du placenta, la protéine syncytine-1 régule l'expression du gène codant la protéine GMCa (chorion specific transcription factor). Il s'agit en fait d'un facteur de transcription qui régule la fusion des cellules du placenta chez les mammifères. Il a été rapporté préalablement que la voie de signalisation AMPc/PKA induit l'expression de ce facteur de transcription. Une étude publiée en 2008 par l'équipe du Dr Hashemolhosseini montre que la présence de la protéine TORC1 (transducer of regulated CREB activity), co-activateur de CREB3, augmente l'expression du facteur GMCa et l'induction a lieu via CREB puisque un ARN d'interférence contre CREB abolit cet effet (Schubert, Abendroth et al. 2008). L'autre fait intéressant est que la protéine OASIS, parmi une panoplie de facteurs de transcription bZIP, est la seule à lier des sites consensus CRE au niveau du



promoteur du gène GMCa et induit par conséquent son expression. De plus, une analyse du profil spatio-temporel des protéines CREB et OASIS a montré que ces protéines sont exprimées de façon consécutive (Schubert, Abendroth et al. 2008). En effet, la protéine CREB est induite entre le stade embryonnaire E6.5 et E12.5 et diminue par la suite, alors que la protéine OASIS est induite à partir du stade embryonnaire E12.5. Au cours du développement du placenta durant l'embryogenèse, les protéines CREB et OASIS régulent l'expression du facteur de transcription GMCa de façon séquentielle (Schubert, Abendroth et al. 2008). Toutefois, le rôle d'OASIS au niveau du placenta ainsi que son activation demeurent inconnus.

#### 4.vi BBF2H7

##### 4.vi.i *Identification du facteur chimère FUS-BBF2H7*

Le facteur de transcription BBF2 human homolog on chromosome 7 (BBF2H7/CREB3L2) est le deuxième membre de la sous-famille de CREB3 et l'homologue du gène Bbf-2 chez la drosophile (Storlazzi, Mertens et al. 2003). Le gène CREB3L2 a été identifié en 2003 par l'équipe du Dr Panagopoulos comme partenaire du gène FUS et ce parmi des transcrits chimères au niveau de deux cas de sarcome fibromyxoïde de bas grade (SFMBG). Il s'agit, dans ce cas, d'une tumeur maligne rare des tissus mous de morphologie bénigne potentiellement métastatique qui affecte les jeunes adultes (Panagopoulos, Storlazzi et al. 2004). Ces sarcomes se développent au niveau du tissu conjonctif commun extra-squelettique comme le tissu adipeux, tissu musculaire, vaisseaux et système nerveux périphérique (Storlazzi, Mertens et al. 2003). L'examen histopathologique de ces tumeurs montre que chacune d'elle exhibe des caractéristiques cliniques et morphologiques propres. De plus, chaque sarcome présente du point de vue cytogénétique des translocations chromosomiques précises entraînant la fusion de deux gènes et la formation de chimères. Plus d'une vingtaine de fusions de gènes ont été préalablement rapportées au niveau de différents types de sarcomes et ces chimères jouent un rôle important dans le diagnostic dû à leur potentiel de marqueur de tumeur (Panagopoulos, Storlazzi et al. 2004). En général, la fusion se fait entre deux facteurs de transcription formant ainsi un facteur chimère qui utilise le domaine d'activation de l'un et le domaine de liaison à l'ADN de l'autre (Storlazzi, Mertens et al. 2003). Le gène FUS (fused in sarcoma), codant une ribonucléoprotéine appartenant à la famille FET impliquée dans plusieurs processus cellulaires, a préalablement été identifié comme le partenaire en 5' de trois différents gènes. Au niveau de la tumeur maligne grasseuse des tissus mous appelée liposarcome myxoïde, le gène FUS est fusionné au facteur de transcription DDIT3 ou CHOP. La deuxième fusion a été rapportée au niveau de l'histiocytome fibreux angiomatoïde avec le facteur ATF1, un autre membre de la famille ATF/CREB. Et la troisième a été trouvée au niveau de leucémie myéloïde aigüe avec le facteur ERG, membre de la famille ETS (Storlazzi, Mertens et al. 2003). BBF2H7 fût le 4<sup>ème</sup> facteur de la famille ATF/CREB faisant partie de ces fusions.

Cette fusion peut être expliquée par un simple échange entre les chromosomes 7 et 16 ou par un remaniement plus étendu des segments contenant les loci de FUS et BBF2H7 considéré comme un réarrangement chromosomique secondaire. En fait, il s'agit précisément de la fusion des 5 premiers exons du gène FUS plus une partie du 6<sup>ème</sup> exon avec une partie du 5<sup>ème</sup> exon du gène BBF2H7 additionné aux exons 6 à 12. Au final, la protéine obtenue est composée d'un domaine trans-activateur de FUS en N-terminal en fusion avec le domaine bZIP et C-terminal de BBF2H7 (Storlazzi, Mertens et al. 2003). La fusion FUS-CREB3L2 va alors se comporter comme un facteur de transcription anormal qui, d'une part, est sous le contrôle du promoteur de FUS et va acquérir les propriétés oncogéniques de FUS et, d'autre part, va subir le même clivage protéolytique suite à un stress du RE (point développé dans le prochain paragraphe) et migrer au noyau pour activer ou déréguler l'expression de ses gènes cibles. De plus, les membres de la sous-famille de CREB3 ont la particularité de se dimériser entre eux mais pas avec les autres membres de la grande famille ATF/CREB. Cette particularité pourrait être modifiée à cause du nouveau domaine NH2-terminal de la protéine ce qui contribuerait peut-être à la formation de nouveaux dimères (Storlazzi, Mertens et al. 2003), (Panagopoulos, Moller et al. 2007).

#### 4.vi.ii *BBF2H7 est régulée par le mécanisme RIP*

Le gène BBF2H7/CREB3L2 est composé de 12 exons qui codent pour une protéine de 520 acides aminés chez l'homme. L'homologue de BBF2H7 chez le rat, nommé SCIRR69 (*Spinal cord injury and regeneration related protein No.69*), a été identifié parmi les gènes surexprimés après une lésion complète de la corde spinale chez les rats adultes (Huang, Que et al. 2009). Cette protéine présente 97 et 95 % de similitudes avec la protéine BBF2H7 chez la souris et chez l'homme respectivement. La protéine BBF2H7 présente un domaine NH2-terminal, un domaine bZIP et un domaine COOH-terminal. Le domaine bZIP affiche une forte similarité avec le domaine des autres membres de la sous-famille de CREB3. Cette identité est de 80% avec OASIS, 60% avec CREBH, 59% avec A1bZIP et 56% avec CREB3. De plus, le motif de glissière de leucine est très similaire à celui de CREBH et d'A1bZIP. Ajoutons à ceci une forte homologie entre BBF2H7 et OASIS en aval du domaine bZIP. D'après l'étude de Storlazzi, BBF2H7 est exprimée au niveau de la plupart des tissus fœtaux et adultes testés par RT-PCR (pancréas, foie, ovaire, prostate, testicules...) particulièrement au niveau du placenta où le niveau d'ARNm est très

important (Storlazzi, Mertens et al. 2003); (Panagopoulos, Moller et al. 2007). Des essais luciférase réalisés avec la forme pleine longueur de BBF2H7 ainsi que différents délétants montrent que BBF2H7 active la transcription du gène rapporteur de la luciférase via son domaine d'activation de la transcription situé au niveau des 120 premiers acides aminés. Fait intéressant, la protéine de fusion FUS-BBF2H7 active la transcription du gène rapporteur de la luciférase 7 fois plus que la protéine BBF2H7 pleine longueur. Étant un membre de la famille ATF/CREB, il était impératif de tester la régulation de la transcription par les protéines BBF2H7, BBF2H7 sans le domaine transmembranaire ( $\Delta Tm$ ) FUS-BBF2H7 et FUS-BBF2H- $\Delta Tm$  via les éléments de réponse CRE, Box-B et les éléments de ATF6 par essai luciférase. Il s'est avéré que toutes ces protéines sont capables d'activer la transcription du gène de la luciférase via ces 3 éléments (Panagopoulos, Moller et al. 2007). Habituellement, le domaine C-terminal des protéines de la sous-famille de CREB3 exerce un effet régulateur et la délétion de ce dernier active plus fortement la transcription du gène rapporteur de la luciférase. Ce phénomène n'a pas été observé dans le cas de la protéine BBF2H7 ou de la protéine de fusion FUS-BBF2H7. Par contre, cette délétion provoque le changement de localisation subcellulaire de ces protéines qui passent du cytoplasme vers le noyau (Panagopoulos, Moller et al. 2007); (Kondo, Saito et al. 2007). Cette relocalisation de BBF2H7 au noyau a été observée, par immunofluorescence, suite au traitement des cellules HeLa avec l'inhibiteur du protéasome MG132 ou la thapsigargine (Kondo, Saito et al. 2007). Donc comme pour les autres membres de la sous-famille de CREB3, BBF2H7 est localisée au RE et présente les mêmes caractéristiques structurales (domaine transmembranaire, séquence consensus pour la protéase S1P RxxL) ce qui suggère que la protéine BBF2H7 serait elle aussi clivée par le mécanisme RIP comme les protéines ATF6 et OASIS (Kondo, Saito et al. 2007). Malgré la détection de l'ARNm de BBF2H7 au niveau de plusieurs tissus humains adultes et fœtaux, la protéine BBF2H7 n'a été observée que suite à un traitement des cellules de gliome C6 avec l'agent de stress thapsigargine. Cette induction importante de l'expression de la protéine est accompagnée, à moindre niveau, d'une augmentation de deux fois seulement du niveau de l'ARNm. Néanmoins, cette augmentation du niveau de la protéine n'est pas due à une stabilisation de sa dégradation mais à une induction de la traduction de la protéine comme le montrent des expériences avec la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction (Kondo, Saito et al.

2007). Ce même phénomène a déjà été observé dans le cas du facteur de transcription de la famille ATF/CREB : ATF4. Cependant, la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ , suite à l'exposition des cellules de gliome C6 à certains stress comme la privation en acides aminés ou au rapamycine, n'induit pas l'expression de BBF2H7, ce qui suggère qu'une voie autre que la voie PERK-eIF2 $\alpha$  est impliquée dans la régulation positive de la traduction de ce facteur de transcription pendant le stress du RE et que BBF2H7 est impliquée dans la phase tardive de la réponse au stress du RE (Kondo, Saito et al. 2007). L'analyse *in silico* du promoteur de BBF2H7, plus précisément des 2000 paires de bases situées en amont du premier exon du gène CREB3L2, a montré la présence d'une séquence CCAATTGG en amont du site de transcription de CREB3L2 ce qui suggère que la boîte CCAAT pourrait être utilisée dans les deux sens, ce qui confère au promoteur une bidirectionnalité dans l'initiation de la transcription. De plus, une séquence consensus CRE (GTGACGTCAC) hautement conservée à travers les espèces a été identifiée. La présence de cet élément de réponse au niveau du promoteur de BBF2H7 indique qu'il fait partie des gènes régulés par divers membres de la famille ATF/CREB, incluant les protéines CREB, ATF6 mais aussi BBF2H7 elle-même.

#### 4.vi.iii *Le rôle de BBF2H7 dans le cerveau endommagé*

En 2007, l'équipe du Dr Imaizumi a voulu réaliser une étude comparative entre les protéines BBF2H7 et OASIS exprimées toutes les deux au niveau du cerveau. La première est abondamment exprimée au niveau des cellules de gliome C6 traitées avec la thapsigargine tandis que la deuxième elle est surexprimée au niveau d'astrocytes de cerveau endommagé (Kondo, Saito et al. 2007). Dans le but de vérifier si BBF2H7 est fortement exprimée au niveau du cerveau endommagé, Kondo et collaborateurs ont utilisé un modèle de souris ayant une ischémie focale permanente au niveau du cerveau associée à une accumulation de protéines immatures au niveau du RE. L'hypoxie provoquée par l'ischémie et l'accumulation de protéines produisent, toutes les deux, un stress au niveau du RE. De plus, une immunohistochimie réalisée sur la région péri-infarctus du striatum (structure nerveuse paire formée par le noyau caudé et le putamen) montre, que contrairement à OASIS, BBF2H7 est exprimée au niveau des neurones (Kondo, Saito et al. 2007). Pour déterminer la signification physiologique de cette observation et ainsi déterminer le rôle physiologique de BBF2H7 au niveau des neurones, des cellules

humaines de neuroblastomes SK-N-SH ont été transfectées avec la protéine pleine longueur BBF2H7 ou la forme courte BBF2H7-376 aa. La viabilité des cellules a été mesurée après 24h de traitement avec la thapsigargine. La surexpression de ces protéines diminue la mort cellulaire par apoptose, cependant cette diminution ne se fait pas via la chaperonne BiP comme dans le cas d'OASIS. Pour confirmer cet effet protecteur de BBF2H7, un ARN d'interférence dirigé contre BBF2H7 a été utilisé chez des cellules SK-N-SH traitées 24h avec la thapsigargine. L'élimination de BBF2H7 s'est traduite par une augmentation de la sensibilité des cellules au stress du RE sans altérer les niveaux des protéines comme BiP, CHOP ou XBP-1. Ces résultats suggèrent que BBF2H7 pourrait jouer un rôle important dans la protection des neurones contre l'apoptose induite par le stress du RE (Kondo, Saito et al. 2007).

#### 4.vi.iv *Souris déficiente Bbf2h7<sup>-/-</sup>*

La génération de souris déficiente Bbf2h7<sup>-/-</sup> était nécessaire pour déterminer le rôle physiologique de la protéine BBF2H7 et déterminer aussi ses gènes cibles. Cette souris naît avec le ratio mendélien attendu mais présente des anomalies sévères qui provoquent sa mort par suffocation rapidement après la naissance en raison du développement incomplet de la cavité thoracique (Saito, Hino et al. 2009). De plus, la souris présente un phénotype anormal : des membres courts, une langue protubérante et un ventre gonflé. L'analyse du squelette montre une hypoplasie des os craniofaciaux et une réduction du niveau des protéines de la matrice extracellulaire du cartilage au niveau des membres et des côtes. Malgré que les os longs fussent plus courts que ceux de la souris de type sauvage, leur structure demeurerait intacte. Au niveau microscopique, l'analyse du RE rugueux de la souris déficiente en BBF2H7 montre une expansion anormale avec une accumulation de protéines au niveau de la lumière. Ainsi, c'est la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire qui est bloquée et non leur synthèse, ce qui empêche sans doute la formation du cartilage (Saito, Hino et al. 2009).

#### 4.vi.v *Sec23a est un gène cible de BBF2H7*

Pour identifier les gènes cibles de BBF2H7, une expérience de micropuces à ADN a été réalisée. Pour ce faire, l'ARN extrait de chondrocytes primaires préparés à partir de cartilage des côtes de la souris déficiente en BBF2H7 au stade embryonnaire E18.5 a été

utilisé. Les résultats obtenus montrent que plusieurs gènes impliqués dans les voies de sécrétion des protéines et de la biogenèse du RE ont été affectés, parmi eux le gène codant la protéine Sec23a. Il s'agit d'un élément important de la vésicule COPII responsable du transport antérograde des protéines à partir du RE vers l'appareil de golgi (Barlowe 2002). Il a été observé que le niveau de l'ARN de Sec23a diminuait de 80% par rapport à la souris de type sauvage. En revanche, la réintroduction de BBF2H7 au niveau des chondrocytes provenant de la souris *Bbf2h7<sup>-/-</sup>* induit davantage l'expression de Sec23a. Néanmoins, ce même effet n'a pas été observé suite à la surexpression de la forme active d'OASIS ce qui indique que la régulation de Sec23a est spécifique à BBF2H7. De plus, l'introduction de BBF2H7-376 aa ou de Sec 23a au niveau des chondrocytes en culture provoque la sécrétion des protéines accumulées au niveau du RE dans le milieu extracellulaire comparativement aux chondrocytes de type sauvage. La protéine Sec31, autre composant du complexe COPII, présente une localisation diffuse au niveau des chondrocytes de souris *Bbf2h7<sup>-/-</sup>* alors qu'elle se trouve au niveau de la région entourant le RE des chondrocytes de type sauvage. Cette mauvaise localisation est corrigée par la surexpression de la forme active de BBF2H7. De plus, le RE rugueux provenant des chondrocytes de la souris déficiente présente une structure désordonnée des piles parallèles des grandes citernes aplaties ce qui peut être rétabli par réintroduction de la forme active de BBF2H7. Toutes ces informations nous indiquent que le facteur de transcription BBF2H7 est impliqué dans la biogenèse du RE ainsi que dans le transport des protéines de sécrétion vers l'appareil de golgi via la voie Sec23a au niveau des chondrocytes. L'analyse du promoteur du gène codant la protéine Sec23a montre la présence d'un site de liaison à l'ADN de type CRE. Des essais luciférase, de retard sur gel et de ChIP montrent que la protéine active de BBF2H7 lie *in vitro* et *in vivo* cet élément de réponse et active, par le fait même, la transcription de son gène cible: Sec23a. En conclusion, durant la différenciation des chondrocytes, on observe un stress du RE dû à une forte demande en protéines de la matrice du cartilage. Ce stress active le clivage de BBF2H7 qui va à son tour activer l'expression de la protéine Sec23a. La sécrétion de ces protéines se fait via la voie BBF2H7-Sec23a qui permet l'accélération du transport des protéines vers l'appareil de golgi (Saito, Hino et al. 2009). Une étude réalisée en 2009 par Tanegashima et collaborateurs montre que la protéine BBF2H7 est impliquée dans le même processus au niveau de la notochorde, une structure cartilagineuse rigide

dorsale qui s'allonge sur la longueur du corps comme un axe pour l'attachement des muscles. Elle constitue une des caractéristiques des chordés. Il a été démontré que les deux gènes codant Creb3l2 et Xbp1 sont préférentiellement exprimés au niveau de la notochorde. Des expériences de surexpression ou d'élimination ont montré que ces protéines sont nécessaires au développement de la notochorde durant l'embryogenèse et ce en régulant les gènes impliqués dans la voie de sécrétion des protéines (Tanegashima, Zhao et al. 2009).

*4.vi.vi BBF2H7 régule l'expression du facteur ATF5, un autre membre de la famille ATF/CREB*

D'autre part, BBF2H7 a été identifié parmi les gènes qui régulent l'expression du facteur de transcription ATF5/ATFx. Il s'agit d'un facteur anti-apoptotique de la famille ATF/CREB qui favorise la survie de plusieurs types cellulaires (Sheng, Li et al.). ATF5 est surexprimée au niveau des tumeurs primaires de cerveau et particulièrement au niveau des formes agressives malignes de blastomes: les glioblastomes. Fait intéressant, inhiber la fonction d'ATF5 provoque la mort des cellules de la tumeur primaire sans affecter les cellules saines, ce qui rend ATF5 (et toute la voie de signalisation en amont et en aval) très attrayant comme cible thérapeutique au niveau du gliome malin (Sheng, Evans et al.). La confirmation de ce résultat par ARN d'interférence contre BBF2H7 montre que son élimination provoquait la diminution de l'expression d'ATF5. Cette régulation d'ATF5 par BBF2H7 se fait de façon directe puisque l'analyse du promoteur d'ATF5 montre la présence d'un site de liaison à l'ADN : CRE et des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré par conséquent que BBF2H7 lie in vivo le promoteur d'ATF5 et active son expression (Sheng, Li et al.).

*4.vi.vii Identification de la protéine de fusion BBF2H7-PPAR $\gamma$*

Au niveau du cancer de la thyroïde, une protéine de fusion CREB3L2-PPAR $\gamma$  a été identifiée pour la première fois en 2008 par l'équipe du Dr Kroll. PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor) est une protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires liant les lipides et régulant la transcription de plusieurs gènes impliqués dans plusieurs processus physiologiques comme l'adipogenèse, l'inflammation, le métabolisme et l'obésité. La protéine de fusion CREB3L2-PPAR $\gamma$  est composée du domaine de transactivation de BBF2H7 en fusion avec tous les domaines fonctionnels de PPAR $\gamma$ . La



protéine CREB3L2-PPAR $\gamma$  se localise au niveau du noyau, elle est réfractaire aux antagonistes du récepteur PPAR $\gamma$  et présente une expression plus importante au niveau des carcinomes comparativement à l'expression du récepteur seul. De plus, la surexpression de cette protéine de fusion augmente la prolifération des cellules primaires de la thyroïde de 42 à 45% contrairement à la protéine native PPAR $\gamma$  qui ne présente aucun effet. L'ARNm de BBF2H7 est présent au niveau des cellules saines de la thyroïde. De plus le traitement de ces cellules avec la Brefeldin A provoque le clivage de la protéine BBF2H7 transfectée ce qui suggère que la protéine BBF2H7 est activée par le mécanisme RIP au niveau des cellules de la thyroïde (Lui, Zeng et al. 2008). Malheureusement, le traitement de ces cellules par la thapsigargine ou la tunicamycine ne provoque pas le clivage de BBF2H7 tel qu'observé dans d'autres lignées cellulaires, ce qui indique que d'autres stimuli sont impliqués dans l'activation de BBF2H7 au niveau des cellules de la thyroïde. Par contre, l'ARNm de BBF2H7 est induit 2 fois suite au traitement des cellules saines par la TSH (hormone thyroïdienne) ce qui impliquerait BBF2H7 dans la voie de signalisation de la TSH. Par ailleurs, des essais luciférase montrent que, contrairement à BBF2H7 native qui régule positivement le gène rapporteur de la luciférase via l'élément de réponse CRE, la protéine de fusion CREB3L2- PPAR $\gamma$  inhibe la transcription de ces gènes au niveau du cancer de la thyroïde (Lui, Zeng et al. 2008). Donc, cette fusion interfère avec l'expression des gènes dépendants de l'élément de réponse CRE au niveau de leurs promoteurs. D'ailleurs, l'expression de gènes sensibles à l'AMPc de la thyroglobuline ou de la thyroperoxydase, est plus faible au niveau de carcinomes folliculaires de la thyroïde présentant la protéine de fusion CREB3L2-PPAR $\gamma$  comparativement à 95% des autres carcinomes folliculaires de la thyroïde (Lui, Zeng et al. 2008).

#### 4.vii CREBH :

Le gène codant la protéine CREBH (CREB3L3) a été découvert par Omori et ses collaborateurs en 2001 et ce en séquençant au hasard des clones provenant d'une banque d'ADNc construite à partir d'une lignée cellulaire cancéreuse du foie chez l'humain (HepG2) (Omori, Imai et al. 2001). L'intérêt de cette manipulation était d'identifier des gènes exclusivement exprimés au niveau du foie. Par la suite, des expériences de RT-PCR et de buvardage de type Northern ont confirmé que ce nouveau gène est exclusivement exprimé au foie par comparaison avec d'autres tissus comme le pancréas, les poumons, les testicules, les ovaires, etc., d'où le nom CREBH (CRE-binding and hepatocyte-specific factor) (Omori, Imai et al. 2001). Ce gène, chez l'humain, est situé au niveau du chromosome 19p13.3, il est constitué de 10 exons et code pour une protéine de 463 acides aminés. L'analyse de la séquence en acides aminés de la protéine CREBH montre la présence d'un domaine bZIP qui présente 84% et 69% de similarités avec le domaine bZIP des protéines CREB3 et OASIS, respectivement (Omori, Imai et al. 2001). De plus, une certaine homologie avec les protéines préalablement citées est observée au niveau des régions se trouvant de part et d'autre du domaine bZIP, d'où l'appartenance de CREBH à la sous-famille de CREB3 (Omori, Imai et al. 2001). Dans l'article de Qi et collaborateurs publié en 2002 sur A1bZIP (CREB3L4), il a été montré que CREBH présente une forte homologie avec A1bZIP. En effet, 81% des acides aminés qui constituent le domaine basique ainsi que les 5 acides aminés du *spacer* sont identiques entre A1bZIP et CREBH. De plus, la glissière de leucines d'A1bZIP est très semblable à celle de CREBH avec 22 des 36 acides aminés entre la première et la dernière leucine qui y sont conservées (Qi, Fillion et al. 2002).

##### 4.vii.i *Caractérisation du facteur de transcription CREBH*

La protéine CREBH présente la structure générale des membres de la sous-famille de CREB3. On dénombre un domaine NH2 terminal qui est composé du domaine d'activation de la transcription et du domaine bZIP et un domaine COOH terminal comprenant un domaine transmembranaire et modulant l'activité du domaine N-terminal. Néanmoins, cette protéine présente des différences structurales qui lui sont propres. Au niveau du domaine C-terminal, on trouve un deuxième motif qui s'apparente à la glissière de leucines

subséquente au domaine bZIP. De plus, il y a présence d'une séquence GDEL qui ressemble à la séquence connue KDEL servant à retenir les protéines au niveau du RE ou à les faire rétrograder par l'appareil de golgi. Ces deux motifs ont été investigués dans d'autres études pour déterminer le rôle qu'ils jouent dans la fonction de la protéine. La localisation subcellulaire de la protéine CREBH a ensuite été déterminée par fluorescence en utilisant la protéine GFP (green fluorescent protein) en fusion avec CREBH pleine longueur ou avec un mutant sans domaine transmembranaire (CREBH-delTM) et les différentes constructions ont été transfectées dans les cellules immortalisées du rein COS7. La protéine recombinante GFP-CREBH pleine longueur produit une fluorescence au niveau de la région du réticulum endoplasmique autour du noyau alors que le signal émis par la protéine recombinante GFP-CREBH-delTM coïncide avec la coloration du noyau par la molécule fluorescente 4',6'-diamidino-2-phénylindole ou DAPI (Omori, Imai et al. 2001).

Étant un facteur de transcription de la famille ATF/CREB, il était tout à fait logique d'étudier la liaison de cette protéine à l'élément de réponse CRE (cAMP response element). De plus, d'autres éléments de réponses préalablement identifiés ont été testés comme, par exemple, l'élément box-B retrouvé au niveau du promoteur de gènes dont l'expression est spécifique au foie. Pour ce faire, une expérience de retard sur gel a été effectuée et a montré la liaison du facteur de transcription CREBH à ces deux éléments de réponse (Omori, Imai et al. 2001).

#### 4.vii.ii *Homologues de CREBH chez C. elegans et chez la souris*

En 2005, deux articles sur les homologues de CREBH chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Shen, Ellis et al. 2005) et chez la souris (Chin, Zhou et al. 2005) ont été publiés par l'équipe de Kaufman et l'équipe de Jin, respectivement. Le premier article tentait d'identifier les fonctions cellulaires de chaque voie de signalisation de la réponse au stress UPR afin d'élucider la coordination de ces voies pendant cette réponse et ainsi déterminer les gènes régulés par ces dernières (Shen, Ellis et al. 2005). Les gènes régulés sont divisés en deux groupes : des gènes dont l'expression est induite par la réponse au stress suite à la perturbation de l'homéostasie du RE et d'autres dont l'expression est constitutive et qui a lieu durant le développement. CREBH est cependant identifié parmi les gènes induits. Son niveau d'expression est augmenté suite à un traitement des vers au stade N2 (Shen, Ellis et

al. 2005) par la tunicamycine et cette expression est dépendante de *ire1*, *xbp1* et *atf6*. Le deuxième article sera développé dans le paragraphe suivant.

#### 4.vii.iii *Caractérisation de la forme murine de CREBH*

En parallèle l'équipe de Jin a publié une caractérisation complète de l'homologue murin de CREBH et a démontré à son tour que la surexpression de la protéine au niveau de la lignée cellulaire de carcinome hépatique Hepal-6 provoque un clivage automatique de cette dernière. La forme obtenue migre au même niveau que le délétant sans domaine C-terminal, ce qui indique que CREBH pourrait également être clivée en sa forme active comme les autres membres de la sous-famille de CREB3 par le mécanisme RIP. Ceci a été confirmé par la suite par des expériences avec la brefeldin A. La forme libérée est capable de lier *in vitro* les éléments de réponse CRE, boxB (Omori, Imai et al. 2001) et aussi les éléments de réponse ATF6 et d'activer la transcription du gène de la luciférase via ces éléments (Chin, Zhou et al. 2005). De plus, la protéine murine CREBH clivée lie l'élément de réponse CRE au niveau du promoteur du gène codant l'enzyme de la gluconéogenèse PEPCK *in vitro* et *in vivo* et active ainsi sa transcription (Chin, Zhou et al. 2005). Sachant que ce même gène est activé par la voie de signalisation de l'AMP cyclique (AMPC) et la phosphokinase A (PKA), l'équipe de Jin avance que possiblement la protéine CREBH est phosphorylée par la voie AMPC/PKA ce qui provoque son clivage et activerait l'expression du gène codant l'enzyme PEPCK. Néanmoins, les sites potentiels pour la phosphorylation n'ont pu être déterminés (Chin, Zhou et al. 2005). L'autre constatation intéressante concerne le niveau d'expression de la protéine CREBH. En effet, CREBH est fortement exprimée au niveau des cellules normales du foie adulte mais très faible au niveau des lignées et des cellules cancéreuses. Or, la surexpression de la protéine CREBH pleine longueur ou tronquée inhibe la prolifération des cellules HepG2 en arrêtant le cycle cellulaire en phase S (Chin, Zhou et al. 2005). Ceci suggère que la diminution du niveau d'expression de CREBH au niveau des cellules cancéreuses pourrait contribuer au déclenchement ou à la progression du cancer.

#### 4.vii.iv *CREBH est régulée par le mécanisme RIP*

Dans l'objectif d'identifier les conditions physiologiques provoquant le clivage de CREBH, Zhang et collaborateurs ont montré, en 2006, que la forme murine de CREBH apparaît à partir du stade embryonnaire E12 (Zhang, Shen et al. 2006) et qu'elle s'intensifie pendant l'âge adulte (Luebke-Wheeler, Zhang et al. 2008). De plus, le traitement des cellules cancéreuses de souris H2.35 par l'interleukine IL6 ou IL1 $\beta$  ou le facteur de nécrose tumorale TNF $\alpha$  augmente le niveau de l'ARNm de CREBH. Le même effet est observé suite au traitement des cellules par les agents de stress (thapsigargin, DTT et BA, mais pas la tunicamycine). Cependant, seuls les agents de stress, y compris la tunicamycine, induisent le clivage de CREBH transfectée (Zhang, Shen et al. 2006). Ces résultats ont été sujet de controverse en 2007 par l'équipe du Dr O'Hare et cette différence dans les observations pourrait être expliquée par les divers types cellulaires utilisés (Bailey, Barreca et al. 2007). En fait, contrairement à ce qui est exposé précédemment, l'équipe du Dr O'Hare observe le clivage de la protéine CREBH transfectée suite à des traitements avec les cytokines proinflammatoires (IL-6 et IL- $\beta$ ). De plus, le traitement avec la tunicamycine n'a pas d'effet sur le clivage de la protéine pleine longueur mais l'inhibition de la glycosylation par cette drogue provoque la déglycosylation de la protéine CREBH. D'ailleurs, des expériences avec l'endoglycosidase H et le PNGaseF ont démontré que CREBH est une glycoprotéine. Toutefois, cette glycosylation semble être importante pour le rôle de facteur de transcription de la protéine CREBH. En effet, les protéines déglycosylées ou non glycosylées sont plus stables mais ne sont pas clivées suite au traitement par la brefeldin A et activent très faiblement la transcription de la luciférase (Chan, Mak et al. 2010). L'autre particularité de CREBH est que le traitement des cellules COS1 avec l'inhibiteur du protéasome MG132 provoquait le clivage de CREBH transfectée (Bailey, Barreca et al. 2007). Ceci confirme que CREBH présente une demi-vie très courte et qu'elle est prise en charge par le mécanisme ERAD et qu'un stress à ce niveau pourrait provoquer son clivage. Dans la continuité de la caractérisation de la protéine murine CREBH, des essais luciférase ont démontré par la suite que c'est aussi via l'élément de réponse UPRE que la protéine CREBH clivée active l'expression de ses gènes cibles (l'élément ERSE ne répond pas à CREBH).

#### 4.vii.v *Gènes cibles de CREBH*

Toujours dans le but de déterminer le rôle physiologique de CREBH chez la souris, un ARN d'interférence a été utilisé pour éliminer l'ARNm de CREBH au niveau du foie. L'ARN total provenant d'échantillons de foie de souris au stade E14.5, stade où l'expression de CREBH est forte, a été utilisé pour réaliser des micropuces afin d'identifier les gènes cibles de CREBH. Suite à l'inactivation du gène codant CREBH, l'expression des gènes codant la protéine C-réactive (CRP) et la protéine amyloïde sérique (SAP) a diminué significativement comparativement aux niveaux contrôles (Zhang, Shen et al. 2006); (Luebke-Wheeler, Zhang et al. 2008). Or, ces deux protéines sont induites suite à une inflammation ou infection bactérienne ou virale durant la réaction de phase aigüe (APR) ce qui nous amène à penser que la protéine CREBH pourrait être nécessaire à l'activation de cette phase. Pour vérifier cette hypothèse, l'équipe de Kaufman a testé l'effet de la stimulation de IL6, IL1 $\beta$ , LPS (lipopolysaccharide) et aussi l'agent de stress tunicamycine sur la souris qui n'exprime pas CREBH au niveau du foie. Aucune augmentation de l'expression des protéines CRP et SAP suite à ces traitements comparativement à la souris contrôle n'a été observée ce qui suggère que CREBH est nécessaire pour induire l'expression de ces gènes en réponse au stress du RE ou suite à une stimulation par les cytokines pro-inflammatoires (Zhang, Shen et al. 2006). De plus, la forme nucléaire de CREBH induite suite au stress du RE, de concert avec la forme nucléaire d'ATF6, lie des éléments de réponse au niveau du promoteur de gènes impliqués dans la réponse à l'inflammation. En résumé, la protéine CREBH est régulée par le stress du RE ou/et les infections bactériennes ou virales entraînant une inflammation, ce qui provoque son clivage protéolytique au niveau de l'appareil de golgi. La forme active libérée migre vers le noyau où elle va lier, en synergie avec la protéine ATF6 activée par le stress du RE, les séquences consensus de certains gènes impliqués dans la réponse à l'inflammation.

#### 4.vii.vi *Le facteur HNF4 $\alpha$ régule l'expression de CREBH*

En analysant la séquence du promoteur de CREB3L3, l'équipe de Duncan a identifié un site de liaison potentiel pour le facteur HNF4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor alpha) à 3.7 kilobases en amont de l'exon 1 du gène codant la protéine CREBH (Luebke-Wheeler, Zhang et al. 2008). HNF4 $\alpha$  est un facteur de transcription nucléaire essentiel à l'initiation et

au maintien de la différenciation des hépatocytes ainsi que la fonction du foie (Li, Ning et al. 2000). En effet, la protéine HNF4 $\alpha$  régule la transcription de CREBH *in vitro* et *in vivo* via l'élément identifié. Donc CREB3L3 est un gène cible de HNF4 $\alpha$  et son expression est strictement dépendante de ce facteur au niveau du foie. De fait, la protéine HNF4 $\alpha$  est impliquée dans le contrôle indirect de l'APR au niveau du foie via la régulation de l'expression de CREBH. Jusque là, le lien entre le stress du RE et l'inflammation n'est pas très clair mais des études publiées en 2009 ont montré que l'hepcidine, une hormone sécrétée par le foie et impliquée dans le contrôle de l'homéostasie du fer, est induite par le stress du RE (Vecchi, Montosi et al. 2009). En effet, le traitement des cellules HepG2 par l'ionophore A23187 ou la tunicamycine augmente le niveau de l'ARNm de l'hepcidine. Cependant, le lipopolysaccharide et l'interleukine IL-6 sont aussi deux régulateurs puissants connus de l'expression de l'hepcidine dans le foie. Enfin, la protéine CREBH lie la région en 5' du promoteur de l'hepcidine appelée HAMP et active sa transcription (Vecchi, Montosi et al. 2009). D'ailleurs, tous les stimuli extérieurs (administration de toxines, accumulation de protéines mal-repliées) n'ont plus d'effet positif sur l'expression de l'hepcidine au niveau de la souris déficiente CREBH<sup>-/-</sup> comparativement à la souris contrôle. De plus, cette régulation est directe et peut nécessiter la présence d'autres facteurs de transcription comme, par exemple, la protéine XBP1 (X-box binding protein 1), un autre facteur de transcription bZIP (Vecchi, Montosi et al. 2009). Ces travaux suggèrent que la régulation de cette hormone serait le lien entre la réponse au stress du RE et l'immunité innée et l'homéostasie du fer (Vecchi, Montosi et al. 2009).

#### 4.vii.vii *L'expression de la protéine CREBH est régulée par les nutriments*

En 2009, l'équipe de Shimano montre que le niveau d'ARNm de CREBH est augmenté durant le jeûne et qu'il est complètement supprimé par l'administration de nutriments riches en sucrose (Danno, Ishii et al. 2009). Or, l'effet des acides gras est observé directement suite à leur liaison spécifique aux récepteurs nucléaires comme, par exemple, PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) et HNF4 $\alpha$ , ce qui provoque un changement dans leur activité transcriptionnelle. Le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  forme un hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) qui va lier l'élément de réponse PPRE (*peroxisome proliferator responsive element*) (Danno, Ishii et al. 2009). En examinant le promoteur du gène Creb3l3 chez la souris, des sites potentiels PPRE sont

observés. D'ailleurs, l'élément de réponse le plus proximal est crucial pour l'activation de la transcription de CREBH (Danno, Ishii et al. 2009).



## 5. AIBZIP

### 5.i Prostate et cancer de la prostate

La prostate est une glande annexe du système reproducteur mâle. Elle est située sous la vessie et est traversée par l'urètre. La prostate est composée de tissu musculaire et de tissu glandulaire et elle sert à stocker et à sécréter le liquide séminal. On parle ici d'un organe régulé par les androgènes via le récepteur des androgènes (RA). Le développement de cette glande à partir du sinus urogénital, sa croissance ainsi que sa maintenance pendant l'âge adulte dépendent de l'action des androgènes (Jenster 1999). En se penchant de plus près sur le rôle du RA dans le développement de la prostate, il a été démontré que le profil d'expression du RA diffère entre les premiers et les derniers stades du développement de cette glande (Jenster 1999). On observe d'abord une expression du RA au niveau du mésenchyme du sinus urogénital puis cette expression s'étend jusqu'à l'épithélium. Cette expression contribue alors à la différenciation de ce dernier et à la production de protéines, par les cellules épithéliales de la lumière, qui seront sécrétées au niveau du liquide séminal (Jenster 1999). Les androgènes régulent plusieurs processus incluant la croissance, la survie, la différenciation et l'apoptose via le récepteur des androgènes. Le gène codant le récepteur des androgènes est localisé au niveau du chromosome X. Le RA est un récepteur stéroïdien appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ce facteur de transcription est composé de trois domaines fonctionnels: un domaine N-terminal au niveau duquel se trouve le domaine d'activation de la transcription et un domaine de liaison à l'ADN séparé du domaine de liaison du ligand C-terminal par une région charnière. Le récepteur des androgènes se trouve sous sa forme inactive lié à la chaperonne Hsp90 (Burd, Morey et al. 2006). Suite à sa liaison avec la DHT (dihydrotestostérone), produit de la conversion de la testostérone par l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase, il y a alors un changement de conformation, le récepteur se dimérise et module alors l'expression de ses gènes cibles directement via les éléments de réponse ARE (androgen response elements) et ce en recrutant divers cofacteurs (coactivateurs et corépresseurs) ou, indirectement, en activant diverses voies de signalisation (Qi, Fillion et al. 2002). La testostérone est une hormone stéroïdienne produite et sécrétée au niveau des testicules par les cellules de Leydig. À part

les testicules, les surrénales sécrètent des quantités importantes de dehydroepiandrosterone (DHEA) et son sulfate DHEAS qui sont des précurseurs stéroïdiens inactifs. Les deux peuvent être convertis en testostérone dans la plupart des tissus périphériques incluant, la prostate, par transformation intracrine (Levesque, El-Alfy et al. 2007).

Comme dans le cas du développement de la prostate normale, les cancers prostatiques sont largement dépendants des androgènes qui assurent la croissance et la survie des cellules tout en les dirigeant vers un phénotype plus différencié.

Le cancer de la prostate est le cancer le plus diagnostiqué chez l'homme. Il est associé au vieillissement (à partir de 50 ans) et seulement 10% des cas peuvent être expliqués par des causes génétiques. Le cancer de la prostate est un cancer qui touche de manière plus significative les hommes du monde occidental (Canada, États-Unis, nord de l'Europe et l'Australie). Par contre, ce cancer affecte beaucoup moins les pays de l'Asie, de l'Afrique du nord et du Moyen-Orient. Les causes réelles de cette répartition géographique de la maladie ne sont pas encore bien expliquées, mais l'alimentation et le mode de vie différents entre ces diverses populations peuvent être pointés du doigt. D'ailleurs, certaines études ont démontré que les individus d'origine asiatiques vivant dans les pays occidentaux suite à l'immigration présentent le même risque de développer un cancer que les populations d'origine ou « souches ». De plus, les hommes d'origine afro-américaine présentent un taux très élevé de cancer de la prostate et peuvent développer la maladie avant 50 ans. Ce risque élevé observé chez les afro-américains pourrait être expliqué par une forte activité du récepteur des androgènes pendant de longues périodes. De plus, le domaine N-terminal du RA contient plusieurs répétitions de 8 à 39 glutamines. Il a été démontré qu'une courte répétition de glutamines est associée à une activité plus importante du récepteur des androgènes et un haut risque de développer le cancer de la prostate (Jenster 1999). La corrélation entre la longueur de la répétition et le risque de développer la maladie pourrait expliquer le risque élevé observé chez les afro-américains car les analyses des répétitions de glutamines chez ce groupe de personnes montrent que ces répétitions sont généralement plus courtes comparativement aux autres populations (Agoulnik and Weigel 2006).

Au niveau de la prostate, les androgènes, de concert, avec les autres facteurs exprimés créent et maintiennent un équilibre entre les divers processus comme la croissance, la survie, la différenciation et l'apoptose (Jenster 1999). Au niveau d'hyperplasie prostatique ou d'un cancer de la prostate cet équilibre est débalancé créant ainsi un environnement de croissance incontrôlée. Le cancer de la prostate est classé comme un adénocarcinome. D'abord, des petits blocs de cellules cancéreuses restent confinés au niveau du tissu glandulaire de la prostate, ce qu'on appelle carcinome ou néoplasie prostatique intraépithéliale. Ensuite, ces cellules se multiplient et diffusent vers les tissus périphériques supérieurs, formant ainsi une tumeur. La tumeur peut cependant grossir et envahir d'autres organes adjacents comme, par exemple, le rectum et la vessie. Elle peut aussi perdre son adhérence, se déplacer dans l'organe vers les vaisseaux et circuler à travers le système circulatoire ou lymphatique et on parle dans ce cas de métastases. Les différents stades du cancer sont classés selon deux échelles : la classification TNM (T : tumeur primitive, N : atteinte des ganglions lymphatiques voisins et M : métastases) établie par l'organisation de la santé mondiale et le score Gleason qui détermine le stade de différenciation des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines.

Il est clair que les cancers prostatiques sont largement dépendants des androgènes pour leur croissance et leur survie pendant les premiers stades du développement. Grâce à la première observation faite par Charles Huggins en 1941 montrant que les œstrogènes et la castration avaient un effet bénéfique sur le cancer de la prostate, les traitements développés dans ce sens étaient alors l'hormonothérapie et l'ablation des androgènes. Ces traitements s'avéraient bénéfiques pendant les deux premières années du traitement. En revanche, la réponse à ces thérapies diminuait par la suite parce que les cellules cancéreuses devenaient réfractaires aux androgènes pour pouvoir s'adapter à leur nouvel environnement. Pour ce faire, la cellule maligne développe des mécanismes différents afin d'augmenter la sensibilité de la voie du récepteur des androgènes (mutation au niveau de la séquence codante du RA, amplification du gène codant le RA). Ces mécanismes sont fréquents et contribuent à la progression du cancer de la prostate (Qi, Fillion et al. 2002). Ainsi, la substitution de l'alanine en position 877 pour une thréonine, rapportée au niveau des cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP et décrite aussi chez certains patients atteints de cancer de la prostate, provoque une incapacité du récepteur des androgènes de

lier les corépresseurs. Résultant alors en un recrutement permanent de coactivateurs et une activation de la transcription. On observe aussi une amplification du RA qui va compenser la quantité restreinte d'androgènes, une activation du récepteur indépendante du ligand associée à une surexpression des coactivateurs et une inhibition des corépresseurs (Jenster 1999).

### **5.ii Gènes régulés par les androgènes**

Les androgènes et le récepteur des androgènes sont impliqués dans le développement de la prostate et du cancer de la prostate en régulant directement et indirectement des gènes cibles (Trapman and Cleutjens 1997). L'identification de cette panoplie de gènes peut, d'une part, nous aider à comprendre le mécanisme d'action des androgènes et, d'autre part, à établir toute la cascade de signalisation (Qi, Fillion et al. 2002). De plus, le traitement du cancer de la prostate repose généralement sur des thérapies qui tentent de diminuer la concentration des androgènes ou de bloquer l'activité du récepteur en utilisant des antagonistes qui vont occuper son domaine de liaison au ligand. Or, il n'y a pas de thérapies qui ciblent les voies en aval. C'est dans ce cadre que l'identification des gènes régulés par les androgènes permettra d'élaborer des approches thérapeutiques qui cibleraient ces voies (Labrie, Lessard et al. 2008). Un des gènes les plus étudiés est l'antigène spécifique de la prostate (APS ou PSA). Le PSA, une glycoprotéine membre de la famille des sérines-protéases, est exprimée exclusivement au niveau la prostate. Il a été montré que le facteur de transcription PDEF (prostate derived ets transcription factor) interagit avec le récepteur des androgènes et induit l'expression du PSA via les éléments de réponse situés au niveau de la région promotrice du gène. Bien que le PSA soit spécifique à la prostate mais pas au cancer de la prostate, la mesure de sa concentration est devenue un outil important dans le diagnostic du cancer de la prostate et de l'hyperplasie prostatique bénigne (Perry, Grossmann et al. 1996). En récapitulatif, l'identification des gènes cibles des androgènes nous permettra de décortiquer leur mécanisme d'action, d'élaborer des thérapies bloquant leurs voies de signalisation en aval et de mettre la main sur des marqueurs spécifiques et sensibles au stade de la maladie.

### **5.iii AIBZIP**

#### **5.iii.i Introduction**

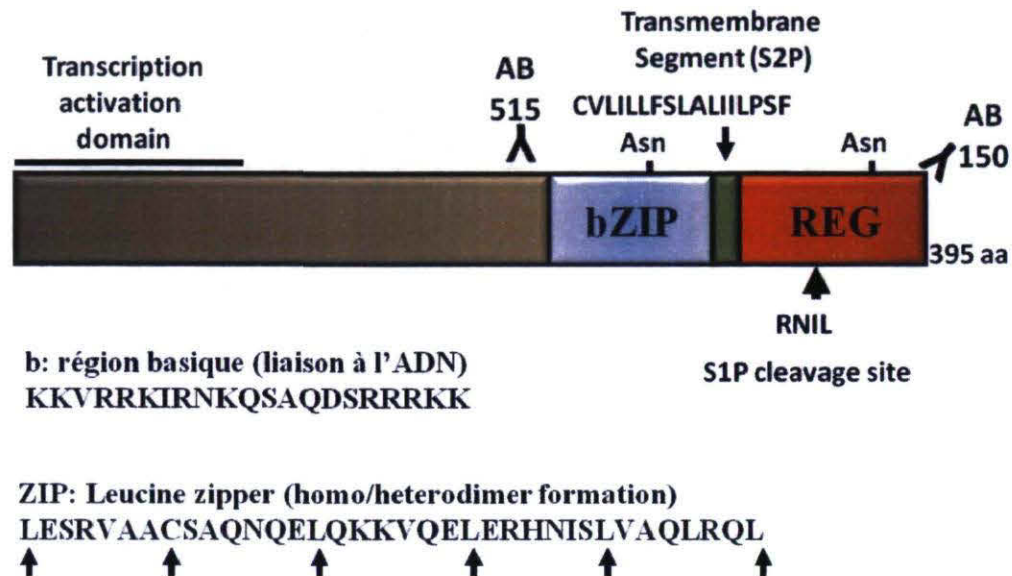
Le laboratoire du Dr Claude Labrie s'intéressait beaucoup aux gènes régulés par les androgènes au niveau des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Au début des années 2000, un nouveau gène a été identifié parmi une panoplie de gènes régulés par les androgènes en utilisant la technique d'hybridation soustractive qui permet de comparer les niveaux d'expression d'ADN complémentaire issus de deux populations de cellules. Dans le cadre de cette expérience, des cellules LNCaP qui sont des cellules prostatiques cancéreuses humaines ont été utilisées. Il s'agissait alors de comparer deux conditions : des cellules contrôle versus des cellules traitées avec l'androgène synthétique R1881 (Qi, Fillion et al. 2002).

#### **5.iii.ii Structure**

Androgen-Induced bZIP est un facteur de transcription appartenant à la famille ATF/CREB. Le gène se situe au niveau du chromosome 1q21 et code pour une protéine de 395 acides aminés. Cette protéine est composée de 2 domaines fonctionnels distincts. Le premier est un domaine NH<sub>2</sub> terminal qui correspond aux premiers 290 acides aminés. Il comprend un sous-domaine d'activation de la transcription et un sous-domaine bZIP. Grâce à des expériences d'essai luciférase en utilisant des délétants d'AIBZIP, le sous-domaine d'activation de la transcription a été identifié. Il est situé au niveau des cent premiers acides aminés et il est nécessaire et suffisant pour activer l'expression de gènes cibles. Le sous-domaine bZIP est un domaine central compris entre les résidus 222 et 280. Le bZIP est composé d'une région basique nécessaire à la liaison du facteur de transcription à l'ADN via les séquences consensus et d'une glissière de leucine adjacente essentielle à la formation d'homo ou hétérodimères. De plus, on observe au niveau de ce sous-domaine deux signaux de localisation nucléaire.

Le deuxième domaine est le domaine COOH terminal, qui correspond également au domaine régulateur d'AIBZIP au niveau duquel se situe le sous-domaine transmembranaire,

une séquence consensus (Asn-Gly-Ser) pour la glycosylation (366-368aa) et un site de clivage pour la protéase S1P (figure 1-5-1).



**Figure 1-5-1 :** Représentation schématique de la protéine A1bZIP. Le facteur de transcription A1bZIP est composé de deux domaines fonctionnels. Au niveau du domaine NH2-terminal, il y a un sous-domaine d'activation de la transcription situé au niveau des 100 premiers acides aminés et un sous-domaine bZIP. Le domaine bZIP est composé d'une région basique permettant la liaison du facteur avec l'ADN et d'une glissière de leucine nécessaire pour la formation des dimères. Le deuxième domaine est le domaine COOH d'A1bZIP au niveau duquel se trouve un sous-domaine transmembranaire permettant l'ancrage d'A1bZIP dans la membrane du RE, il s'agit du domaine régulateur. Au niveau de ce domaine se trouvent les sites consensus pour les protéases S1P et S2P. (Adaptée de «*A1bZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells*» *Cancer Res*, 2002.)

Afin de déterminer la localisation subcellulaire de la protéine A1bZIP, des expériences de fluorescence ont été réalisées. Ces analyses ont permis de montrer que la protéine pleine longueur ou la protéine correspondant uniquement au domaine NH2-terminal fusionnées à la protéine EGFP (Enhanced green fluorescent protein) sont cytoplasmique et nucléaire, respectivement (Qi, Fillion et al. 2002) (figure 1-5-2). De plus, des expériences d'immunofluorescence indirecte en utilisant un anticorps primaire dirigé contre la protéine pleine longueur montrent que la protéine A1bZIP pleine longueur colocalise parfaitement

avec la chaperonne BiP, protéine résidente du RE. Comme les autres membres de la sous-famille de CREB3, AIBZIP pleine longueur est liée à la membrane du RE par l'intermédiaire de son domaine transmembranaire. De plus, grâce à des expériences de digestion à la trypsine en présence ou en absence de détergent réalisées dans le laboratoire de Nojima en 2005 sur la forme murine d'AIBZIP Tisp40 (Nagamori, Yabuta et al. 2005), il a été démontré que cette dernière est une protéine transmembranaire de type II. En effet, ces expériences montrent que la portion C-terminale est digérée par la trypsine seulement en présence du détergent alors que la portion N-terminale est digérée en présence ou en absence du détergent. Ceci signifie que la portion NH<sub>2</sub> terminale est dans le cytoplasme alors que le domaine COOH terminal est projeté dans la lumière du RE. Donc comparativement à Tisp40, AIBZIP est une protéine liée à la membrane du RE de type II (Nagamori, Yabuta et al. 2005).

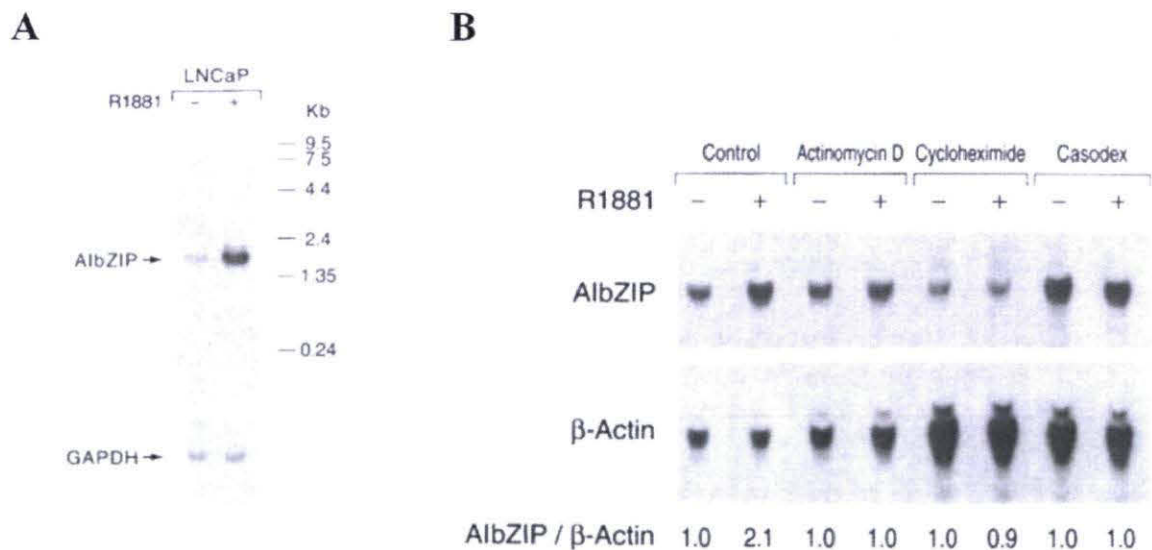


**Figure 1-5-2 :** Localisation subcellulaire de la protéine AIBZIP. L'ADNc codant la protéine pleine longueur ou le domaine NH<sub>2</sub>-terminal ont été séparément sous-clonés en fusion en C-terminal avec l'EGFP. La protéine pleine longueur d'AIBZIP est localisée au niveau du cytoplasme alors la protéine tronquée se trouve au noyau. La protéine EGFP est diffuse dans toute la cellule. (Adaptée de «*AIBZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells*» *Cancer Res*, 2002).

### 5.iii.iii AIBZIP est régulé par les androgènes

AIBZIP a été identifié comme un gène régulé par les androgènes d'où l'appellation androgen-induced bZIP. Afin de caractériser de plus près la régulation d'AIBZIP par les androgènes plusieurs approches expérimentales ont été utilisées. Tout d'abord, le niveau d'acide ribonucléique messager (ARNm) d'AIBZIP a été déterminé par buvardage de type

«Northern» en utilisant des cellules LNCaP traitées par l'androgène synthétique R1881 en fonction du temps ou de la dose. Ensuite le niveau de la protéine a été analysé par immunobuvardage en utilisant les mêmes conditions de traitement. Nous avons observé que le niveau de l'ARNm d'AlbZIP augmente suite à un traitement des cellules LNCaP par l'androgène synthétique R1881 de même que le niveau d'expression de la protéine et ce de façon dose-dépendante (Qi, Fillion et al. 2002) (figure 1-5-3a). De plus, nous pensons que la modulation de l'expression d'AlbZIP par les androgènes se fait de manière indirecte. Pour ce faire, des cellules LNCaP ont été traitées par l'androgène synthétique R1881 en présence de l'actinomycine D (inhibiteur de la transcription) ou de la cycloheximide (inhibiteur de la traduction). L'effet des deux agents sur l'expression d'AlbZIP a été comparé à l'effet du traitement des cellules avec l'androgène synthétique R1881 seul ou en présence du casodex (antagoniste du RA). En effet, nous avons observé un blocage de l'effet du R1881 suite à l'ajout de l'actinomycine D ou de la cycloheximide, ce qui suggère que la régulation se fait de manière indirecte en activant d'autres voies de signalisation. Ces résultats permettraient d'expliquer l'induction tardive d'AlbZIP comparativement à d'autres gènes régulés par les androgènes (Qi, Fillion et al. 2002) (Figure 1-5-3b).



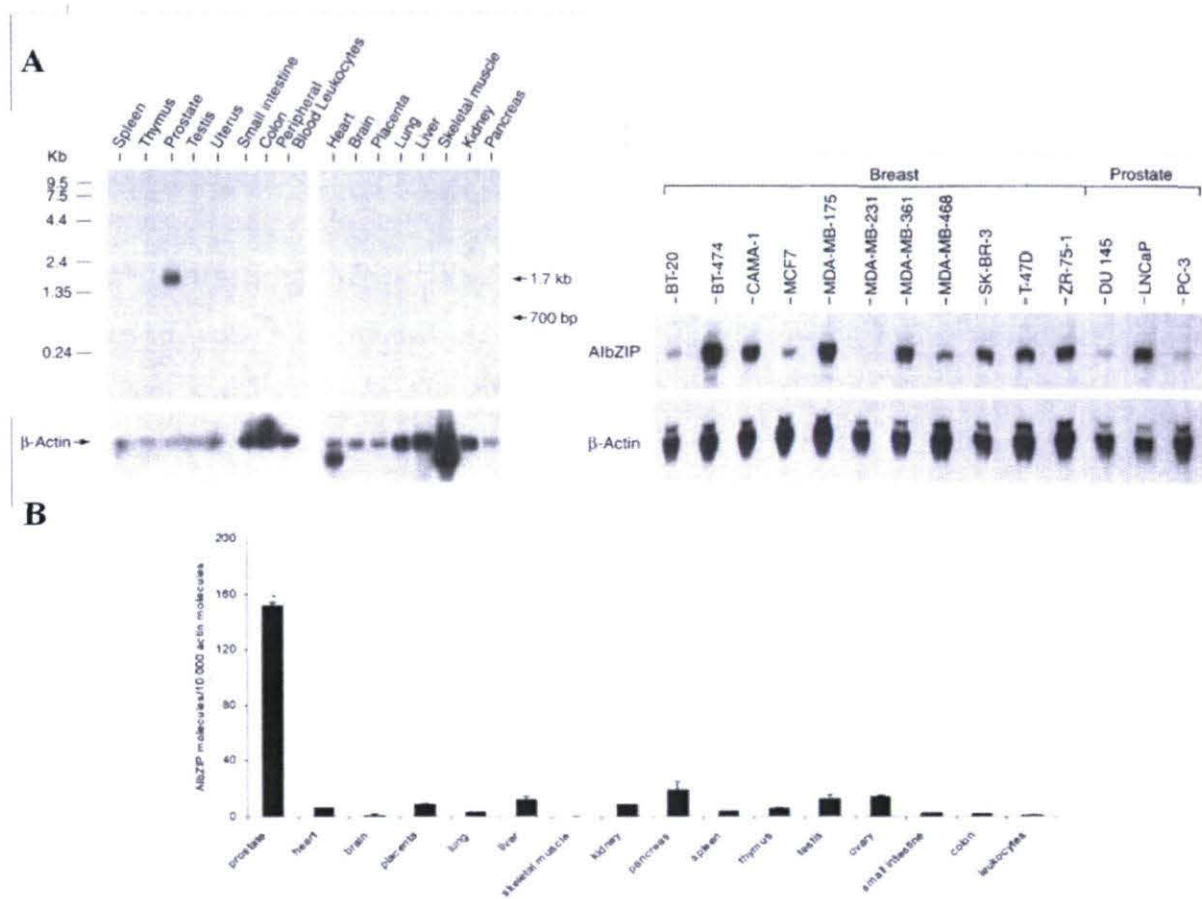
**Figure 1-5-3 :** AlbZIP est régulé par les androgènes. A. Suite au traitement des cellules LNCaP avec l'androgène synthétique R1881, le niveau d'ARNm d'AlbZIP augmente considérablement. B. Cette régulation par les androgènes se fait de façon indirecte. Suite au traitement des cellules LNCaP par l'actinomycine D ou la cycloheximide, il n'y a pas de changement du niveau d'expression d'AlbZIP et ce en absence ou en présence du R1881.



Le même effet est observé suite au traitement des cellules par l'inhibiteur des androgènes le casodex. (Adaptée de «*AlbZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells*» *Cancer Res*, 2002).

#### 5.iii.iv Profil d'expression d'AlbZIP

En découvrant AlbZIP notre équipe a effectué des buvardages de type «Northern» en utilisant plusieurs tissus (testicules, prostate, utérus, placenta, poumons, etc.) pour déterminer le profil d'expression d'AlbZIP. Il s'est avéré que l'ARNm d'AlbZIP était présent seulement au niveau de la prostate (Qi, Fillion et al. 2002) (Figure 1-5-4A). Toujours intéressés d'identifier le profil d'expression d'AlbZIP, des essais de protection à la RNase ont été effectués sur des lignées cellulaires cancéreuses mammaires (BT-474, MCF7, MDA-MB-231, BT-20, CAMA-1, MDA-MB-175, MDA-MB-468, SK-BR-3, T-47D et ZR-75-1) et prostatiques (DU145, LNCaP et PC-3). Étonnamment, à part la lignée LNCaP, l'ARNm d'AlbZIP était exprimé au niveau de lignées cancéreuses prostatiques résistantes aux androgènes. De plus, l'ARNm d'AlbZIP était présent au niveau de toutes les lignées cellulaires cancéreuses mammaires, excepté la lignée MDA-MB-231, dont certaines n'expriment pas le récepteur des androgènes (Qi, Fillion et al. 2002) (Figure 1-5-4). Mais ces autres modèles n'ont pas été investigués de plus près. En 2006, l'équipe du Dr. Peter Rieber a choisi huit gènes, dont AlbZIP, pour réaliser une évaluation comparative détaillée de leurs niveaux d'expression et de leur tissu-spécificité par réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR). AlbZIP était faiblement exprimé au niveau des testicules, du foie, des reins, du pancréas comparativement à la prostate où il est le plus abondant (Cunha, Weigle et al. 2006) (Figure 1-5-4).

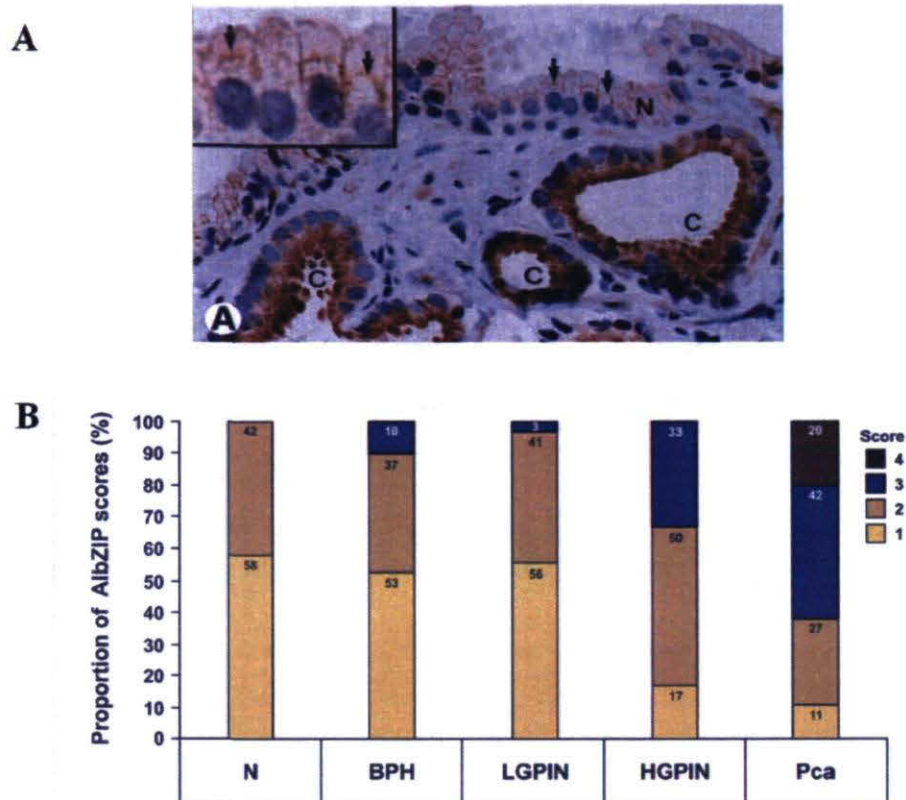


**Figure 1-5-4:** Profil d'expression d'AlbZIP. A. L'ARNm de plusieurs tissus a été utilisé pour réaliser un buvardage de type Northern. Une bande de taille de 1.7Kb a été détectée seulement au niveau de la prostate et une autre de 700pb a été observée au niveau du côlon mais aucune autre bande n'a été observée dans les autres tissus. De plus, un essai de protection à la RNase (RPA) a été réalisé en utilisant différentes lignées cellulaires cancéreuses prostatiques et mammaires. Étonnement, AlbZIP est observé au niveau de toutes les lignées testées sauf la lignée mammaire MDA-MB-231. B. Une analyse PCR en temps réel a été réalisée afin de déterminer les antigènes spécifiques à la prostate. (Adaptée de «AlbZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells» *Cancer Res*, 2002 et de «Tissue-specificity of prostate specific antigens: comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues» *Cancer Lett.*, 2006).

### 5.iii.v Surexpression d'AlbZIP au niveau du cancer de la prostate

Comme AlbZIP a été identifié parmi les gènes régulés par les androgènes au niveau de lignée cellulaire prostatique humaine de cancer, il était naturel de déterminer le niveau d'expression de cette protéine au niveau du cancer de la prostate. Pour ce faire, une expérience d'immunohistochimie réalisées sur 15 biopsies de cancer de la prostate et 20 échantillons de prostate normale a été réalisée par notre équipe. Pour cette expérience, un anticorps dirigé contre le domaine COOH terminal d'AlbZIP (reconnaît donc la forme pleine longueur) a été utilisé. Nous avons observé, grâce à cette expérience, qu'AlbZIP est surexprimée au niveau du cancer de la prostate et qu'elle se trouve au niveau des cellules de la lumière (Figure 1-5-5 A). De plus, l'analyse d'ARNm sur des échantillons de prostate par hybridation *in situ* montre aussi une augmentation du niveau de l'ARNm au niveau du cancer de la prostate (Qi, Fillion et al. 2002). En 2006, dans le but d'identifier d'autres marqueurs pour le dépistage précoce du cancer de la prostate, l'équipe de Schmidt a réalisé une étude quantitative (QPCR) sur 106 échantillons de cancer de prostate. Cette étude a confirmé l'observation précédente en démontrant quantitativement qu'AlbZIP est deux fois plus abondant dans le tissu cancéreux comparativement au tissu sain (Schmidt, Fuessel et al. 2006). Pour vérifier toutes ces données, une expérience à large échelle a été réalisée en utilisant un grand nombre d'échantillons de prostate. Ces échantillons incluaient de la prostate normale, des tissus d'hyperplasie bénigne, des néoplasies intraépithéliales de bas et de haut grade et des adénocarcinomes. Brièvement, l'hyperplasie bénigne est une croissance démesurée des tissus de la prostate sans risque de développement de cancer. Les néoplasies intraépithéliales de bas et haut niveau sont considérées comme un état pré-malin dans le cancer de la prostate et, enfin, l'adénocarcinome est la tumeur maligne développée au dépens de l'épithélium glandulaire. Cette expérience a confirmé l'augmentation de l'abondance de la protéine AlbZIP au niveau du cancer de la prostate et la présence d'un signal intense au niveau du cytoplasme des cellules de la lumière au niveau de la région apicale. Le fait que le niveau d'expression d'AlbZIP soit différent entre l'hyperplasie bénigne et le cancer permettrait de le considérer comme un bon marqueur de diagnostic et de pronostic du cancer de la prostate. Toutefois, AlbZIP ne permet pas de distinguer les cancers selon leur score de Gleason (Levesque, El-Alfy et al. 2007). Mais la question qui

demeure encore néanmoins à démontrer si la surexpression d'AlbZIP est une cause ou une conséquence du cancer de la prostate (Figure 1-5-5 B).



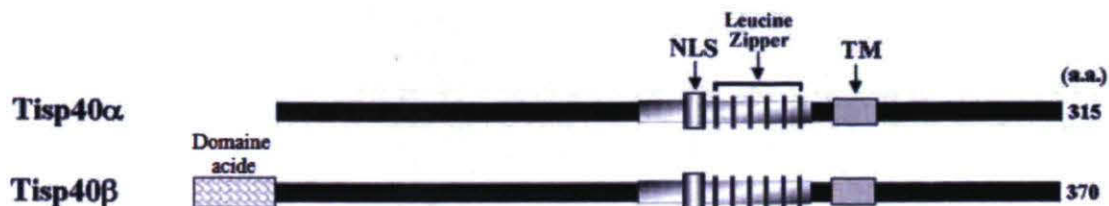
**Figure 1-5-5 :** AlbZIP est surexprimée au niveau du cancer de la prostate. A. L'immunohistochimie réalisée sur des coupes de cancers de prostates en utilisant un anticorps dirigé contre la partie C-terminale d'AlbZIP montre la surexpression de cette protéine au niveau des cellules cancéreuses (C) comparativement aux cellules saines (N). B. Quantification de l'intensité de marquage de l'expérience à large échelle d'immunohistochimie, 24 spécimens normaux (N), 30 spécimens d'hyperplasie bénigne (BPH), 32 néoplasies prostatiques de faible grade (LGPIN), 6 néoplasies prostatiques de haut grade (HGPIN) et 69 spécimens de cancer. L'intensité de marquage est présentée par les chiffres de 1 à 4. 1 : absence de marquage, 2: marquage faible, 3: marquage moyen et 4: marquage intense. Il y a une corrélation positive entre la présence d'AlbZIP et le développement du cancer de la prostate. Toutefois, il n'y a pas de corrélation positive entre AlbZIP et le score de Gleason. (Adaptée de «AlbZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells» *Cancer Res*, 2002 et adaptée de «Evaluation of AlbZIP and Cdc47 as markers for human prostatic diseases» *Urology*, 2006.)

### 5.iii.vi A**IbZIP** chez les autres espèces

A**IbZIP** est un gène bien conservé chez les mammifères (chimpanzé, vache, chien, souris et rat). De plus, A**IbZIP** est un gène qui est apparu plus tard dans l'évolution, en effet A**IbZIP** n'existe pas chez les eucaryotes inférieurs.

L'alignement des séquences d'ADNc chez l'humain, le singe, le rat et la souris montre qu'ils partagent les mêmes jonctions intron-exon. De même, nous observons un haut niveau de conservation de la séquence au niveau des différents domaines fonctionnels en NH<sub>2</sub> et COOH terminaux (Labrie, Lessard et al. 2008). Les séquences protéiques d'A**IbZIP** chez l'humain et chez le singe sont presque identiques (380 aa sur 395 aa) alors que les rongeurs partagent 87% d'acides aminés identiques avec l'humain (Labrie, Lessard et al. 2008). C'est au niveau du domaine N-terminal qu'on observe la différence entre l'humain et les rongeurs. La région b**ZIP** est hautement conservée au niveau des 4 protéines. Quand au domaine C-terminal, les 4 protéines présentent le même domaine transmembranaire incluant le site de clivage de la protéase S1P et le site de la glycosylation.

Deux formes d'A**IbZIP** chez la souris ont été identifiées. En 2002, le gène codant la protéine Tisp40 a été identifié par hybridation soustractive modifiée appelé « stepwise subtraction ». Cette expérience a permis d'identifier une centaine de gènes induits durant la spermatogenèse dont 80 appelés Tisp (transcript induced in spermiogenesis). Ces transcrits sont induits pendant la spermiogenèse et donc spécifiques aux testicules et plus précisément spécifiques aux spermatozoïdes (Fujii, Tamura et al. 2002). En parallèle, l'équipe du Dr Don a identifié Atc1 (*Attaching to CRE-like 1*) par double hybride chez la levure interagissant avec la protéine de souris Tctex 2 (testis-specific protein). Pour ce faire, Stelzer et collaborateurs ont utilisés les 142 aa du domaine COOH-terminal de la protéine Tctex2 (lie spécifiquement les promoteurs de yeast early meiotic genes) en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 comme appât et une librairie d'ADNc (banque) provenant de testicules de souris fusionnés au domaine d'activation de GAL4 comme cible (Stelzer and Don 2002). En fin de compte, il s'agissait de la même protéine de 315 aa qu'on avait baptisé Tisp40 alpha ou Atc1. L'autre forme murine d'A**IbZIP** a été rapportée au niveau de la banque de données du « National Center for Biotechnology Information » et porte le nom de Tisp40 bêta. Elle présente un exon de plus au niveau de la région 5' et code pour 370 aa (Figure 1-5-6).



**Figure 1-5-6 :** Représentation schématique de Tisp40 $\alpha$  et Tisp40 $\beta$ . Tisp40  $\alpha$  et  $\beta$  présentent un domaine bZIP au niveau duquel se trouve un signal de localisation nucléaire (NLS) Adaptée de «*Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway*», *Genes to Cells*, 2005 (Nagamori, Yabuta et al. 2005).

La forme murine d'AlbZIP est induite pendant la troisième phase de la spermatogenèse, la spermiogenèse. Brièvement, la spermatogenèse est composée de 3 phases. La première phase se caractérise par la prolifération des cellules germinales qu'on appelle spermatogonies par mitoses successives et leur différenciation en spermatoocytes primaires diploïdes (spermatoocytes I). La deuxième phase consiste en la division, par méiose, des spermatoocytes I en spermatoocytes II puis en spermatides. La dernière phase est la spermiogenèse pendant laquelle on observe la transformation morphologique des spermatides à  $n$  chromosomes en spermatozoïdes. Durant ce stade de maturation, les histones sont remplacées par les protamines ce qui provoque une forte condensation de la chromatine, une réduction du volume cytoplasmique et la formation du flagelle du spermatozoïde. Chaque phase est caractérisée par l'expression spécifique de gènes (El-Alfy, Azzi et al. 2006), (Stelzer and Don 2002). Les deux facteurs de transcription CREB (cAMP-responsive element-binding protein) et CREM (cAMP-responsive element modulator) jouent un rôle important pendant les différents stades de la spermatogenèse. Il s'agit de deux facteurs de la famille ATF/CREB, qui grâce à leur domaine bZIP, sont capables de lier l'élément de réponse CRE (cAMP-responsive element) au niveau du promoteur de leurs gènes cibles. Durant la spermatogenèse, la FSH (hormone folliculo-stimulante) induit le niveau intracellulaire de l'AMP cyclique au niveau des cellules de Sertoli, ce qui active CREB par phosphorylation au niveau de la sérine 133 et, par conséquent, l'expression de ses gènes cibles (Stelzer and Don 2002). CREM à son tour joue un rôle crucial pendant la spermiogenèse. En effet, l'inactivation du gène *Crem* chez la

souris provoque un arrêt de la spermatogenèse au niveau du stade de spermatides (ronds) et, par conséquent, cause l'infertilité chez la souris. Cette infertilité peut être expliquée par l'incapacité de la cellule *Crem*<sup>-/-</sup> d'exprimer les gènes en aval de *Crem* comme, par exemple, les gènes qui codent pour les protamines (qui remplacent les histones) et permettent la condensation de l'ADN (El-Alfy, Azzi et al. 2006). La protéine *Crem* est aussi activée par phosphorylation au niveau de la sérine 117 (Stelzer and Don 2002); (Gil, Yosef et al. 2006).

*Tisp40* (ou *Atce1*) a suscité beaucoup d'intérêt du fait de sa forte abondance au niveau des testicules par comparaison à *AlbZIP* qui est très abondante au niveau de la prostate. Différentes études réalisées par plusieurs équipes (équipe de Don, Nojima et Labrie) ont contribué à la caractérisation de la forme murine du gène *Creb3l4*.

En 2002, l'équipe du Dr Don a montré par buvardage de type de northern que l'expression de *Tisp40 $\alpha$ /Atce1* est exclusive aux testicules (Stelzer and Don 2002). De plus, cette expression est significative entre les stades V et VIII du cycle de la spermatogenèse ce qui correspond au stade « spermatide intermédiaire ». De plus, il a été démontré par technique de retard sur gel que *Tisp40 $\alpha$*  lie l'élément de réponse NF $\kappa$ B contrairement aux autres membres de la famille ATF/CREB qui lient la séquence consensus CRE (Stelzer and Don 2002). Le gène *Tisp40* génère deux produits, le premier est de 38 KDa et correspond à *Tisp40 alpha* ou *Atce1* et le deuxième est de 44 KDa et correspond à *Tisp40 bêta*. De plus, en utilisant le même anticorps, ils ont observé que les protéines de fusion 6Myc-*Tisp40* et 6Myc-*Tisp40 $\Delta$ TM* (sans le domaine transmembranaire) sont localisés au niveau de la région périnucléaire et au noyau, respectivement. Des expériences d'immunofluorescence indirecte ont montré que *Tisp40* est localisée au niveau du réticulum endoplasmique comme tous les membres de la sous-famille de CREB3 chez l'humain. De plus, *Tisp40* est une protéine transmembranaire de type II (paragraphe ii). Comme il a été montré que la forme pleine longueur de *Tisp40* est localisée au RE alors que la forme tronquée est nucléaire, il était intéressant de voir si la forme murine d'*AlbZIP* est, elle aussi, clivée par le mécanisme RIP comme les autres membres de la sous-famille de CREB3. Plusieurs approches utilisées ont démontré que *Tisp40* est sujet au clivage par le mécanisme RIP. De plus, par comparaison aux séquences en acides aminés du facteur ATF6 et SREBP2 humains, deux séquences semblables aux sites consensus des protéases S1P et S2P ont été

identifiées. La génération de mutants ponctuels a permis de mettre en évidence le clivage de Tisp40 via ces sites consensus, particulièrement le site de la S1P. En 2005, l'équipe de Nojima a démontré par la suite, grâce à des expériences de retard sur gel que Tisp40alpha lie l'élément de réponse UPRE mais ne lie l'élément de réponse NFκB comme cela a été rapporté par l'équipe de Don. De plus, le domaine NH2-terminal de Tisp40bêta (et non celui de Tisp40alpha) peut activer l'expression du gène rapporteur via l'élément UPRE ce qui signifie que Tisp40bêta est l'activateur puissant de la transcription. EDEM est un gène cible de Tisp40. En effet, l'ARNm d'EDEM est induit suite à la surexpression de la forme Tisp40bêta. Il est toutefois pas encore clair comment Tisp40 active l'expression de EDEM et si cette activation est directe ou indirecte (Nagamori, Yabuta et al. 2005). En 2006, notre équipe a présenté une étude montrant que, contrairement à ce qui a été rapporté par l'équipe de Nojima, seulement la forme alpha de Tisp40 était présente au niveau des testicules de souris (El-Alfy, Azzi et al. 2006). Ceci concorde avec l'observation faite par Nagamori, en 2005, que l'ARNm de Tisp40 bêta est beaucoup moins abondant que celui de Tisp40 alpha. Afin de déterminer les fonctions physiologiques de Creb314, l'équipe de Adham, en 2005, a généré une souris déficiente *Creb314<sup>-/-</sup>*. Le gène qui code la protéine Creb314 a été remplacé par le gène de la GFP (*green fluorescent protein*) et ce par recombinaison homologue. Les souris déficientes étaient viables, en bonne santé (Adham, Eck et al. 2005). Ceci suggère que Creb314 joue un rôle important dans le développement des cellules germinales mâles mais son manque d'expression n'affecte pas assez le nombre et la fonction des spermatozoïdes pour observer des effets flagrants. L'observation des tubes séminifères des souris *Creb314<sup>-/-</sup>* montre la présence de spermatogonies, de spermatocytes, de spermatides mais aussi de cellules géantes rarement observées au niveau des souris de type sauvage âgées de moins de 6 mois. De plus, des essais TUNEL (*dUTP nick end labeling*) ont montré que chez les souris KO les cellules apoptotiques se trouvent au niveau de la région proche de la lumière alors que chez la souris de type sauvage, ces cellules se trouvent au niveau de la membrane basale du tube séminifère (Adham, Eck et al. 2005). Les mêmes observations ont ultérieurement été rapportées par l'équipe de Nojima. Ils ont démontré davantage que les noyaux des spermatozoïdes au niveau de l'épididyme sont déformés, les membranes de la tête ne sont pas attachées au noyau et certains noyaux sont submergés par les membranes en forme de crochet. Ceci suggère que Tisp40 joue un rôle important dans



la condensation de la chromatine. Il est connu que les histones sont normalement exprimées à partir du stade spermatogonie jusqu'au stade spermatide haploïde (stade 8) et sont localisées au niveau du noyau. Cependant, les histones au niveau des souris *Tisp40<sup>-/-</sup>* sont détectées plus tard que le stade 8 et sont localisées au niveau du cytoplasme et du noyau. De plus, il y a augmentation du niveau d'expression des histones H2A et H4 précisément et cette augmentation est proportionnelle au niveau d'acétylation de ces deux histones. Or, une des étapes de maturation des spermatozoïdes est le remplacement des histones par des protamines ce qui provoque la condensation de la chromatine. Nous savons que l'hyperacétylation a lieu justement avant la disparition des histones. En effet, les nucléosomes sont modifiés par l'hyperacétylation ce qui induit la relaxation de la chromatine et finalement les protéines de transition (TP1 et TP2) sont remplacées par des protéines hautement basiques les protamines. Toutefois, au niveau de la souris *Tisp40<sup>-/-</sup>*, on n'observe pas de disparition des histones H2A et H4 pendant les derniers stades de la spermiogenèse (Nagamori, Yomogida et al. 2006). La même équipe a rapporté dans un autre article que *Tisp40* est un gène cible de *Crem* et que les deux protéines interagissent ensemble *in vitro* et *in vivo* et lient préférentiellement l'élément CRE au niveau du promoteur de *Tisp40* et augmentent l'activité de *Crem* via cet élément (Nagamori, Yomogida et al. 2006). De plus, ce complexe recrute la chaperonne spécifique de l'histone H3.3 HIRA qui a été identifiée parmi les protéines qui s'associent avec *Crem*. D'ailleurs, il a été démontré par expérience d'immunoprécipitation de la chromatine que l'interaction de HIRA avec l'élément CRE est dépendante de la présence de *Tisp40*. En conclusion, l'homologue d'*AibZIP* chez la souris est un gène induit pendant la spermiogenèse et plus précisément pendant les stades où le RE est très sollicité, ce qui provoque son clivage et sa translocation vers le noyau. De plus, toutes les observations faites au niveau des souris KO montrent que ce facteur de transcription est impliqué dans la maturation des noyaux des spermatozoïdes. L'hypothèse émise par l'équipe de Nojima est la suivante : *Tisp40* et *Crem* forment un hétérodimère, lient l'élément de réponse CRE et recrutent HIRA au niveau de cet élément pour faciliter le remplacement de l'histone H3 pendant les stades tardifs de la spermiogenèse (Nagamori, Yomogida et al. 2006).

Une autre étude a été publiée en 2008 par l'équipe de Yang rapportant l'homologue d'*AibZIP* chez le porc. L'ADNc de *CREB3L4* porcin présente 85.6, 71.7 et 71.8%

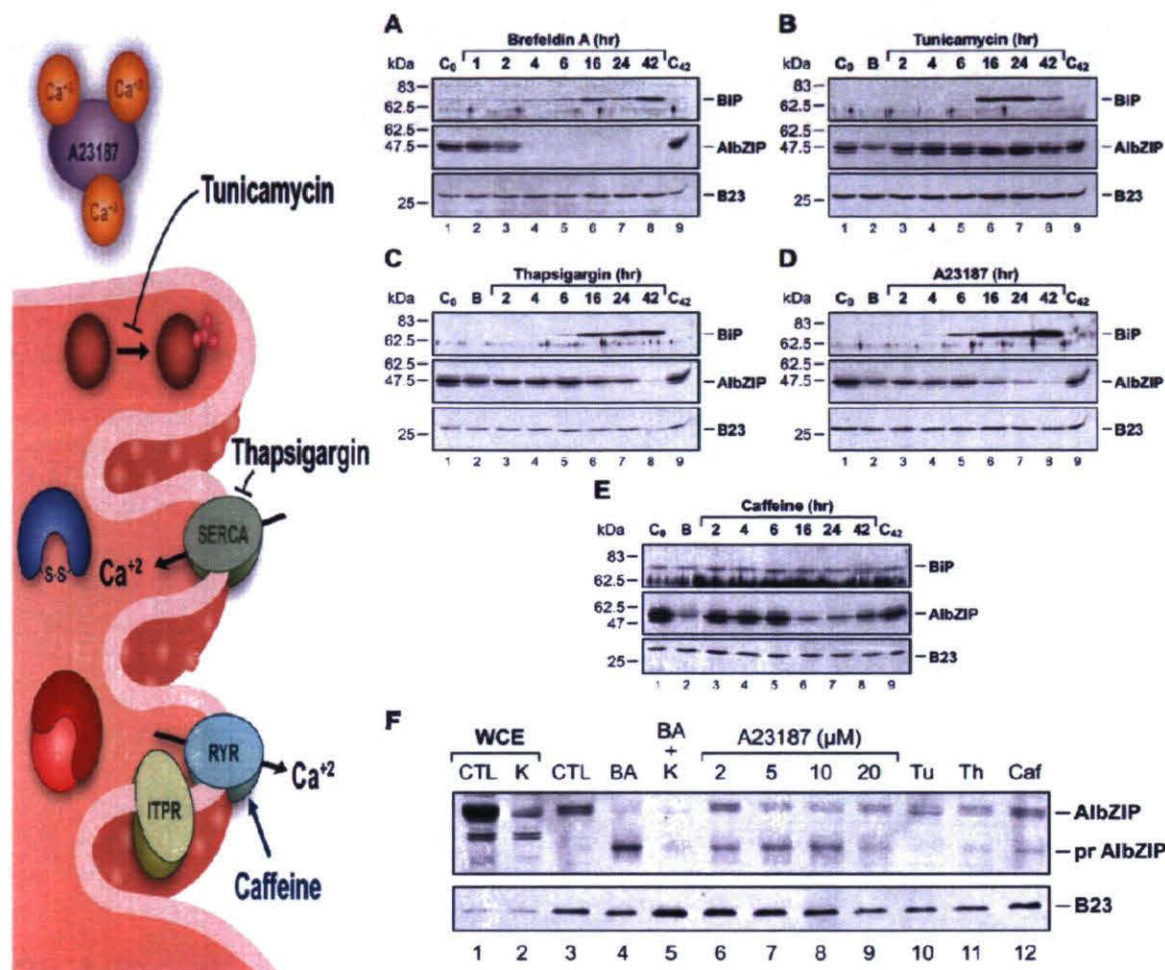
d'homologie avec l'ADNc de l'humain, de la souris et du rat, respectivement. Au niveau du chromosome 4, le gène CREB3L4 est situé tête à tête avec le gène JTB. Il s'agit de la même disposition que pour le gène chez l'homme. CREB3L4 présente une expression ubiquitaire. De plus, une isoforme de CREB3L4 a été identifiée. Cette isoforme présente, elle aussi, une expression ubiquitaire. Cette isoforme pourrait jouer un rôle de dominant négatif puisqu'elle a perdu une partie de son domaine bZIP ainsi que le domaine COOH-terminal suite à l'apparition d'un codon STOP prématuré par épissage alternatif (Qi, Lei et al. 2009).

### **5.iii.vii A1bZIP est régulée par le mécanisme RIP**

Comme les autres membres de la sous-famille de CREB3, A1bZIP est régulée par le mécanisme RIP. En 2005, l'équipe du Dr Nojima a mis en évidence le clivage de la forme murine recombinante Tisp40 par la brefeldin A (Nagamori, Yabuta et al. 2005). Une étude publiée en 2006 par l'équipe du Dr O'Hare a montré qu'A1bZIP possède un site potentiel pour la S1P sans, toutefois, réussir à induire expérimentalement son clivage protéolytique (Stirling and O'Hare 2006). Grâce à des expériences réalisées par notre équipe, nous avons montré qu'A1bZIP est régulée par le mécanisme RIP. Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée cellulaire prostatique cancéreuse LNCaP. Les traitements des LNCaP avec la BA provoquaient la disparition de la forme pleine longueur d'A1bZIP dès 4 heures de traitement (en utilisant un anticorps dirigé contre le domaine C-terminal d'A1bZIP) (Figure 1-5-7A). Au niveau des extraits nucléaires, nous observons que cette disparition s'accompagne de l'apparition d'une forme plus courte qui migre au même niveau que le domaine NH<sub>2</sub>-terminal. Cette forme est détectée par un anticorps dirigé contre la partie N-terminale d'A1bZIP, (Figure 1-5-7F, piste 4) (Ben Aicha, Lessard et al. 2007). De plus, nous avons observé que la surexpression de la forme pleine longueur d'A1bZIP provoque un clivage spontané. Ce clivage pourrait être expliqué par le stress provoqué suite à la surexpression.

Pour déterminer le rôle physiologique d'A1bZIP, nous avons essayé de déterminer quel stress pourrait provoquer le clivage d'A1bZIP et, par conséquent, son acheminement vers le noyau où elle va remplir sa fonction de facteur de transcription. Pour ce faire, nous avons utilisé plusieurs drogues qui exercent des effets pharmacologiques semblables à un stress

physiologique. Jusque là, il n'a pas été mis en évidence une relation entre la réponse au stress du RE et le clivage d'AlbZIP mais notre raisonnement se basait sur le point suivant : les drogues qui peuvent provoquer un stress du RE pourrait cliver AlbZIP (Ben Aicha, Lessard et al. 2007). Plusieurs drogues ont été testées comme la thapsigargine, la tunicamicyne, la caféine et l'ionophore A23187. La plupart de ces drogues induisent l'expression de la chaperonne BiP, ce qui nous indique la présence de stress au niveau du RE. La tunicamicyne est un agent qui inhibe la N-glycosylation. Or, la glycosylation est une étape importante dans la maturation des protéines. Donc son inhibition induit un stress du RE. Le traitement par la Tunicamicyne active plusieurs protéines comme ATF6 et OASIS mais n'a pas d'effet du même genre sur AlbZIP (Figure 1-5-7B). Le deuxième agent utilisé est la thapsigargine. Cet agent de stress inhibe les pompes SERCA ce qui provoque la déplétion du calcium en empêchant son entrée dans les canaux calciques. Le traitement des cellules LNCaP avec cette drogue provoque la disparition graduelle de la forme pleine longueur d'AlbZIP jusqu'à une complète disparition après 42 heures de traitement (Figure 1-5-7C). Nous observons le même effet avec l'ionophore A23187 (Figure 1-5-7D). La caféine provoque aussi une diminution de la forme pleine longueur d'AlbZIP et ceci en bloquant les récepteurs de la ryanodine, ce qui a pour effet d'empêcher la sortie du calcium. Contrairement aux autres drogues, la caféine induit légèrement l'expression de la chaperonne BiP (Figure 1-5-7E). Il était nécessaire, suite à ces expériences, de vérifier que ces traitements ne provoquaient pas de dégradation de la protéine AlbZIP ou de diminution de son expression. Nous avons alors préparé des extraits nucléaires à partir de cellules LNCaP qui ont subi les mêmes traitements cités plus haut. La disparition de la forme pleine longueur d'AlbZIP s'accompagne de l'apparition d'une forme plus courte qui migre au même niveau que le produit de clivage par la BA. Ceci nous permet de penser que suite à un stress dû à l'altération du niveau du calcium au niveau du RE, AlbZIP se détache du RE pour se dépalcer vers l'appareil de golgi où elle va subir un clivage par les protéases S1P/S2P. Ensuite elle sera transloquée au noyau où elle va réguler l'expression de ses gènes cibles (Ben Aicha, Lessard et al. 2007) (Figure 1-5-7F).



**Figure 1-5-7 :** AibZIP est régulée par le mécanisme RIP. Le traitement des cellules LNCaP avec la BA provoque la disparition de la forme pleine longueur d'AibZIP (A). Le stress du RE induit par le traitement des cellules LNCaP avec les agents de stress Thapsigargin (Th), A23187 ou Caféine (Caf) provoque la disparition de la forme pleine longueur d'AibZIP (C, D et E) et l'apparition de la forme nucléaire d'AibZIP (F). Par ailleurs, la tunicamycine (Tu) n'a pas d'effet sur le clivage d'AibZIP (B). La forme d'AibZIP clivée migre au même niveau que la bande obtenue suite au traitement des cellules LNCaP par la Brefeldin A (BA), (F, piste 4, 6, 7, 8, 9, 11 et 12). Cette bande disparaît suite au traitement par l'ARN d'interférence dirigé spécifiquement contre AibZIP (F, piste 5). (Adaptée de «*Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AibZIP/CREB3L4 in prostate cells*». *Physiol Genomics*, 2007).

### 5.iii.viii Gènes régulés par AibZIP

Identifier les gènes régulés par AibZIP était une suite logique aux expériences entamées par notre équipe surtout pour savoir quelles sont les conséquences de l'activation d'AibZIP

suite au stress du RE. De plus, il était aussi intéressant de connaître les gènes en aval d'AIBZIP qui constitueraient l'ensemble de gènes indirectement régulés par les androgènes. Pour ce faire, nous avons mis au point un système de transfection stable, en utilisant le système Rhéoswitch, qui produisait de manière inductible la forme active d'AIBZIP (A290) en fusion en C-terminal avec l'épitope HA (ce système sera bien développé plus loin dans la section approches expérimentales). Plusieurs clones stables ont été caractérisés et un seul a été choisi pour l'expérience de puces affymetrix. Ce clone, nommé clone 7-11, exprime la forme recombinante d'AIBZIP nucléaire 2h après l'ajout de l'agent inducteur RSL1. L'ARN total extrait du clone stable aux temps 6h et 12h a été hybridé avec les puces Affymetrix U133 Plus 2.0 qui portent à peu près 54000 sondes. Les résultats obtenus ont été analysés et 49 gènes ont été choisis parmi la panoplie de gènes identifiés. Des buvardages de type «Northern» sur l'ARNm du clone stable ont ensuite été réalisés et ce en utilisant les mêmes conditions des puces Affymetrix. Ces gènes validés ont été catégorisés selon leur fonction, [tableau 3](#).

Tableau 3: Gènes cibles d'AIBZIP sélectionnés pour la validation.

<b>Transcription</b>	
CREB3	cAMP responsive element binding protein 3
ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
HYOU1	hypoxia up-regulated 1
ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
<b>Protein maturation, sorting, degradation</b>	
BAG3	BCL2-associated athanogene 3 (chaperone-binding protein)
CALU	Calumenin (EF-hand calcium-binding protein)
DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12 (co-chaperone)
EDEM1	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1 (protein degradation)
GALNT3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (O-glycosylation)
GORASP2	golgi reassembly stacking protein 2, 55kDa (Golgi formation)
HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 (protein degradation)
KDELR1	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1
KDELR2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2

KDEL3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
LMAN1	lectin, mannose-binding, 1 (glycoprotein transport)

### Metabolism (lipid or sugar)

ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3 (lipid biosynthesis)
GFPT1	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1 (hexosamine pathway)
INSIG1	insulin induced gene 1 (regulation of SREBPs)
LIPA	lipase A (cholesteryl ester and triglyceride hydrolysis)
PGM1	phosphoglucomutase 1 (glucose metabolism)
PGM3	phosphoglucomutase 3 (glucose metabolism)
UGT2B28	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B28

### Channels and transporters

ANKH	ankylosis, progressive homolog (mouse) (pyrophosphate metabolism)
AQP3	aquaporin 3 (water and glycerol channel)
CUZD1	CUB and zona pellucida-like domains 1 (potassium channel)
KCNK1	potassium channel, subfamily K, member 1
SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2
TMCO3	transmembrane and coiled-coil domains 3 (pH regulation)

### Signal transduction

ANXA2	annexin A2 (calcium-dependent phospholipid binding protein)
CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
CECR1	cat eye syndrome chromosome region, candidate 1 (adenosine deaminase)
DUSP1	dual specificity phosphatase 1 (MAP kinase phosphatase)
IKIP	IKK (I kappa B kinase) interacting protein
PLA2G2A	phospholipase A2, group IIA
ST7	suppression of tumorigenicity 7 (low density lipoprotein receptor family)
THBS1	thrombospondin 1 (TGF $\beta$ signalling)

### Miscellaneous

ANG	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 (tRNA hydrolysis)
CD24	CD24 molecule (surface sialoglycoprotein)
DOM3Z	dom-3 homolog Z (function unknown)
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta

KIAA0774	function unknown
LOX	lysyl oxidase (crosslinks extracellular matrix proteins)
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1 (tunicamycin and oxygen-responsive)
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4
SIDT2	SID1 transmembrane family, member 2 (function unknown)
TMEM45A	transmembrane protein 45A (function unknown)
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2
WDFY2	WD repeat and FYVE domain containing 2 (endocytosis)

D'après cette étude, la majorité des gènes régulés par AtbZIP codent pour des protéines impliquées dans divers processus cellulaires non reliés à la fonction du RE. Toutefois, certains candidats validés sont impliqués dans la maturation des protéines nouvellement synthétisées et dans la dégradation par le mécanisme ERAD (Ben Aicha, Lessard et al. 2007).

## 6. Approches expérimentales

### 6.i Introduction

Pour répondre aux interrogations posées quant au rôle d'AlbZIP dans le cancer de la prostate, j'ai utilisé la lignée cellulaire LNCaP pour toutes mes expériences. Dans ce chapitre, j'introduis les techniques que j'ai utilisées pour la génération de dominants négatifs et pour la purification des partenaires des formes pleine longueur et nucléaire d'AlbZIP.

### 6.ii Lignée cellulaire LNCaP

La lignée cellulaire LNCaP (*Lymph Node Carcinoma of the Prostate*) est un outil de travail très utile comme modèle d'étude du cancer de la prostate. Cette lignée cellulaire a été établie à partir d'une lésion métastatique d'un adénocarcinome de prostate humaine. En effet, les LNCaP conservent leur morphologie, leur différenciation fonctionnelle et leurs propriétés malignes. De plus, les deux glycoprotéines spécifiques à la prostate : l'antigène spécifique de la prostate (ASP/PSA) et la phosphatase acide prostatique humaine (PAP) y sont exprimés. Ces cellules sont aneuploïdes et présentent tous les chromosomes humains incluant le chromosome Y ainsi qu'un certain nombre de marqueurs chromosomiques. *In vivo* et *in vitro*, cette lignée est sensible aux hormones (androgènes) qui peuvent être utilisées pour moduler sa croissance. La prolifération cellulaire *in vitro* des LNCaP est dose-dépendante de l'androgène le plus puissant la DHT. Cette lignée présente les caractéristiques des cellules adhérentes qui se cultivent facilement et présentent une croissance lente (le nombre de cellules double en 60 heures). De plus, elle est facile à entretenir et surtout facile à transfecter. La complexité des cancers de la prostate nécessite la présence de plusieurs modèles d'étude pour mieux comprendre cette maladie. Les cellules LNCaP présentent beaucoup d'avantages, surtout leur sensibilité aux androgènes, un phénotype rare parmi les lignées cancéreuses prostatiques disponibles. Toutefois, l'hétérogénéité de cette lignée cellulaire pourrait limiter l'interprétation de certains résultats (Horoszewicz, Leong et al. 1983).



### 6.iii Système inductible :

Le système d'expression inductible permet de produire la protéine d'intérêt de façon conditionnelle grâce à la combinaison de trois composantes essentielles incluant un ligand spécifique, un facteur de transcription qui est activé par ce ligand et un promoteur qui est activé par le facteur de transcription. L'avantage d'utiliser un système inductible consiste à pouvoir exprimer la protéine d'intérêt de façon contrôlée. La surexpression permet davantage de mieux comprendre les mécanismes d'action de certaines protéines qui ne sont pas produites avec des taux assez élevés pour être détectées. Au noyau, AlbZIP n'est pas abondamment exprimée ce qui représente un facteur limitant pour étudier sa forme nucléaire. Plusieurs systèmes ont été élaborés au cours des dernières années tels que ceux qui sont modulés par la tétracycline/doxycycline (Tet-On/Tet-Off), l'ecdysone (hormone stéroïdienne chez les insectes), la ponastérone (hormone stéroïdienne produite par les plantes), ou la mifepristone (un antagoniste du récepteur de la progestérone). Cependant ces systèmes présentent plusieurs limites comme, par exemple, l'inhibition de la croissance cellulaire suite à l'ajout de mifepristone ou de la doxycycline ou l'effet hormonal que peuvent potentiellement exercer des molécules stéroïdiennes. Pour surmonter ces limites au niveau de la lignée cellulaire sensible aux androgènes, nous avons choisi le nouveau système RheoSwitch. Ce système est une version modifiée du système d'expression inductible à l'ecdysone. En revanche ce système utilise un ligand synthétique non stéroïdien analogue au 20-hydroxyecdysone appelé RSL1. Il s'agit, en fait, d'un membre de la classe des insecticides connus sous le nom des diacylhydrazines. Cette molécule induit la mue et la mort de la larve mais elle est bien tolérée au niveau des vertébrés (Lessard, Aicha et al. 2007) (Figure 1-6-1). L'avantage de ce système est qu'il utilise des protéines hybrides pour réguler l'expression de gènes via les éléments de réponse à GAL4. Il s'agit en fait de deux facteurs de transcription un RheoReceptor-1 et un RheoActivator. Le premier est composé du domaine de liaison au ligand de EcR (récepteur de l'ecdysone) fusionné en C-terminal au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 de la levure. Le deuxième est composé du domaine de liaison au ligand de RXR fusionné en C-terminal au domaine d'activation de la transcription viral de VP16. De plus, le domaine de liaison au ligand est spécifique au ligand RSL1. Pour faciliter davantage l'utilisation de ce système, nous avons modifié le système RheoSwitch composé de deux plasmides pour générer un seul plasmide qui



autour de l'autre pour former le domaine de superhélice ou «coiled coil». Dans l'objectif de générer un peptide compatible avec le motif de glissière de leucine d'AlbZIP et pouvant excercer un effet dominant négatif, nous avons modifié la composition en acides aminés de ce motif afin d'augmenter son affinité au motif de glissière de leucine de la protéine AlbZIP naturelle. Pour ce faire, nous avons introduit de simples ou de multiples substitutions au niveau des différentes répétitions du motif de glissière de leucine. De cette façon, nous avons généré plusieurs motifs de glissière de leucines modifiés et grâce à l'algorithme développé par Mason et collaborateurs en 2006, nous avons calculé la température de fusion de chaque dimère formé par un motif muté et motif de type sauvage. Cette méthode semi-quantitative donne une idée prédictive sur l'effet produit par les différentes substitutions ainsi que la combinaison de ces dernières. L'impact de la dimérisation des différents mutants avec la protéine AlbZIP de type sauvage a été mesuré par essai luciférase (Reinke, Grant et al.); (Grigoryan, Reinke et al. 2009); (Fong, Keating et al. 2004); (Mason, Schmitz et al. 2006).

#### **6.v Purification par affinité en tandem et Immunopurification**

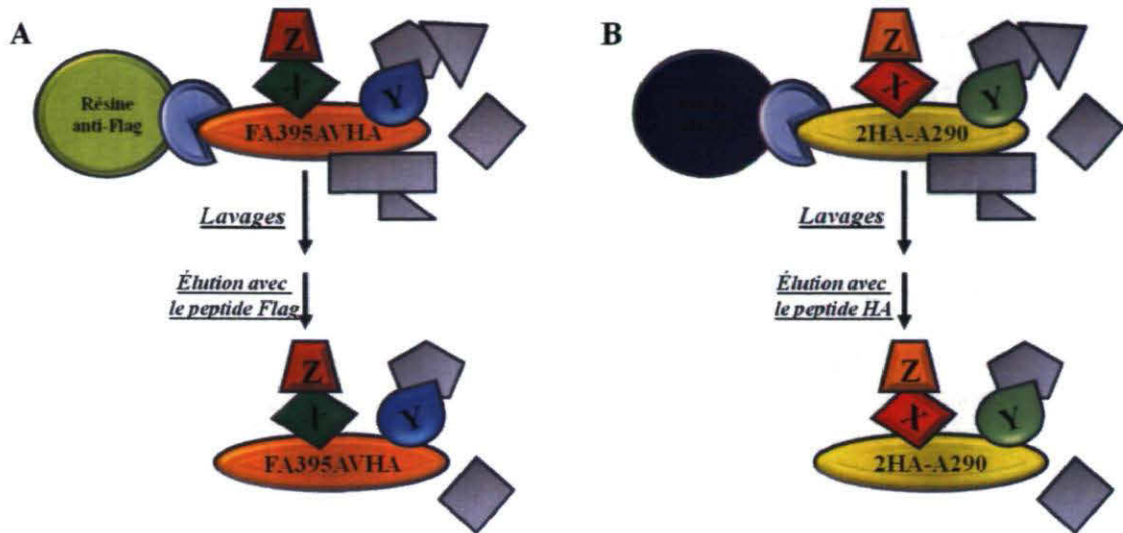
La technique de purification par affinité en tandem (*tandem affinity purification: TAP*) a été utilisée avec succès chez la levure (Puig, Caspary et al. 2001), cette purification biochimique combinée au séquençage par spectrométrie de masse ont permit d'identifier des complexes protéiques sous forme native. Cette méthode implique la fusion d'un motif en N ou en C terminal de la protéine d'intérêt. Cet épitope est constitué de deux domaines de liaison aux IgG de la protéine A issue du *Staphylococcus aureus* et d'un domaine de liaison à la calmoduline, les deux séparés par un site de clivage de la protéase du virus Etch du tabac (TEV) (Figure 1-6-2). Cette stratégie nécessite deux étapes successives de purification sur colonne mais présente plusieurs limites quand à son application chez les mammifères. Plusieurs équipes au cours des dix dernières années ont tenté de développer de nouveaux motifs TAP plus compatibles avec les cellules de mammifères.



**Figure 1-6-2:** Représentation schématique de la cassette TAP en N-terminal. ProtA, domaine de liaison aux IgG de la protéine A; TEV, site de clivage de la protéase du virus etch du tabac; CBP, domaine de liaison à la calmoduline.

La plus récente stratégie a été développée par la compagnie Sigma-Aldrich et utilise les épitopes Flag et HA en tandem. L'avantage de ce motif est sa petite taille ainsi que son origine non eucaryotique. Au cours de mon doctorat, plusieurs stratégies ont été mises en place afin d'identifier les protéines qui interagissent avec la forme pleine longueur et nucléaire d'AlbZIP. Tout d'abord, j'ai utilisé la version originale du TAP développée par le laboratoire du Dr. Séraphin (Puig, Caspary et al. 2001). Malgré l'utilisation d'un grand nombre de cellules ( $2.7 \times 10^9$  cellules par condition), le rendement final obtenu lors de la dernière élution était très faible. De plus, j'observais une forte contamination avec la kératine. J'ai alors décidé d'utiliser la nouvelle version du TAP désignée Flag-HA-TAP et d'augmenter le nombre de cellules par condition (de  $4.2 \times 10^9$  à  $6 \times 10^9$  cellules par condition) mais les essais préliminaires à petite échelle ont montré que la purification des complexes protéiques sur deux colonnes d'affinité réduisait fortement le rendement de l'élution finale et ce malgré une surexpression de la protéine d'intérêt fusionnée au motif TAP de façon stable.

Dans le cadre de purification des partenaires d'AlbZIP, un clone stable exprimant de façon inductible la forme pleine longueur d'AlbZIP en fusion en N-terminal avec l'épitope Flag a été amplifié à  $6 \times 10^9$  cellules par condition. La phase soluble a par la suite été purifiée sur une colonne de résine couplée à l'anticorps Flag et l'élution a été obtenue par compétition en utilisant le peptide Flag. L'éluat a par la suite été analysé par spectrométrie de masse. De même, un clone stable exprimant la forme nucléaire d'AlbZIP fusionnée en N-terminal avec deux épitopes de l'hémagglutinine influenza (HA) a été amplifié jusqu'à  $4.2 \times 10^9$  cellules par condition. Les extraits nucléaires enrichis ont été purifiés par la suite sur colonne de résine couplée à l'anticorps HA. L'élution a par la suite été effectuée par compétition en utilisant le peptide HA et l'éluat a été séquencé par spectrométrie de masse (Figure 1-6-3).



**Figure 1-6-3:** Vue d'ensemble de la stratégie de purification avec la résine Flag (A) ou la résine HA (B). FA395AVHA, forme pleine longueur d'AlbZIP fusionnée en N-ter avec l'épitope Flag et présentant une mutation au niveau du site S1P; 2HA-A290, forme nucléaire d'AlbZIP fusionnée en N-ter avec deux épitopes HA.

## 7. Problématique et objectifs de recherche

AlbZIP (*Androgen-Induced bZIP*) est un facteur de transcription appartenant à la famille ATF/CREB et plus précisément à la sous-famille de CREB3. Il a été identifié parmi des transcrits régulés par les androgènes. De plus, il est très abondant dans la prostate et la protéine AlbZIP est surexprimée au niveau des cellules prostatiques cancéreuses humaines comparativement aux cellules saines. Cependant, la relation entre la surexpression d'AlbZIP et le cancer de la prostate n'est pas encore bien comprise et nous ne savons toujours pas s'il s'agit de la cause ou d'une conséquence.

Sous sa forme inactive, AlbZIP est liée à la membrane du RE via son domaine transmembranaire. L'altération des concentrations calciques de ce dernier provoque l'activation d'AlbZIP suite à son clivage par le mécanisme RIP (*Regulated intramembrane proteolysis*). Ces dernières années, nous avons constaté qu'AlbZIP fait partie d'un groupement de facteurs bZIP localisés au RE et impliqués dans la réponse au stress. L'expansion du nombre de facteurs impliqués dans cette voie nous renseigne sur la sélectivité de la réponse selon le type de stress.

Cette réponse au stress appelée, UPR (*Unfolded protein response*), est très importante pour la fonction physiologique normale de la cellule lors de sa différenciation, de sa maturation ou aussi pour les cellules à forte capacité sécrétrice. Elle tend alors à rétablir l'homéostasie de la cellule en rétablissant l'équilibre entre la capacité du RE à produire des protéines mûres bien repliées et la demande. Malheureusement le dysfonctionnement de cette réponse est lié à plusieurs maladies comme le diabète, le cancer et les maladies neurodégénératives. Il n'est toutefois pas clair si cette dysfonction est une cause primaire de la maladie ou un phénomène secondaire, d'où les deux objectifs principaux de cette étude qui étaient de comprendre l'implication d'AlbZIP dans le cancer de la prostate et dans la réponse au stress du RE.

Pour atteindre ces deux objectifs j'ai, dans un premier temps, généré et caractérisé un dominant négatif présentant une forte efficacité d'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'AlbZIP et, dans un deuxième temps, identifié les partenaires de la forme pleine longueur

et nucléaire d'AlbZIP. Il était important de comprendre l'effet de l'inhibition de l'activité d'AlbZIP sur le développement et la progression du cancer de la prostate mais aussi sur les gènes cibles d'AlbZIP. De plus, il était intéressant de comprendre les deux contextes cellulaires dans lesquels AlbZIP baigne avant et après le stress du RE et le déclenchement de sa réponse.

Les résultats de cette étude seront présentés dans les chapitres suivants.

## **Chapitre 2: Combining an acidic extension with an optimized leucine zipper produces a potent dominant negative inhibitor of a stress-regulated bZIP transcription factor**

Hejer Boutej, Sonia Djebbar, Andréa Fournier, Claude Labrie

Ce deuxième chapitre présente des résultats qui portent sur la génération et la caractérisation d'un dominant négatif puissant AZM15N. Il s'agit d'un outil de travail très intéressant pour l'inhibition de l'activité d'AlbZIP au niveau des cellules prostatiques cancéreuses humaines. Le manuscrit présenté ici sera soumis sous peu pour publication et les expériences présentées dans les résultats, dont j'ai réalisé la majorité avec la collaboration de mes collègues, constituent une partie de mes travaux de doctorat. Plus précisément, toutes les expériences décrites dans l'article suivant ont été réalisées par moi-même sauf la génération du clone stable et l'expérience de co-immunoprécipitation en utilisant le clone stable exprimant la forme nucléaire d'AlbZIP. La première a été réalisée par notre professionnelle de recherche Andréa Fournier et la seconde a été réalisée par l'étudiante à la maîtrise Sonia Djebbar (figure 2-6A).



# Combining an acidic extension with an optimized leucine zipper produces a potent dominant negative inhibitor of a stress-regulated bZIP transcription factor

Hejer Boutej, Sonia Djebbar, Andréa Fournier, Claude Labrie

## 1. Résumé

Les facteurs de transcription bZIP jouent un rôle important dans plusieurs processus cellulaires. Par conséquent, l'inhibition de leur activité est un moyen très utile pour comprendre la physiologie normale de la cellule et pour le traitement des maladies chez l'homme. L'inhibition des facteurs de transcription bZIP peut être accomplie en utilisant des protéines de type dominant négatif qui ciblent leurs domaines de liaison à l'ADN ou en utilisant des glissières de leucine de haute affinité qui empêchent la formation de dimères. Dans la présente étude, nous avons combiné les deux approches pour concevoir un puissant dominant négatif pour A1bZIP, une protéine bZIP du réticulum endoplasmique régulée par le stress du RE. Le double inhibiteur AZM15N se compose d'une hélice amphipathique acide qui cible le domaine de liaison à l'ADN d'A1bZIP rattachée, en N-terminal, à une glissière de leucine ayant une affinité accrue pour la glissière de leucine d'A1bZIP. Bien que l'hélice acide et la glissière de leucine modifiée aient été capables d'inhiber l'activité d'A1bZIP séparément, AZM15N était plus puissant que chaque inhibiteur seul. Il est important de remarquer qu'AZM15N était plus sélectif qu'A1bZIP dans ses interactions avec les autres protéines de la sous-famille de CREB3. Les résultats de cette étude suggèrent que le ciblage des deux domaines de protéines bZIP peut être une approche utile pour concevoir des inhibiteurs pour les facteurs de transcription bZIP.

## 2. Abstract

bZIP transcription factors play important roles in multiple cellular processes. Consequently, inhibiting their activity is useful both for understanding physiology and for treating human disease. Inhibition of bZIP transcription factors can be accomplished using dominant negative proteins that target their DNA-binding domains or using high-affinity leucine

zipper that prevent dimer formation. In the present study, we combined both approaches to design a potent inhibitor of AIBZIP, an endoplasmic reticulum-bound, stress-regulated bZIP protein. The dual inhibitor AZM15N consists of an acidic amphipathic helix that targets the DNA-binding domain of AIBZIP, appended to the N-terminus of a leucine zipper with enhanced affinity for the leucine zipper of AIBZIP. Although both the acidic helix and the modified leucine zipper were capable of inhibiting AIBZIP activity separately, AZM15N was more potent than either inhibitor alone. Importantly, AZM15N was more selective than AIBZIP in its interactions with other CREB3-like proteins. The results of this study suggest that targeting both domains of bZIP proteins may be a useful approach to design bZIP inhibitors.

**Keywords:** AIBZIP, CREB3L4, bZIP domain, dominant negative

### 3. Introduction

Transcription factors of the bZIP (basic domain leucine zipper) superfamily play important roles in cell physiology. The human genome contains approximately 50 genes that encode bZIP transcription factors which include Activating Transcription Factors (ATF), cAMP Response Element Binding proteins (CREB), CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBP), Jun and Fos. These proteins bind to DNA as homodimers or heterodimers to activate or repress gene transcription. The structural motif that distinguishes these transcription factors from other classes of transcription factors is the bZIP domain which consists of a basic region (positively charged amino acids) adjacent to a leucine zipper (described below). This domain fulfills two essential functions: the basic region interacts with the DNA response elements of target genes whereas the leucine zipper mediates transcription factor dimerization (Landschultz 1988).

Studies conducted in recent years have revealed that a subgroup of bZIP proteins is implicated in the cellular response to disruptions in endoplasmic reticulum (ER) function i.e. the ER stress response (Bailey 2007). These proteins – ATF6, CREB3 and the CREB3-like proteins AIBZIP, BBF2H7, CREBH and OASIS – are unique among bZIP proteins in that they contain transmembrane domains and localize to the ER. In the ER, these proteins

are oriented such that their C-terminal portion lies within the ER lumen whereas their N-terminal portion, which contains the transcription activation and bZIP domains of the protein, resides in the cytoplasm. The localization and transcriptional activity of these proteins are tightly controlled. In the case of ATF6, it has been established that the full-length form of ATF6 is retained in the ER via interactions between its intraluminal domain and the chaperone BiP. In cells that experience ER stress, ATF6 dissociates from BiP and is transported to the Golgi apparatus where proteases separate its N-terminal portion (the transcription factor domain) from its intraluminal domain. The transcription factor domain of ATF6 then travels to the nucleus to activate the transcription of genes that code for chaperones which function to relieve ER stress (Zhang 2004).

Although current knowledge indicates that the CREB3-related proteins can, like ATF6, be processed to their transcriptionally active forms in cells that are exposed to drugs which induce ER stress (Bailey 2007; Ben Aicha 2007), the physiological circumstances under which these transcription factors are activated are not well defined. Thus, additional work is required to determine the respective functions of ER-associated bZIP proteins in human physiology and disease. In this regard, the availability of recombinant proteins that inhibit bZIP protein activity in a dominant negative (DN) manner would constitute a powerful investigational tool that could be used in both the *in vitro* and *in vivo* settings.

The first DN inhibitors of bZIP transcription factors contained altered DNA-binding domains that functioned by forming bZIP-DN heterodimers that were incapable of binding to DNA. The simplest DN bZIP proteins contain single amino acid substitutions in their DNA-binding basic regions (Walton 1992). More sophisticated DN proteins were developed by the Vinson laboratory by replacing the basic region with an acidic amphipathic helix, a helix of negatively-charged amino acids that interacts strongly with the positively-charged basic region of its bZIP target, thereby preventing DNA binding (Ahn 1998). Such proteins have proven useful to investigate the role of bZIP proteins *in vivo* (Rozenberg 2009).

More recently, research efforts have focussed on the dimerization domain of bZIP proteins with the intent to develop peptides that bind to the leucine zipper of the targeted bZIP transcription factor with high affinity, thereby precluding the formation of transcription factor dimers. The leucine zipper consists of several repeats of seven amino acids that assemble into an amphipathic  $\alpha$ -helix. By convention, the seven positions of each heptad repeat are designated by the letters *a* to *g* (Fig. 2-1). Positions *a* and *d* are almost always occupied by hydrophobic amino acids and most *d* residues are leucine (hence the name “leucine zipper”). Compatible leucine zippers dimerize to form a parallel coiled-coil in which the *a* and *d* residues are tightly packed to form a hydrophobic core that serves as the primary dimerization interface. Charge-charge interactions between the amino acids located on opposite  $\alpha$ -helices that are closest to the hydrophobic interface (i.e. those at positions *e* and *g* of each heptad) are also thought to contribute to dimer stability (Woolfson 2005).

The objective of the present study was to develop a DN inhibitor of AIBZIP (Androgen-Induced bZIP), an ATF6-like ER stress-regulated transcription factor that is especially abundant in prostate epithelial cells and overexpressed in prostate tumours (Qi 2002; Cunha 2006; Schmidt 2006; Lévesque 2007). We initially set out to design an optimized leucine zipper that would inhibit the transcriptional activity of AIBZIP. Interestingly, we found that an even more potent inhibitor could be obtained by combining the optimized zipper with an acidic amphipathic helix. We propose that DN constructs or synthetic peptides that target both the DNA-binding and protein dimerization domains of bZIP proteins might be useful tools to inhibit bZIP protein activity.

## 4. Materials and methods

### 4.i Cell lines

LNCaP cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultured as described (Lessard 2007). Stable cell lines that conditionally express AZM15N (e.g. clone 65-12) or FHA290 (clone 74-1) were generated using the modified RheoSwitch conditional expression system vectors (Lessard 2007). The recombinant protein FHA290 consists of an amino-terminal FLAG epitope followed by an HA epitope and AIBZIP amino acids 2-290. The plasmids pRZ-AZM15N (AZM15N) and pRZ-FH290 (FHA290) also

encode the RSL1-activated RheoSwitch transcription factors, a green fluorescent protein (hrGFP) and the zeocin resistance protein. The inducing agent RSL1 was purchased from New England Biolabs.

#### **4.ii Estimation of $T_m$ values**

The bCIPA algorithm (bZIP Coiled-coil Interaction Prediction Algorithm; [www.molbiotech.uni-freiburg.de/bCIPA](http://www.molbiotech.uni-freiburg.de/bCIPA)) developed in Dr. Katja Arndt's laboratory (Mason 2006) was used to predict the melting temperature  $T_m$  values of leucine zipper dimers. These analyses were performed using the sequences of helices 1 through 6.

#### **4.iii Firefly luciferase reporter constructs and luciferase assays**

Promoter fragments were cloned into plasmid pGL3-Basic (Promega) as double-stranded oligonucleotides or PCR-amplified genomic DNA fragments. Plasmid pGL3-UPRE contains five copies of the unfolded protein response element (UPRE, 5'-TGACGTGG-3') cloned upstream of a TATA box (5'-TATATAA-3').

Cells in 3.8 cm<sup>2</sup> dishes were transfected with 1.375 µg DNA/well using Lipofectin as follows: 250 ng firefly luciferase reporter plasmid, 125 ng pRL-null (to correct for transfection efficiency), 50 ng pA3-A290HA (or other transcription factor-expressing plasmid), 50 to 500 ng of inhibitor-expressing plasmid, completed with empty pA3 vector. The culture medium was changed approximately 16 hr after transfection and the cells were harvested 24 hr later. For experiments in clone 65-12 cells (AZM15N), RSL1 (500 nM) was added to the culture medium 24 hr prior to transfection. Firefly and renilla luciferase activities were determined using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) and promoter activity was expressed as firefly luciferase/renilla luciferase values.

#### **4.iv Expression vectors**

Transcription factors and their inhibitors were expressed using plasmid pcDNA3 (Invitrogen). All of the expressed proteins contain a C-terminal HA epitope (YPYDVPDYASL) that is separated from the protein coding sequence by a short linker (e.g. SRGP). Plasmids pA3-A290HA, pA3-B366HA, pA3-L228HA, pA3-H316HA and

pA3-O372HA encode the N-terminal fragments of AlbZIP (aa 1-290), BBF2H7 (aa 1-366), CREB3 (aa 1-228), CREBH (aa 1-316) and OASIS (aa 1-372), respectively.

The modified leucine zippers (M3, M4, etc.) were expressed as fusions to the activation domain (aa 2-100) of AlbZIP as depicted in Fig. 2-2B. Each zipper (aa 242-283 of AlbZIP) is preceded by the amino acids MEY where E and Y are the residues that separate the basic region of AlbZIP from its leucine zipper (Fig. 2-1C). Each zipper is followed by AlbZIP aa 284-290 (IAQTSNK), the linker SRAA(GGGGS)<sub>3</sub>, AlbZIP aa 2-100 (the activation domain), the linker SRGP, and the HA epitope. The corresponding plasmids are designated pA3-Mnn-AD.

The acidic amphipathic extension contained in DNZIP, DNZIPnls, AZM15 and AZM15N has been described previously (Ahn 1998). It consists of an N-terminal FLAG epitope (MDYKDDDDK),  $\phi$ 10 protein sequence (MASMTGGQQMGRD) and the acidic  $\alpha$  helix (PDLEQQLEELAQENEELEKEAEELEQELAE). The last three residues of the acidic extension (LAE) occupy positions *a*, *b* and *c* of the first helix of the AlbZIP and M15 leucine zippers. DNZIPnls (Fig. 2-3B) and AZM15N (Fig. 2-4B) contain two copies of the SV40 large T antigen nuclear localization signal (DPKKKRKV). Sequence details are available upon request.

#### 4.v Immunoblotting

To confirm protein expression in luciferase assays, separate wells of LNCaP cells in 28.0 cm<sup>2</sup> dishes were transfected with 6  $\mu$ g of expression vector/dish using Lipofectin. The culture medium was changed approximately 16 hr after transfection and the cells were harvested 24 hr later. Whole-cell extracts (6M urea, 1% SDS and 20 mM Tris pH 6.8) were resolved on 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose. HA-tagged transcription factors and inhibitors were detected using rabbit polyclonal anti-HA Y-11 antibody (Santa Cruz) and the proteins of interest were revealed using a chemiluminescent detection system (Pierce) with the appropriate secondary antibody.

#### **4.vi Immunofluorescence**

LNCaP cells in 9.6 cm<sup>2</sup> dishes were transfected with 2 µg of pA3-AZM15 or pA3-AZM15N/well using Lipofectin. The culture medium was changed approximately 16 hr after transfection. One day later, cells were fixed in 10% formalin solution for 1 hr, then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in TBS (Tris buffered saline; 15 min at RT) and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 15 min at RT). Cells were blocked for 1 hr in 2% fat-free milk and then incubated with a rabbit polyclonal anti-HA Y-11 antibody (1:1000) (Santa Cruz) O/N at 4°C. After the first antibody incubation, cells were incubated with Alexa 488 fluorophore-labeled goat anti-rabbit IgG. Cover slips were mounted on slides, visualized with a fluorescence microscope and images were captured by a digital camera (Leica DC 300 F).

#### **4.vii Co-immunoprecipitation**

For co-immunoprecipitation experiments, cells that conditionally express AZM15N or FHA290 were transiently transfected with plasmids that express HA epitope-tagged processed forms of bZIP proteins. The culture medium was changed approximately 16 hr after transfection. Cells were treated with the inducing agent RSL1 (500 nM) or vehicle for 24 hr. 48 hr after transfection, cells were collected and cell pellets were suspended in IP buffer (TNES: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) NP40 and complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)) for 1 hr at 4°C on an orbital shaker. The insoluble material was recovered by centrifugation and the supernatant was transferred into new tubes. Soluble fractions were pre-cleared with 20 µl of protein A sepharose beads (50 % slurry) for 4 hr at 4°C on an orbital shaker. Beads were discarded by centrifugation at 3000 rpm for 3 min and supernatant protein concentration was quantified using the DC Protein Assay (Bio-Rad). Cell lysates were incubated with anti-FLAG agarose resin overnight at 4°C on an orbital shaker (Promega). The following day, the beads were recovered by centrifugation and washed three times with 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1% NP40 buffer. Proteins were eluted with FLAG peptide according to the manufacturer instructions (Promega), boiled in 2X sample loading buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM DTT and 0.1% bromophenol blue), separated on 10% SDS-polyacrylamide gel and analyzed by immunoblotting.

## 5. Results

### 5.i *In silico* optimization of the A**IbZIP** leucine zipper

The leucine zipper of CREB3-like proteins is composed of six heptad repeats that we will refer to as H1 to H6 (Fig. 2-1A). Fifteen of the 42 amino acids that comprise these zippers are perfectly conserved in all five proteins. Of these fifteen residues, thirteen are found in H3 to H6 and more than half (9 of 15) are located in the hydrophobic core. Because we assumed that the fifteen conserved residues were important for dimer formation, we did not mutate the corresponding positions of A**IbZIP** with the exception of the valine at position *a* in H4.

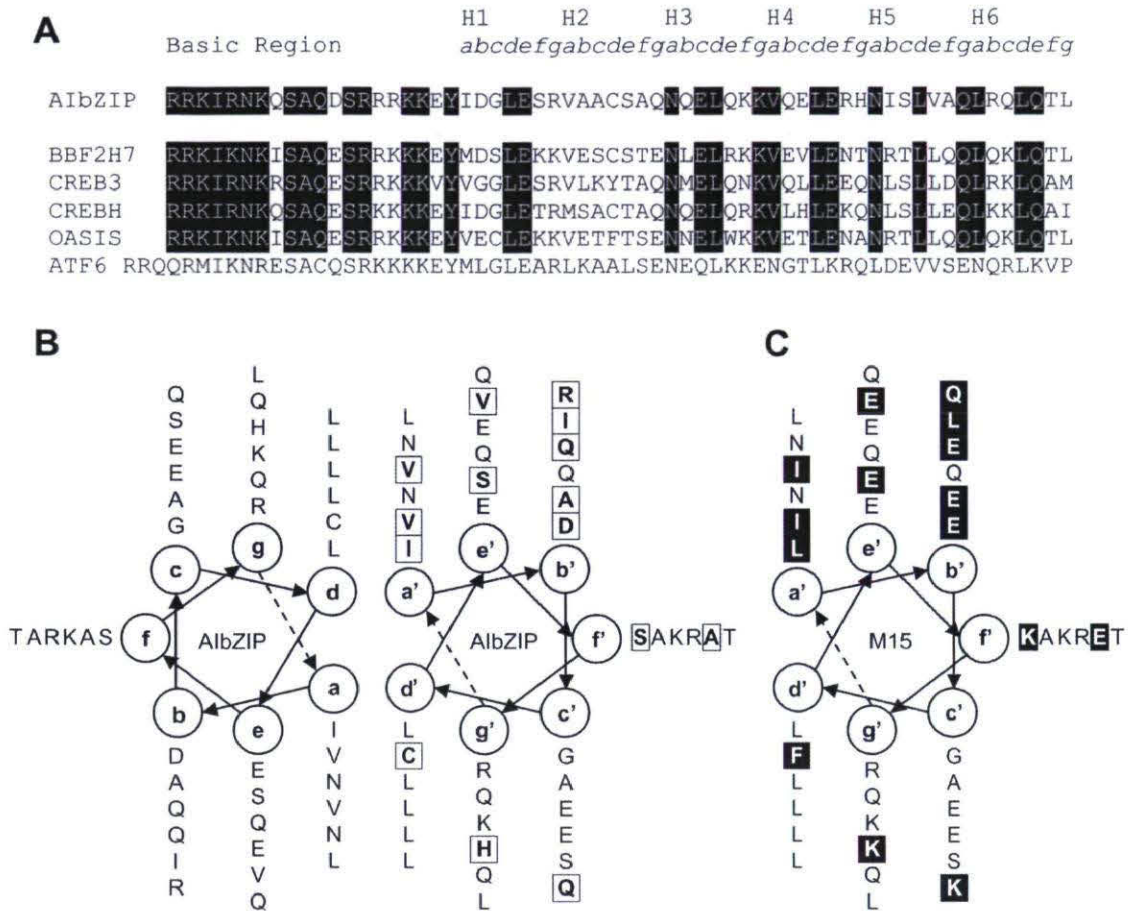
The protein-protein interactions that are implicated in coiled-coil formation are more easily visualized when leucine zippers are represented as parallel helical wheels (Fig. 2-1B). Based on this representation of the A**IbZIP** homodimer, we intuitively created a large series of leucine zipper variants containing single or multiple amino acid substitutions. To predict which of the theoretical zippers we had designed might possess increased affinity for the wild-type A**IbZIP** zipper, we estimated the melting temperature ( $T_m$ ) of each modified zipper-A**IbZIP** zipper coiled-coil using the bCIPA (**bZIP** **C**oiled-coil **I**nteraction **P**rediction **A**lgorithm) algorithm developed by the Arndt laboratory (Mason 2006). The  $T_m$  data for fourteen representative theoretical zipper peptides are presented in Table 1. According to the algorithm, the  $T_m$  of the wild-type A**IbZIP** homodimer is 71°C. Single or double amino acid substitutions produced 11-12°C increases in  $T_m$  (see M3, M4 and M9) whereas  $T_m$ s approximating 90°C were attained by combining seven or nine amino acid substitutions (see M10 and M11). The highest  $T_m$  (100°C) was achieved with mutant M15 by making a total of 16 amino acid substitutions, mostly at positions *a*, *b* and *e*. A helical wheel representation of the M15 mutant is presented in Fig. 2-1C.



Table 1

Zipper	H1	H2	H3	H4	H5	H6	$T_m$ (°C)	
	<i>abc</i>	<i>def</i>	<i>gabc</i>	<i>defg</i>	<i>abcde</i>	<i>fgabcde</i>	AibZIP	Homo
AibZIP	IDG <u>LES</u> RVAACSAQ <u>NOEL</u> QKKVQELERHNI <u>SLVAQLRQL</u> QTL						71	71
M1	<b>L</b> DGLES <b>R</b> I <b>A</b> A <b>F</b> SAQNQELQKK <b>I</b> QELERHNI <u>SLVAQLRQL</u> QTL						75	85
M2	<b>V</b> DGLES <b>R</b> V <b>A</b> A <b>F</b> SAQNQELQKKVQELERHNI <u>SLVAQLRQL</u> QTL						73	74
M3	IDGLES <b>R</b> V <b>A</b> A <b>C</b> <b>E</b> AQNQELQKKVQELERHNI <u>SLVAQLRQL</u> QTL						82	93
M4	IDGLES <b>R</b> V <b>A</b> A <b>C</b> <b>E</b> AQNQELQKKVQELER <b>R</b> NI <u>SLVAQLRQL</u> QTL						83	94
M5	I <b>E</b> GL <b>S</b> R <b>V</b> <b>E</b> ACSAQNQELQKK <b>V</b> <b>E</b> ELERH <b>N</b> <b>R</b> <u>SLVAQLRQL</u> QTL						76	82
M6	<b>L</b> DGLES <b>R</b> I <b>A</b> A <b>C</b> SAQNQELQKKVQELERHNI <u>SLVAQLRQL</u> QTL						72	80
M7	<b>V</b> DGLES <b>R</b> V <b>A</b> A <b>C</b> SAQNQELQKKVQELERHNI <u>SLVAQLRQL</u> QTL						70	70
M8	I <b>E</b> GL <b>S</b> R <b>V</b> A <b>A</b> C <b>S</b> AQNQELQKKVQELERHNI <u>SLVAQLRQL</u> QTL						73	76
M9	IDGLES <b>R</b> V <b>A</b> A <b>C</b> <b>E</b> AQNQELQKKVQELERHNI <u>SLVAQLR</u> <b>R</b> LQTL						82	92
M10	<b>L</b> DGLES <b>R</b> I <b>A</b> A <b>F</b> <b>E</b> AQNQELQKK <b>I</b> QELER <b>R</b> NI <u>SLVAQLR</u> <b>R</b> LQTL						87	108
M11	<b>L</b> DGLE <b>K</b> K <b>I</b> A <b>A</b> <b>F</b> <b>E</b> AQNQELQKK <b>I</b> QELER <b>R</b> NI <u>SLVAQLR</u> <b>R</b> LQTL						90	115
M12	<b>L</b> DGLE <b>K</b> K <b>I</b> A <b>A</b> <b>F</b> <b>E</b> AQNQELQKK <b>I</b> QELER <b>R</b> NI <u>SL</u> <b>E</b> QL <b>R</b> R <b>L</b> QTL						93	122
M13	<b>L</b> DGLE <b>K</b> K <b>I</b> A <b>A</b> <b>F</b> <b>E</b> AQNQELQKK <b>I</b> <b>E</b> ELER <b>R</b> NI <u>SL</u> <b>E</b> QL <b>R</b> R <b>L</b> QTL						95	125
M15	<b>L</b> E <b>G</b> L <b>E</b> <b>K</b> K <b>I</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>F</b> <b>E</b> AQNQELQKK <b>I</b> <b>E</b> ELER <b>R</b> NI <u>SL</u> <b>E</b> <b>E</b> Q <b>L</b> <b>R</b> LQTL						100	147

The sequence of the wild-type leucine zipper of AibZIP (aa 242-283) is shown above the sequences of the modified leucine zippers (M1 to M15). The heptads are numbered H1 to H6 and the residue positions in each heptad are labelled *a* to *g*. In the AibZIP sequence, the 15 residues that are conserved in all five CREB3-like proteins are underlined in bold. In the modified zippers, amino acid substitutions are shown in reverse type. The columns on the right indicate the estimated melting temperature ( $T_m$ ) values for each zipper bound to the AibZIP leucine zipper or to itself (Homo).

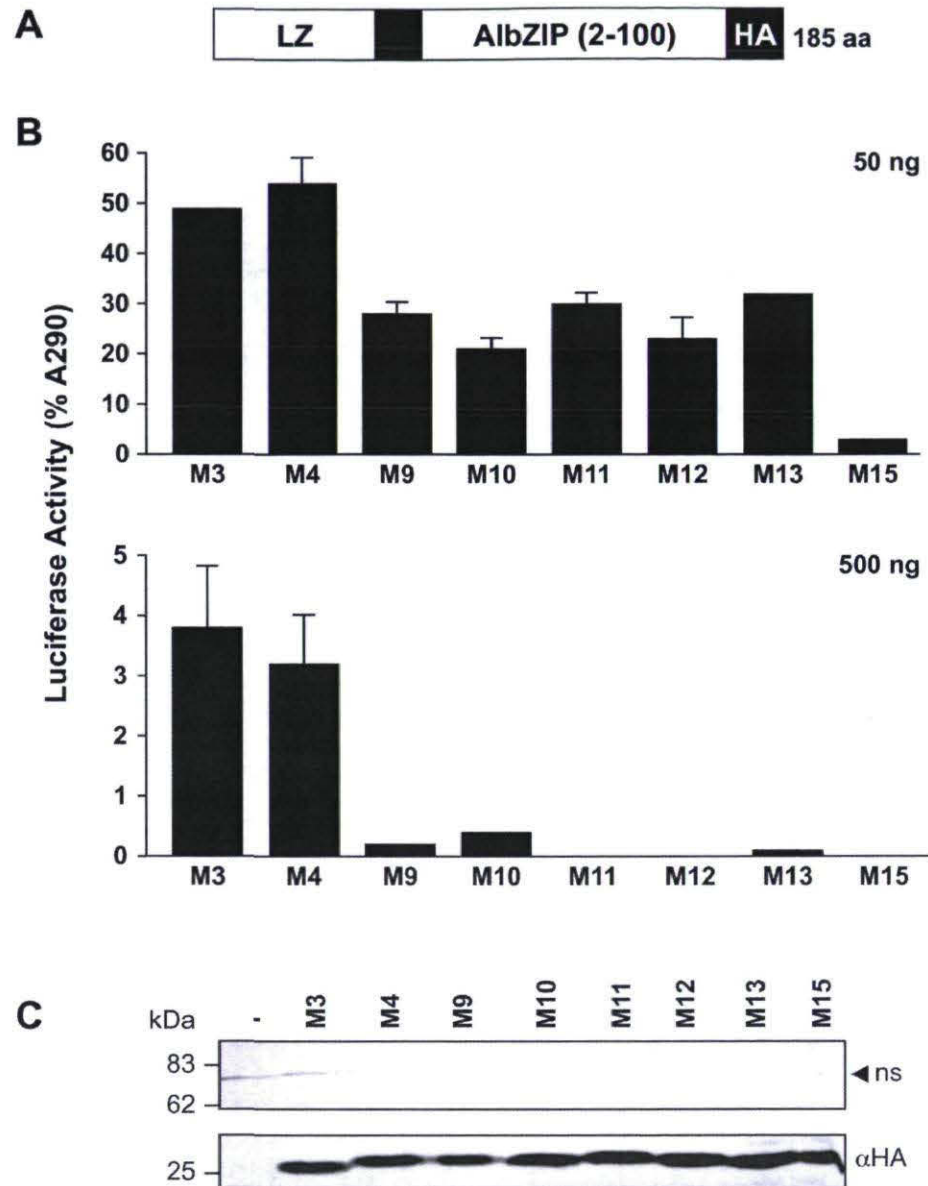


**Figure 2-1.** The AlbZIP leucine zipper. (A) Alignment of the bZIP domain of AlbZIP (aa 242-283) with the bZIP domains of BBF2H7, CREB3, CREBH, OASIS and ATF6. The six heptad repeats of the leucine zipper are labelled H1 to H6 whereas the letters *a* to *g* indicate each residue's position on the alpha helix. Residues that are perfectly conserved in AlbZIP, BBF2H7, CREB3, CREBH and OASIS are shown in reverse type (B) Helical wheel representation of an AlbZIP leucine zipper homodimer looking down the helix axis from the N- to the C-terminus. Heptad positions are labelled *a* to *g* in the molecule on the left and *a'* to *g'* in the molecule on the right. In the molecule on the right, the amino acids that were changed to create M15 are boxed and in bold type. (C). Helical wheel representation of the M15 leucine zipper. The modified amino acids are shown in bold in reverse type.

### **5.ii Optimized leucine zippers exert dominant negative activity *in vivo***

To quantify the inhibitory activity of the mutants listed in Table 1, we performed transient transfection experiments in LNCaP human prostate cancer cells. For this assay, we used an AIBZIP-responsive luciferase reporter construct that contains a multimerized unfolded protein response element (UPRE) cloned upstream of a TATA box. The plasmid expressing the N-terminal fragment of AIBZIP (hereafter referred to as A290) was transfected at a concentration of 50 ng/well whereas plasmids expressing the modified leucine zippers were transfected at 1:1 (50 ng/well) or 10:1 (500 ng/well) ratios. For practical reasons, the modified leucine zippers were expressed as fusions to the N-terminus of the activation domain of AIBZIP and contained a C-terminal HA epitope (Fig. 2-2A).

A290 produced an approximate 80-fold increase in the activity of the UPRE-luciferase reporter gene. As shown in Figure 2-2B, all of the DN constructs inhibited the transcriptional activity of A290 to varying degrees. While most of the DN constructs inhibited A290 activity by more than 99% when transfected at a 10:1 ratio, only M15 produced a comparable inhibition of A290 activity at a 1:1 ratio. Immunoblots confirmed that the stability of M15 was comparable to that of the other DN constructs (Fig. 2-2C). In view of its greater potency, M15 was selected for subsequent studies.

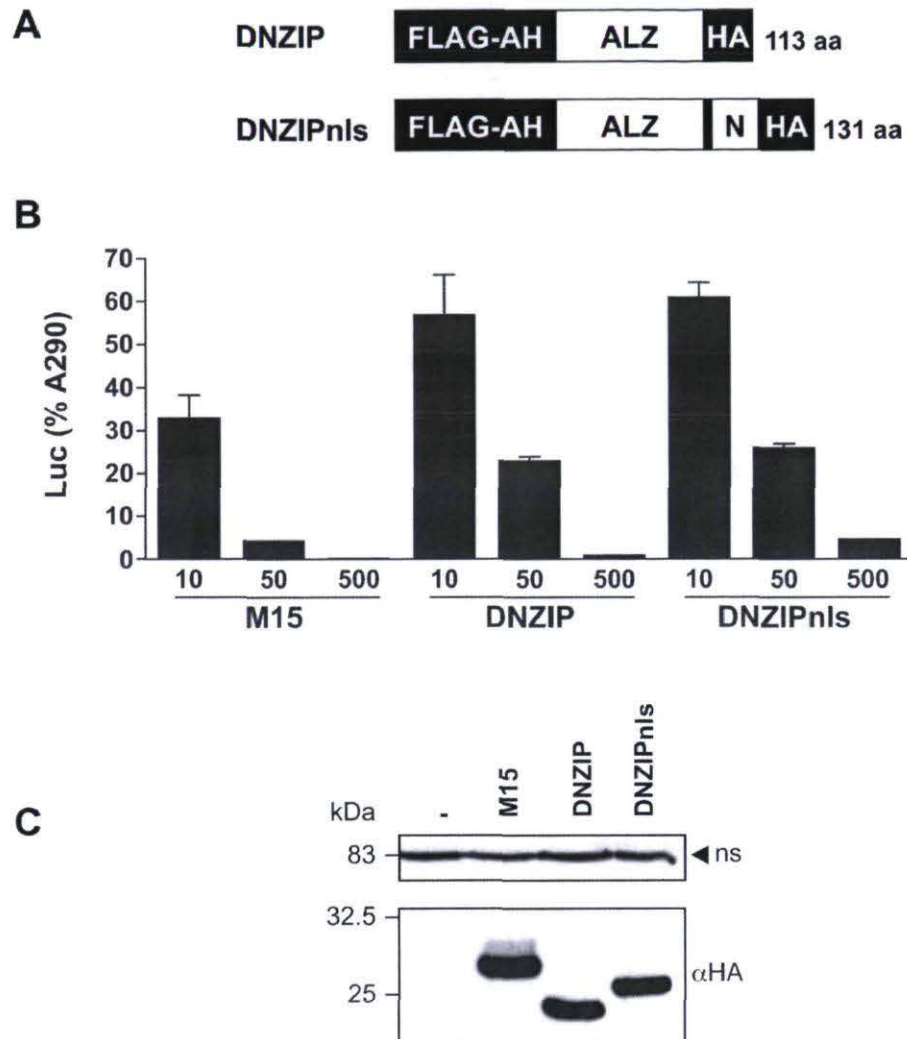


**Figure 2-2.** Dominant negative activity of optimized AlbZIP leucine zippers in LNCaP cells. (A) Schematic representation of zipper fusion proteins. Each leucine zipper (LZ) was expressed as a fusion to the activation domain of AlbZIP (aa 2-100) and a C-terminal HA epitope. The unlabelled black box corresponds to a flexible linker. (B) A UPRE-responsive luciferase reporter gene was transfected into LNCaP cells along with plasmids expressing the N-terminal fragment of AlbZIP (A290, 50 ng/well) and either 50 (top) or 500 ng/well (bottom) of the indicated zipper constructs. Firefly luciferase activity (normalized for transfection efficiency) is presented as a % of the activity obtained with A290 alone. Luciferase values are expressed as the means  $\pm$  SEM of triplicate dishes. Error bars are shown for SEM values  $\geq 2$  (top) or 0.8 (bottom). The data are representative of at least two independent experiments. (C) The leucine zipper constructs were transiently expressed in LNCaP cells and detected by immunoblotting using an anti-HA antibody. A non-specific (ns) band served as a loading control.

### **5.iii Combining optimized zippers with acidic amphipathic helices**

As mentioned previously, the Vinson laboratory created potent DN proteins (A-ZIPs) by appending acidic amphipathic extensions onto the N-terminus of the leucine zippers of bZIP proteins (Ahn 1998). Since M15 does not contain a basic region, it was of interest to compare the DN activity of M15 to that of the wild-type AlbZIP zipper fused to an acidic extension. We therefore created a recombinant protein designated DNZIP by appending the 52-residue acidic extension to the N-terminus of the wild-type AlbZIP leucine zipper (Fig. 2-3A). Note that because the last three residues of the acidic extension occupy the first three positions of the leucine zipper, the acidic extension was fused to the fourth residue of the first helix of AlbZIP. In addition, to determine if the activity of DN proteins might be further enhanced by the addition of a nuclear localisation signal, we constructed DNZIPnls, a derivative of DNZIP that contains two copies of the nuclear localisation signal of the SV40 large T antigen.

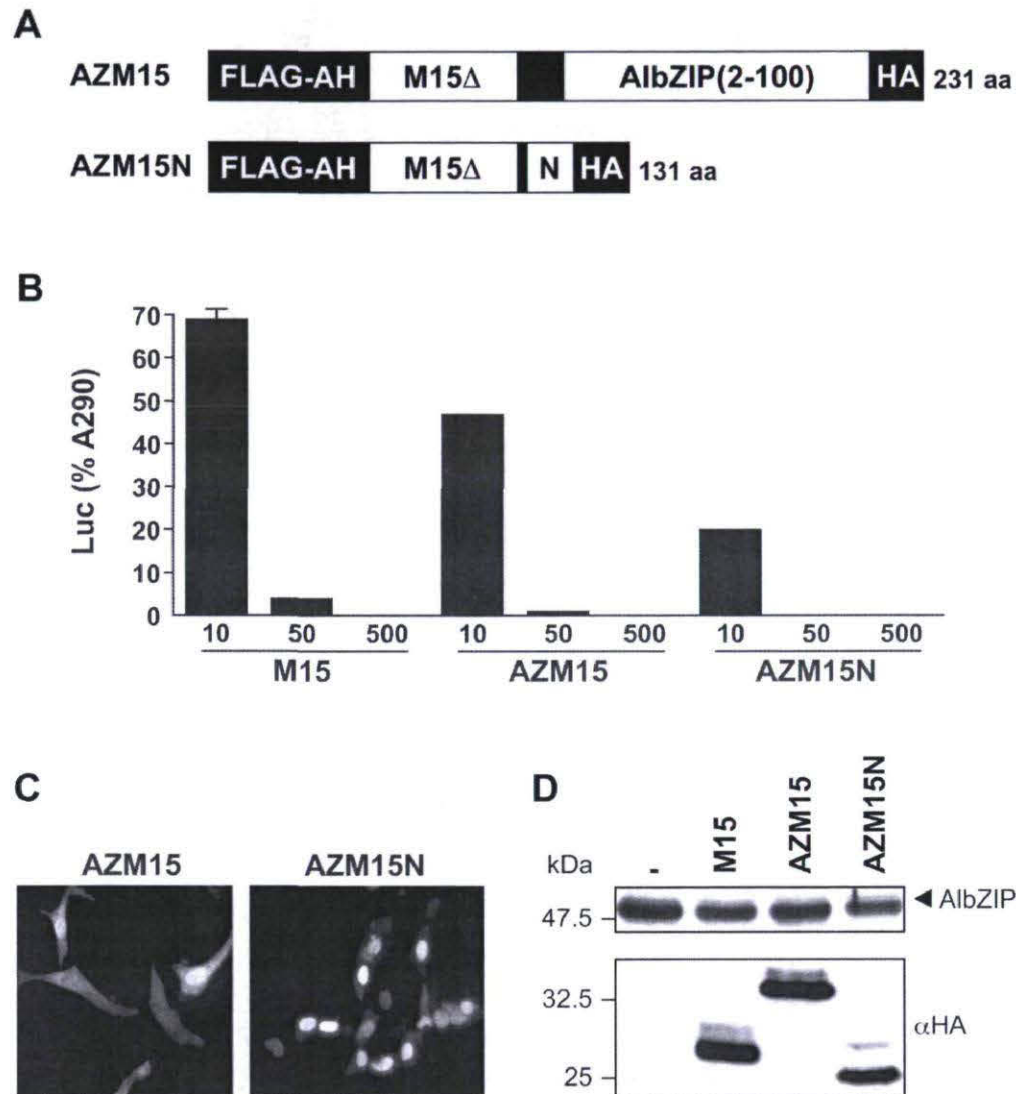
We compared the inhibitory activities of M15, DNZIP and DNZIPnls using the UPRE-luciferase reporter gene assay. For these experiments we tested three concentrations (10, 50 or 500 ng/well) of each inhibitor. As shown in Figure 2-3B, all three DN proteins inhibited A290 activity in a dose-dependent manner. However, M15 was considerably more potent than either DNZIP or DNZIPnls at low concentrations. Immunoblots confirmed that the three inhibitors were expressed at similar levels (Fig. 2-3C).



**Figure 2-3.** Dominant negative activity of the AlbZIP leucine zipper fused to an acidic amphipathic extension. (A) Schematic representation of DNZIP and DNZIPnls. The FLAG-tagged acidic amphipathic helix (FLAG-AH) was fused to the N-terminus of the AlbZIP leucine zipper (ALZ). Both proteins contain a C-terminal HA epitope. DNZIPnls contains two copies of the SV40 large T antigen nuclear localization signal (N). (B) A UPRE-responsive luciferase reporter gene was transfected into LNCaP cells along with plasmids expressing the N-terminal fragment of AlbZIP (A290, 50 ng/well) and either 10, 50 or 500 ng/well of the indicated dominant negative proteins. Firefly luciferase activity (normalized for transfection efficiency) is presented as a % of the activity obtained with A290 alone. Luciferase values are expressed as the means  $\pm$  SEM of triplicate dishes. Error bars are shown for SEM values  $\geq$  1. The data are representative of at least two independent experiments. (C) M15, DNZIP and DNZIPnls were transiently expressed in LNCaP cells and detected by immunoblotting using an anti-HA antibody. A non-specific (ns) band served as a loading control.

Given that both the optimized leucine zipper (M15) and the A-ZIP construct (DNZIP) effectively inhibited the transcriptional activity of AIBZIP, we postulated that additional gains in DN efficacy might be achieved by combining the M15 zipper with an acidic amphipathic extension. We therefore fused the 52-residue acidic extension to the fourth residue of the M15 zipper to create a recombinant protein designated as AZM15 (Fig. 2-4A). As a result of this fusion, the first three residues of the M15 zipper (Leu-Glu-Gly) were replaced by Leu-Ala-Glu. We also created a derivative of AZM15 (AZM15N) that contains two copies of the nuclear localisation signal of the SV40 large T antigen in lieu of the AIBZIP activation domain.

The inhibitory activities of AZM15 and AZM15N were tested using the previously described UPRE-luciferase reporter assay. As shown in Figure 2-4B, AZM15 produced a greater inhibition of A290 activity than M15 (55 vs 30%) at the lowest concentration. AZM15N was even more potent than AZM15 at the same dose, producing an 80% inhibition of A290 activity. AZM15 and AZM15N were slightly more potent than M15 at the intermediate concentration whereas the three inhibitors displayed similar activities at the highest concentration. Immunofluorescence experiments performed in transiently transfected LNCaP cells confirmed that AZM15N localized exclusively to the nuclei of transfected cells whereas AZM15 displayed a slightly more diffuse (both cytoplasmic and nuclear) distribution (Fig. 2-4C). Immunoblots confirmed that the three inhibitors were expressed at similar levels (Fig. 2-4D).



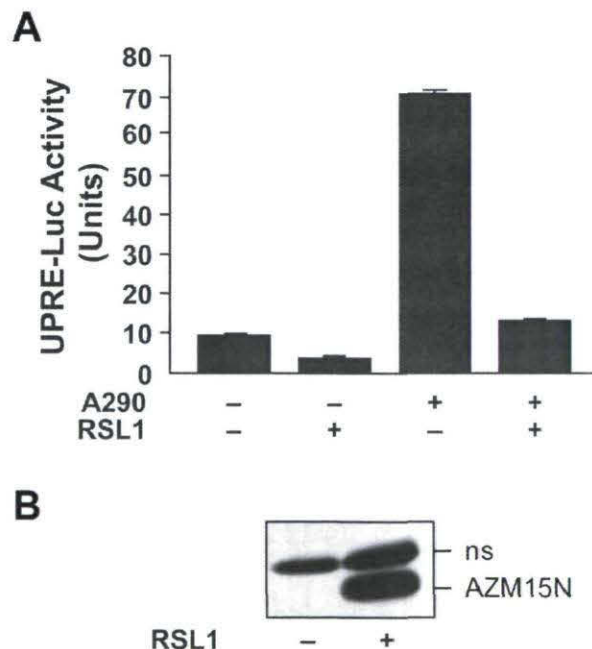
**Figure 2-4.** Dominant negative activity of the M15 leucine zipper fused to an acidic amphipathic extension. (A) Schematic representation of AZM15 and AZM15N. The FLAG-tagged acidic amphipathic helix (FLAG-AH) was fused to the N-terminus of the M15 leucine zipper (M15 $\Delta$ ). The ' $\Delta$ ' signifies that the first three codons of the M15 zipper were modified to accommodate the acidic extension (see text). Both proteins contain a C-terminal HA epitope. AZM15 contains the activation domain of AlbZIP whereas AZM15N contains two copies of the SV40 large T antigen nuclear localization signal (N). (B) A UPRE-responsive luciferase reporter gene was transfected into LNCaP cells along with plasmids expressing the N-terminal fragment of AlbZIP (A290, 50 ng/well) and either 10, 50 or 500 ng/well of the indicated dominant negative proteins. Firefly luciferase activity (normalized for transfection efficiency) is presented as a % of the activity obtained with A290 alone. Luciferase values are expressed as the means  $\pm$  SEM of triplicate dishes. Error bars are shown for SEM values  $\geq$  2. The data are representative of at least two independent experiments. (C) AZM15 and AZM15N were transiently expressed in LNCaP cells and



visualized by indirect immunofluorescence using an anti-HA antibody followed by a secondary antibody coupled to Alexa 488. (D) M15, AZM15 and AZM15N were transiently expressed in LNCaP cells and detected by immunoblotting using an anti-HA antibody. A non-specific (ns) band served as a loading control.

#### 5.iv Inhibitory activity of AZM15N in stable cell lines

To evaluate the potential usefulness of AZM15N in long-term *in vitro* and *in vivo* applications, we used the modified RheoSwitch expression system to generate stable cell lines that conditionally produce AZM15N (Lessard 2007). The RheoSwitch system relies on a synthetic nonsteroidal ligand (RSL1) to induce the production of the desired protein. As shown in Figure 2-5, the production of AZM15N in these cells was strictly dependent upon the addition of the inducing agent RSL1. To test AZM15N we transiently transfected the UPRE luciferase reporter construct and a plasmid expressing the transcription factor domain of AIBZIP (A290). As shown in Figure 2-5A, transiently expressed A290 stimulated the UPRE-luciferase reporter and this effect was inhibited by approximately 94% when AZM15N production was induced with RSL1. Similar results were obtained in several independent clones (data not shown).



**Figure 2-5.** Inhibitory activity of AZM15N in a stable cell line. (A) An LNCaP cell line that conditionally expresses AZM15N (clone 65-12) was transiently transfected with a UPRE-responsive luciferase reporter gene along with a plasmid expressing the N-terminal fragment of AIBZIP (A290HA, 50 ng/well) as indicated. Cells were treated with the

inducing agent RSL1 (500 nM) or the corresponding vehicle as indicated. Firefly luciferase activity (normalized for transfection efficiency) is expressed as the means  $\pm$  SEM of triplicate dishes. Error bars are shown for SEM values  $\geq$  0.1. The data are representative of at least two independent experiments. (B) AZM15N was detected in whole-cell extracts of control or RSL1-treated clone 65-12 cells by immunoblotting using an anti-HA antibody. A non-specific (ns) band served as a loading control.

### 5.v Specificity of AZM15N

One underlying concern related to the design of DN proteins that target bZIP transcription factors is the issue of target specificity. A previous study using peptide-peptide interaction assays indicated that the leucine zipper of A1bZIP could potentially form heterodimers with other CREB3-like proteins but these interactions have not been validated in a biological setting (Newman 2003). We therefore evaluated the ability of A1bZIP to interact with CREB3-like proteins in co-immunoprecipitation experiments. Cells that conditionally express FLAG epitope-tagged A290, a recombinant equivalent of the stress-activated form of A1bZIP, were transfected with plasmids that express HA epitope-tagged forms of stress-activated CREB3, BBF2H7, CREB-H and OASIS. The protein dimers were recovered using an anti-FLAG antibody and detected by immunoblotting using an anti-HA antibody. As shown in Figure 2-6A, A290 interacted with CREB-H, OASIS and BBF2H7, but not with CREB3. To assess the specificity of AZM15N, similar co-immunoprecipitation experiments were performed in one of the cell lines that conditionally expresses AZM15N. As shown in Figure 2-6B, AZM15N co-immunoprecipitated with the recombinant processed forms of A1bZIP, CREB-H and BBF2H7 but not with OASIS or CREB3. Based on this assay, AZM15N displays more interaction specificity than the native A1bZIP protein. Because CREB-H is only expressed in liver cells and because BBF2H7 is not known to be co-expressed with A1bZIP in prostate epithelial cells, these results indicate that AZM15N could be a potent and specific inhibitor of A1bZIP.



activity consisted in replacing the basic region of a given bZIP protein with an acidic region so as to prevent DNA binding (Ahn 1998). More recently, bioinformatics approaches have been used to optimize the amino acid composition of the leucine zipper to obtain peptides that bind to the target protein with high affinity, thereby precluding the interaction of a given bZIP protein with its natural binding partners (Mason 2006; Grigoryan 2009).

In this report, we show that potent inhibitors of bZIP transcription factors can be obtained by combining both approaches. We used the bCIPA algorithm to empirically design variants of the A**I**bZIP leucine zipper that associate with the wild-type protein to form coiled-coils with high melting temperatures. The M15 construct contains 16 amino acid substitutions compared to the wild-type protein and the theoretical  $T_m$  of the M15-A**I**bZIP dimer is 29°C higher than that of the A**I**bZIP homodimer. Transient expression experiments confirmed that M15 is a potent inhibitor of the transcriptional activity of A**I**bZIP. We also found that an A-ZIP derivative of A**I**bZIP can function as a DN inhibitor of A**I**bZIP. More importantly, a construct containing the A-ZIP extension fused to M15 proved an even more potent inhibitor of A**I**bZIP.

Because bZIP proteins typically form homodimers, we were concerned that the DN activity of the modified leucine zippers might be compromised by their tendency to form homodimers (e.g. M15-M15). As a matter of fact, the  $T_m$  values of the homodimers were generally higher than those of the corresponding A**I**bZIP-DN heterodimers (Table 1). Mutants M10 to M15 seemed particularly prone to homodimer formation as their homodimer  $T_m$  values were 21 to 47°C higher than the corresponding heterodimer  $T_m$  values. Although we cannot exclude the possibility that the M constructs did associate *in vivo*, the formation of such homodimers did not preclude the formation of heterodimers with the target protein.

The method we used to design the modified A**I**bZIP leucine zipper was rather unsophisticated. While we succeeded in designing an inhibitor that displayed increased affinity for the A**I**bZIP leucine zipper as well as a more selective interaction profile compared to A**I**bZIP, it would certainly be of interest to see if even more potent and

specific inhibitors of AlbZIP could be obtained using more recently developed computational methods. For example, the CLASSY (cluster expansion and linear programming-based analysis of specificity and stability) method developed by Grigoryan and collaborators was designed to maximize affinity without sacrificing specificity (Grigoryan 2009). Using this design procedure, the authors were able to design highly specific peptides that interacted with the bZIP domain of Fos.

AlbZIP is a member of the CREB3 family of bZIP proteins that are believed to function in the cellular response to ER stress (Bailey 2007; Labrie 2008). CREB3-like proteins are particularly relevant to human health since ER stress is increasingly linked to a variety of human diseases including diabetes, neurological disorders, and cancer (Lin 2008). However, CREB3-like proteins have not been extensively studied and their respective roles in ER homeostasis are not well defined. In this regard, dual inhibitors such as AZM15N may prove useful tools in deciphering the physiological roles and potential therapeutic value of these proteins.

### **Acknowledgments**

This work was supported by a grant from the Prostate Cancer Research Foundation of Canada to CL.

## References

1. Ahn, S., M. Olive, et al. (1998). "A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos." Mol Cell Biol **18**(2):967-77.
2. Bailey, D. and P. O'Hare (2007). "Transmembrane bZIP transcription factors in ER stress signaling and the unfolded protein response." Antioxid Redox Signal **9**(12): 2305-21.
3. Ben Aicha, S., J. Lessard, et al. (2007). "Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AlbZIP/CREB3L4 in prostate cells." Physiol Genomics **31**(2): 295-305.
4. Cunha, A. C., B. Weigle, et al. (2006). "Tissue-specificity of prostate specific antigens: comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues." Cancer Lett **236**(2): 229-38.
5. Grigoryan, G., A. W. Reinke, et al. (2009). "Design of protein-interaction specificity gives selective bZIP-binding peptides." Nature **458**(7240): 859-64.
6. Labrie, C., J. Lessard, et al. (2008). "Androgen-regulated transcription factor AlbZIP in prostate cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **108**(3-5): 237-44.
7. Landschulz, W. H., P. F. Johnson, et al. (1988). "The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins." Science **240**(4860): 1759-64.

8. Lessard, J., S. B. Aicha et al. (2007). "Characterization of the RSL1-dependent conditional expression system in LNCaP prostate cancer cells and development of a single vector format." Prostate **67**(8): 808-19.
9. Levesque, M. H., M. El-Alfy, et al. (2007). "Evaluation of AIBZIP and Cdc47 as markers for human prostatic diseases." Urology **69**(1): 196-201.
10. Lin, J. H., P. Walter, et al. (2008). "Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis." Annu Rev Pathol **3**: 399-425.
11. Mason, J. M., M. A. Schmitz, et al. (2006). "Semirational design of Jun-Fos coiled coils with increased affinity: Universal implications for leucine zipper prediction and design." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(24): 8989-94.
12. Newman, J. R. and A. E. Keating (2003). "Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays." Science **300**(5628): 2097-101.
13. Qi, H., C. Fillion, et al. (2002). "AIBZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells." Cancer Res **62**(3): 721-33.
14. Rozenberg, J., V. Rishi, et al. (2009). "Inhibition of CREB function in mouse epidermis reduces papilloma formation." Mol Cancer Res **7**(5): 654-64.
15. Schmidt, U., S. Fuessel, et al. (2006). "Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer." Prostate **66**(14): 1521-34.
16. Walton, K. M., R. P. Rehfuss, et al. (1992). "A dominant repressor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-regulated enhancer-binding protein activity

inhibits the cAMP-mediated induction of the somatostatin promoter in vivo." Mol Endocrinol **6**(4): 647-55.

17. Woolfson, D. N. (2005). "The design of coiled-coil structures and assemblies." Adv Protein Chem **70**: 79-112.
18. Zhang, K. and R. J. Kaufman (2004). "Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **279**(25): 25935-8.



## Chapitre 3 : Protéines qui interagissent avec la forme pleine longueur d'AlbZIP

Hejer Boutej, Sonia Djebbar, Andréa Fournier, Claude Labrie

Il sera question dans ce chapitre des partenaires de la forme pleine longueur d'AlbZIP. Ces résultats sont le fruit d'une grande charge de travail. Ma contribution à ce travail est majeure puisque j'ai réalisé toutes les mises au point qui ont permis d'obtenir une méthode d'immunopurification sur mesure pour AlbZIP. De plus, j'ai participé à toutes les expériences de cette étude avec, bien évidemment, la précieuse collaboration de mes collègues.

### 1. Introduction

Une des fonctions principales du réticulum endoplasmique (RE) consiste à assurer la maturation des protéines nouvellement synthétisées qui seront par la suite sécrétées par la cellule ou intégrées dans ses membranes (Nicchitta 2002). Dans des conditions normales, le RE est capable de maintenir l'équilibre entre la demande en protéines bien repliées et la capacité d'en produire. Or, la perturbation de l'homéostasie de la cellule affecte cet équilibre et provoque l'accumulation de protéines mal repliées. Heureusement, la cellule est équipée de systèmes d'adaptation qui sont capables de réajuster le métabolisme aux changements de l'environnement comme, par exemple, l'UPR (*unfolded protein response*) (Kaufman, Scheuner et al. 2002; Sannerud and Annaert 2009). Chez les mammifères, l'UPR est la réponse au stress dû à l'accumulation de protéines mal repliées qui se manifeste par une répression de la synthèse protéique, une activation de la production des chaperonnes et une augmentation de la dégradation des protéines mal repliées. ATF6 (*activating transcription factor 6*) est l'un des 3 effecteurs de cette réponse. Ce facteur de transcription bZIP, membre de la famille ATF/CREB (*Activating transcription factor/cAMP response element binding protein*), présente une expression ubiquitaire. La forme pleine longueur d'ATF6 est attachée au réticulum endoplasmique par son domaine transmembranaire et, sous sa forme inactive, elle lie la chaperonne BiP/GRP78

(*immunoglobulin heavy chain-binding protein*) via son domaine C-terminal projeté dans la lumière du RE. En réponse au stress du réticulum, ATF6 se détache de BIP et lie, via son domaine N-terminal, le complexe COPII (*coat protein complex*) qui va l'escorter vers l'appareil de golgi où elle va subir un clivage par les protéases S1P (*Site-1 protease*) et S2P (*Site-2 protease*) (Schindler and Schekman 2009). Le mécanisme de régulation d'ATF6, appelé mécanisme RIP (*regulated intramembrane proteolysis*) est très bien caractérisé dans la littérature. Il s'agit d'un mécanisme qui permet de libérer ou d'activer des facteurs de transcription ou des protéines de signalisation à partir de précurseurs inactifs suite à leur transport vers d'autres organites où se produira leur protéolyse (Sannerud and Annaert 2009). D'autres facteurs de transcription localisés au niveau du RE sont aussi régulés par ce mécanisme. Néanmoins, ils sont sollicités dans d'autres contextes cellulaires. SREBP (*Sterol response element binding protein*) est le régulateur principal de l'homéostasie des lipides. Lorsque les niveaux du cholestérol sont élevés, le complexe SREBP-SCAP-INSIG reste attaché à la membrane du RE via les deux domaines hydrophobes de SREBP. Suite à une baisse du niveau du cholestérol, la protéine INSIG (*insulin induced gene*) se détache de ce complexe permettant à la protéine SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) d'escorter SREBP vers l'appareil de golgi pour subir un clivage protéolytique par les mêmes protéases préalablement citées (Bengoechea-Alonso and Ericsson 2007).

Dans le cas d'ATF6 ou de SREBP, la protéine active libérée par protéolyse est transportée vers le noyau où elle va réguler l'expression de ses gènes cibles en liant des éléments de réponse au niveau de leurs promoteurs. Dans le cadre de ce chapitre, nous nous intéresserons principalement à ce qui se passe au niveau du RE.

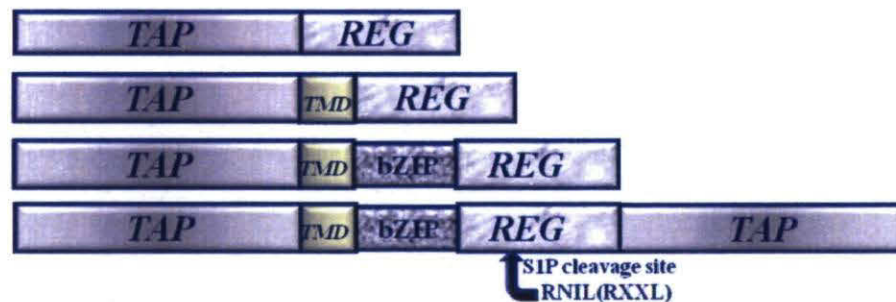
Nous savons aujourd'hui qu'AIBZIP (*androgen-induced bZIP*) fait partie d'une sous-famille de bZIP impliquée dans le stress du RE et régulée par le mécanisme RIP (Ben Aicha, Lessard et al. 2007). D'ailleurs, la perturbation des niveaux du calcium active son transport vers l'appareil de golgi et par conséquent sa protéolyse (Ben Aicha, Lessard et al. 2007). De plus, des expériences réalisées par l'équipe du Dr Nojima ont montré qu'AIBZIP de souris est une protéine transmembranaire de type II (Nagamori, Yabuta et al. 2005). En effet, la protéine AIBZIP pleine longueur est ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique via son domaine transmembranaire et orientée de sorte que son domaine C-terminal se trouve dans la lumière du RE alors que son domaine N-terminal est projeté dans

le cytoplasme (Nagamori, Yabuta et al. 2005). A l'image de SREBP et ATF6, nous pensons qu'une protéine de nature indéterminée lierait le domaine régulateur d'AlbZIP. Nous pensons aussi que cette protéine pourrait jouer le rôle de détecteur de stress et qu'elle pourrait aussi escorter AlbZIP vers l'appareil de golgi ou la confier à un autre complexe protéique qui va se charger de son transport.

Au cours de mes études doctorales j'ai, dans un premier temps, tenté d'identifier les protéines qui interagissent avec la protéine AlbZIP quand celle-ci se trouve au réticulum endoplasmique et ce pour comprendre l'environnement dans lequel elle baigne et qui participe à sa régulation suite à un stress. Pour ce faire, j'ai utilisé le système de purification par affinité en tandem appelé TAP (*Tandem affinity purification*). C'est un système très bien caractérisé chez la levure mais qui mérite beaucoup de mises au point chez les mammifères. L'avantage principal de ce système est sans doute la diminution de la contamination grâce à deux purifications successives permettant au final de récupérer des complexes protéiques non dénaturés. Toutefois, une bonne application de cette méthode de purification dépend étroitement d'une mise au point optimale de la technique suivant les caractéristiques de la protéine à étudier. Dans le cas d'AlbZIP, plusieurs points importants étaient à considérer entre autre la solubilité de cette protéine transmembranaire et son clivage spontané suite à la surexpression.

Dans un premier temps, j'ai utilisé le système développé par l'équipe de Séraphin (Puig, Caspary et al. 2001). Cette méthode de purification emploie une cassette composée de deux domaines de liaison aux IgG (*staphylococcus aureus protein A domain*) suivi d'un domaine de liaison à la calmoduline. Les deux sont séparés par un site de clivage de la protéase TEV (*Tobacco Etch virus*). En gros, les protéines associées à AlbZIP sont purifiées par chromatographie une première fois à l'aide d'une résine couplée aux IgG et une deuxième fois à l'aide d'une résine couplée à la calmoduline et ce en présence du calcium. Le premier éluat est obtenu par clivage suite à l'ajout de la protéase TEV. Quant au deuxième, il est obtenu par ajout du chélateur de calcium EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*). Durant les premières tentatives, cette cassette a été sous-clonée en fusion avec différentes portions d'AlbZIP. Ces tentatives étaient nombreuses et les nommer pourra donner une petite idée de la charge de travail qui a été allouée afin de trouver les meilleures conditions de purification. J'ai commencé mes tests de purification avec le domaine C-terminal d'AlbZIP

mais par peur que cette protéine de fusion ne se comporte pas comme la protéine naturelle j'ai alors ajouté le domaine transmembranaire pour avoir la même localisation subcellulaire. J'ai aussi utilisé la portion d'A1bZIP comprise entre les acides aminés 203 et 395 qui correspond au domaine bZIP, au domaine transmembranaire et au domaine C-terminal. De plus, la cassette TAP a été fusionnée en N-terminal seulement ou en N et en C-terminaux selon le cas (Figure 3-1). Évidemment chaque fusion a été transfectée dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP et a constitué un clone stable inducible. Malheureusement, toutes les tentatives de purification utilisant ces clones stables ont échouées. Mise à part une élution finale à rendement très faible et par conséquent difficilement analysable par spectrométrie de masse, il y avait une forte contamination des échantillons par les kératines qui sans doute masquait l'entrée des peptides dans le spectromètre. Considérant tous les points importants qui ont contribué à l'échec de mes premières tentatives, j'ai décidé dans un deuxième temps de choisir une méthode spécialement ajustée pour la protéine A1bZIP. Cette méthode qui sera décrite dans la section «Matériels et méthodes» résout les problèmes de solubilité, de clivage spontané, de contamination par la kératine et de rendement faible.



**Figure 3-1** : Représentation schématique des différentes protéines de fusion utilisées pour la purification des partenaires de la forme pleine longueur d'A1bZIP. TAP : cassette composée de deux domaines de liaison des IgG, un site de clivage de la TEV (*Tobacco etch virus*) et un domaine de liaison de la calmoduline. bZIP : domaine basique et glissière de leucine. TMD : domaine transmembranaire. REG : domaine régulateur.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés aux gènes dont l'expression est régulée par la forme nucléaire d'A1bZIP, en particulier ceux qui codent pour des protéines localisées au niveau de la région périnucléaire (RE, appareil de golgi). De fait, il est bien

établi qu'ATF6 active la production de la protéine BiP qui s'associe au domaine C-terminal d'ATF6 pour moduler l'activation de cette dernière en réponse au stress (Shen, Chen et al. 2002). Par conséquent, nous avons envisagé la possibilité qu'un des gènes modulés par AIBZIP puisse coder pour une protéine qui s'associerait à AIBZIP au RE. Ces gènes ont été identifiés par des collègues dont le projet consistait à identifier les gènes cibles d'AIBZIP. L'ensemble de ces hypothèses a servi à identifier plusieurs partenaires d'AIBZIP au RE et ces résultats ouvrent aujourd'hui plusieurs issues pour mieux comprendre le mécanisme d'action d'AIBZIP au niveau des cellules cancéreuses prostatiques.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.i Lignées cellulaires**

Les cellules LNCaP provenant de «*American Type Culture Collection*» (Manassas, VA) sont cultivées selon le protocole décrit dans l'article de Lessard et collaborateurs, 2007. Le système d'expression inductible RheoSwitch modifié a été décrit préalablement dans l'article de Lessard et collaborateurs, 2007. Le clone 6-6 a été obtenu suite à la transfection des cellules LNCaP par le plasmide (pZRD) qui exprime de façon constitutive les facteurs de transcription RheoSwitch, la protéine de la fluorescence verte hrGFP et le gène de résistance à la Zéocine. Le clone 43-3 a été généré en transfectant des cellules LNCaP avec pZR-FA395AVHA, un plasmide dérivé de pZRD dans lequel on a inséré une cassette contenant un promoteur inductible qui contrôle la production de la forme pleine longueur d'AIBZIP à laquelle on a greffé des épitopes Flag (DYKDDDDK) et HA (YPYDVPDYASL) en N et en C-terminal, respectivement. La forme d'AIBZIP produite par ce plasmide a comme particularité qu'on a muté les acides aminés Arg 335 et Leu 338 qui sont reconnus par la protéase S1P afin d'empêcher le clivage de la protéine et favoriser la purification de complexes protéiques contenant la forme pleine longueur d'AIBZIP. Pour induire la production d'AIBZIP, nous avons ajouté au milieu de culture la molécule RSL1 (New England Biolabs) qui s'associe aux facteurs de transcription RheoSwitch.

### **2.ii Extraction des protéines solubles et purification des partenaires d'AIBZIP**

Pour cette expérience, le clone 43-3 a été traité pendant 24h avec l'agent inducteur RSL1 (500 mM) et le clone 6-6 a été utilisé comme contrôle négatif.

Les cellules ( $6 \times 10^9$ /condition) provenant du clone 6-6 ou du clone 43-3 ont été lysées en ajoutant le tampon TNES pH 8.0 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% DOC, 1% NP-40, inhibiteurs de protéases (complete EDTA-free protease inhibitor cocktail Roche)) dans un ratio 1:1. Le lysat a été incubé pendant 1 heure à 4°C sur une plaque agitatrice (*orbital shaker*) puis centrifugé pendant 10min à 4°C à une vitesse de 13000 rpm. La fraction soluble a été transférée dans un nouveau tube et utilisée pour l'identification des protéines qui interagissent avec AlbZIP. Afin d'éliminer les protéines associées à AlbZIP de manière non-spécifique, les surnageants obtenus à partir des cellules 6-6 et 43-3 ont été incubés avec 100µl de billes protéines A pendant 4h à 4°C sur une plaque agitatrice. Les échantillons ont par la suite été centrifugés pendant 10min à 4°C à 3000 rpm et chaque surnageant a été transféré dans un nouveau tube contenant 500µl de résine couplée à l'anticorps anti-Flag. Le tout a été incubé pendant 18h sur une plaque agitatrice à 4°C. Le lendemain, les échantillons ont été centrifugés pendant 10 mn à 4°C à 3000 rpm. Le culot de billes récupéré fut lavé trois fois avec le tampon TNE pH 8.0 (10mM Tris-HCl pH 8.0, 165mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40) et élué avec le peptide Flag selon les instructions de la compagnie (Sigma). L'éluat obtenu fut bouilli pendant 5min et séparé sur un gel d'acrylamide d'épaisseur 0.75mm sur une distance de 8cm. Ensuite, le gel a été coloré au bleu de coomassie colloïdal et chaque piste a été découpée en 8 bandes de 1cm<sup>2</sup> chaque. Ces bandes ont été confiées à la plateforme de protéomique de l'est du Québec au centre de recherche du CHUL pour les analyser par spectrométrie de masse.

### 2.iii Digestion des protéines

Les bandes d'intérêt ont été placées dans des plaques de 96 puits et lavées avec de l'eau. La digestion avec la trypsine fut effectuée dans le robot de digestion MassPrep (Waters, Milford, USA) selon les spécifications du manufacturier et le protocole de Shevchenko et al (Shevchenko, Wilm et al. 1996) avec quelques modifications suggérées par Havlis et al (Havlis, Thomas et al. 2003). En bref, les protéines ont été réduites avec 10mM de DTT et alkylées avec 55mM d'iodoacétamide. Les protéines furent digérées avec 105mM de trypsine porcine modifiée (grade séquençage, Promega, Madison, WI) à une température de 58°C pendant 1h. Les produits de digestion ont été extraits avec 1% acide formique, 2% acétonitrile suivi par 1% acide formique, 50% acétonitrile. Les extraits obtenus d'un même

échantillon ont été combinés, séchés et resuspendus dans 7 µl de 0.1% acide formique. Trois µl furent injectés dans le spectromètre de masse.

#### **2.iv Spectrométrie de masse**

Les échantillons de peptides ont été séparés par chromatographie capillaire en phase inverse (nanoLC) et analysés par spectrométrie de masse (ES MS/MS). Les expériences ont été effectuées à l'aide d'une pompe «Thermo Surveyor MS, ThermoFisher, San Jose, CA, USA» connectée à un spectromètre de masse de type «LTQ trappe ionique linéaire» (ThermoFisher, San Jose, CA USA) équipé d'une source ionique «electrospray» (ThermoFisher, San Jose, CA USA). La séparation des peptides a eu lieu dans une colonne picofrit vide (New Objective, Woburn, MA) et paquetée en laboratoire avec de la phase réverse Jupiter (Phenomenex) 5u, 300A C18, 10 cm x 0.075 mm (diamètre interne). Les peptides ont été élués grâce à un gradient linéaire de 2-50% de solvant B (acétonitrile, 0.1% acide formique) pendant 30 minutes à 200 nL/min (obtenu par fractionnement du débit). Les spectres de masse furent obtenus en utilisant une acquisition en mode donnée dépendante en utilisant le logiciel Xcalibur version 2.0. Chaque analyse complète du spectre de masse (400 to 2000 m/z) fut suivie d'une dissociation, induite par collision, des sept ions les plus intenses. La fonction d'exclusion dynamique (durée 30 sec) est activée et l'énergie de fragmentation relative de collision a été fixée à 35%.

#### **2.v Recherche dans la base de données**

Tous les échantillons MS/MS ont été analysés par Mascot (Matrix Science, London, UK; version 3.00.01). Mascot a effectué sa recherche dans la banque uniref 100\_2010\_06\_Homo\_sapiens\_9606 database (113262) en spécifiant la trypsine comme enzyme de digestion. Une tolérance de 0.5 Da a été utilisée pour la masse des fragments et une tolérance de 2.0 Da a été utilisée pour la masse du précurseur. La cystéine alkylée avec l'iodoacétamide a été considérée comme une modification fixe alors que l'oxydation de la méthionine a été spécifiée comme une modification variable. Seulement deux clivages manqués sont acceptés.

## 2.vi Critères pour l'identification des protéines

Scaffold (version Scaffold\_3\_00\_04, Proteome Software Inc., Portland, OR) a été utilisé pour valider l'identification des peptides et des protéines (MS/MS). Les identifications des peptides ont été acceptées quand celles-ci pouvaient être établies avec une probabilité de plus de 95% selon l'algorithme Peptide Prophet (Keller, A et al Anal. Chem. 2002;74(20):5383-92). Les identifications des protéines ont été acceptées quand celles-ci pouvaient être établies avec une probabilité de plus de 95% et ont présenté au moins 2 peptides identifiés. Les probabilités des protéines ont été attribuées par l'algorithme Protein Prophet (Nesvizhskii, AI Anal Chem. 2003 Sep 1;75(17):4646-58). Les protéines présentant des peptides similaires et ne pouvant pas être différenciées selon l'analyse MS/MS seulement ont été regroupées selon les principes de parcimonie.

## 2.vii Analyse et validation des résultats

L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier plusieurs centaines de partenaires potentiels d'AibZIP. Ceux qui ont été choisis pour la validation présentent au moins 2 peptides qui ont servi pour l'identification de la protéine. Néanmoins, deux candidats présentant un seul peptide ont, quand même, été choisis. De plus, outre le nombre de peptides, le choix s'est basé sur la localisation subcellulaire de ces candidats au niveau de la région périnucléaire. Pour confirmer l'interaction de ces candidats avec AibZIP, j'ai amplifié l'ADNc de chaque candidat par RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR). La transcription inverse a été réalisée sur l'ARN total extrait des cellules prostatiques humaines LNCaP. L'ADNc obtenu a été sous-cloné dans un vecteur d'expression en fusion avec l'épitope Flag en C-terminal. Les candidats choisis dans la liste des gènes régulés par la forme nucléaire d'AibZIP ont, quant à eux, été sous-clonés dans un vecteur d'expression en fusion avec l'épitope HA en C-terminal. Pour vérifier si les protéines candidates interagissent avec AibZIP *in vivo*, des expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées. De plus, des essais de type « pull down » ont aussi été effectués pour confirmer les résultats d'immunoprécipitation et pour déterminer grossièrement le domaine d'interaction. La localisation subcellulaire de chaque candidat a été déterminée par immunofluorescence.



### 2.viii Immunoprécipitation

Pour vérifier si les protéines candidates s'associent à AIBZIP *in vivo*, des cellules LNCaP ont été transfectées avec 8 µg de pA3-AIBZIP-HA ou pA3-Flag-AIBZIP-HA seul, ou en présence de 10 µg de plasmides pA3 contenant l'ADNc du candidat à tester en fusion avec l'épitope Flag ou HA, selon le cas, et ce en utilisant la lipofectine comme agent de transfection. Le milieu de culture a été changé 16h après la transfection et les cellules ont été récoltées 48h plus tard. Les cellules obtenues par centrifugation ont été lysées dans un tampon TNES, pH 7.5 (10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% DOC, 1% NP-40, inhibiteurs de protéase (complete EDTA-free protease inhibitor cocktail Roche)) pendant 1h à 4°C sur une plaque agitatrice (agitateur orbital/ orbital shaker). Le surnageant obtenu par centrifugation à 4°C pendant 15mn fut transféré vers un nouveau tube contenant 20 µl de billes protéine A pour effectuer un «preclear» pendant 4h à 4°C sur une plaque agitatrice. Le culot de billes protéine A a été jeté suite à une centrifugation à 3000 rpm à 4°C pendant 5min et le surnageant a été récupéré et transféré dans un nouveau tube contenant 20 µl de résine couplée à l'anticorps anti-Flag. Le tout a été incubé toute la nuit à 4°C sur une plaque agitatrice. Le lendemain le culot de billes a été récupéré par centrifugation à 3000 rpm pendant 5min, lavé trois fois avec le tampon TNE pH 7.5 (10mM Tris-HCl pH 7.5, 165mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40) et élué avec 100 µl de peptide Flag selon les instructions de la compagnie (Sigma). L'éluat obtenu fut bouilli pendant 5min, séparé sur un gel d'acrylamide 10% d'épaisseur 1.5 cm et analysé par immunobuvardage.

### 2.ix Production, purification des protéines de fusion GST, synthèse *in vitro* et pull down

Des expériences de «pull-down» ont été réalisées afin de déterminer si les protéines candidates interagissent directement avec AIBZIP *in vitro*. La souche bactérienne E.coli de type BL21 a été transformée avec des plasmides produisant les protéines de fusion GST, GST-A290 (AIBZIP 1-290 aa) et GST-1CTD (AIBZIP 316-395 aa), respectivement. Les bactéries ont été cultivées dans un milieu LB (*Lysogeny Broth*) contenant 50µg/ml d'ampicilline à 37°C. Quand la densité de la culture bactérienne se situe entre 0.8 et 2.0, la production de la protéine de fusion a été induite par l'ajout de 1mM d'IPTG (isopropyl β-thiogalactopyranoside) pendant 18h à la température de la pièce. Le lendemain les cellules

ont été centrifugées et le culot a été lysé par le tampon NETN pH 8.0 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) NP40, 5% (v/v) glycerol, inhibiteurs de protéase complète (EDTA-free protease inhibitor cocktail Roche)). Les cellules ont été soniquées et la phase soluble a été obtenue par centrifugation à 12000 rpm pendant 10min à 4°C. Le surnageant a par la suite été transféré vers un nouveau tube contenant 100µl de billes de glutathione Sépharose (glutathione sepharose 4B fast flow beads (GE healthcare)) et incubé pendant 18h à 4°C sur une plaque agitatrice. Le jour suivant, le culot de billes a été lavé trois fois avec le tampon NETN et resuspendu dans 100µl de tampon NETN.

En parallèle, les cellules LNCaP ont été transfectées avec 16 µg de plasmides pA3 contenant l'ADNc du candidat à confirmer en fusion avec l'épitope Flag ou HA et ce en utilisant la lipofectine comme agent de transfection. Le milieu de culture a été changé 16h après la transfection et les cellules ont été récoltées 24h plus tard. Le culot de cellules obtenu par centrifugation a été lysé par le tampon TNES, pH 7.5 (10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% DOC, 1% NP-40, inhibiteurs de protéase (complète EDTA-free protease inhibitor cocktail Roche)) pendant 1h à 4°C sur une plaque agitatrice (agitateur orbital/ orbital shaker). Le surnageant obtenu par centrifugation à 4°C pendant 15min a été transféré vers un nouveau tube contenant 20 µl de billes Glutathione Sépharose pour effectuer un «preclear» pendant 4h à 4°C sur une plaque agitatrice. Le culot de billes protéine A a été récupéré et jeté suite à une centrifugation à 3000 rpm à 4°C pendant 5min et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube contenant la GST, la GST-A290 ou la GST-1CTD. Le tout a été incubé pendant 18h à 4°C sur une plaque agitatrice. Le lendemain, les culots de billes ont été lavés trois fois avec le tampon NETN, pH 7.5 et resuspendus dans le tampon de migration (60 mM tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM DTT et 0.1% bromophenol blue), bouillis pendant 10 min et analysés par immunobuvardage en utilisant l'anticorps anti-HA ou anti-FLAG.

De plus, des expériences de «pull down» ont été réalisées pour déterminer si l'interaction d'AlbZIP avec ses partenaires était directe ou non. Pour ce faire, les protéines candidates ont été produites *in vitro* à froid (sans radioactivité) en utilisant la trousse «*TNT Coupled Reticulocyte Lysate System*» (Promega Corporation, Madison, WI, USA) selon les instructions du fabricant. Ensuite, 50% de chaque synthèse *in vitro* a été incubée avec la GST seule ou avec la GST-A290 pendant 18h à 4°C sur une plaque agitatrice. Le volume

final de la réaction a été ajusté à 0.5 ml avec le tampon NETN. Le lendemain, les culots de billes ont été lavés trois fois avec le tampon NETN, pH 7.5 et resuspendus dans le tampon de migration (60 mM tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM DTT et 0.1% bromophenol blue), bouillis pendant 10 min et analysés par immunobuvardage en utilisant l'anticorps anti-HA.

## **2.x Immunofluorescence**

Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées afin de déterminer la localisation subcellulaire de chaque candidat. Pour ce faire, les cellules LNCaP ont été transfectées avec 1µg de chaque plasmide exprimant le candidat à étudier en fusion avec l'épitope HA ou Flag et ce en utilisant la lipofectine comme agent de transfection. Le milieu de culture a été changé 16h après la transfection. 48h après la transfection, les cellules ont été fixées avec la solution formaline (10%, laboratoire MAT) pendant 1h, puis les noyaux ont été colorés avec le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) pendant 15min. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec du TBS 0.2% pendant 15min à la température de la pièce et bloquées pendant 1h avec du lait 2% (Carnation). Les cellules fixées ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-Flag (1:1000, Sigma) ou anti-HA Y-11 (1:1000, Santa Cruz) pendant 18h à 4°C sur une plaque agitatrice. Le lendemain, l'anticorps primaire est enlevé et remplacé par l'anticorps secondaire Alexa 594 (fluorophore-labeled goat anti mouse IgG) ou Alexa 488 (fluorophore-labeled goat anti rabbit IgG) selon le cas pendant 1h à la température de la pièce. Les lamelles sont par la suite montées sur les lames et observées au microscope à fluorescence. Les images ont été capturées avec une caméra digitale de type Leica DFC 350 FX.

Pour vérifier la spécificité du signal observé par immunofluorescence, nous avons utilisé des cellules LNCaP non transfectées comme contrôle négatif. Ces cellules ont subi toutes les étapes décrites ci-dessus.

## **3. Résultats**

### **3.i Partenaires d'AibZIP (clone 43-3)**

Dans le but d'identifier les partenaires d'AibZIP quand celle-ci se trouve au RE, nous avons utilisé un clone stable inductible qui exprime la forme pleine longueur d'AibZIP suite à l'ajout de l'agent inducteur RSL1. La protéine produite par ce clone est en fusion en N-terminal avec l'épitope Flag (DYKDDDDK) et présente une mutation des acides aminés

Arg 335 et Leu 338 du site potentiel de clivage de la protéase S1P. Cette mutation a été ajoutée dans le but d'empêcher le clivage spontané de la protéine suite à sa surexpression et favoriser la purification de complexes protéiques contenant la forme pleine longueur d'A1bZIP seulement. Les protéines solubles ont par la suite été purifiées sur une colonne de résine couplée à l'anticorps anti-FLAG et l'éluat obtenu est analysé par spectrométrie de masse. Cette étude a permis d'identifier plusieurs centaines de candidats potentiels dont 25 ont été choisis pour la validation. Après des expériences de co-immunoprécipitation, sept parmi cette liste se sont révélés de vrais partenaires de la forme pleine longueur d'A1bZIP, (Tableau 1).

Tableau 1 : Liste des partenaires de la forme pleine longueur d'A1bZIP. Candidats obtenus suite à l'immunoprécipitation de la forme pleine longueur d'A1bZIP exprimée par le clone 43-3.

Protéine	Référence	Nom
<b>CDC37</b>	Q16543	Cell division cycle 37 homolog
<b>PDF6</b>	O15212	Prefoldin 6
<b>RAB1B</b>	Q6FIG4	Member RAS oncogene family
<b>RTN3</b>	O95197	Reticulon 3
<b>SAR1a</b>	Q53F37	SAR1 homolog a
<b>STEAP2</b>	Q6YPB1	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2
<b>TMCO1</b>	Q9UM00	Transmembrane and coiled-coil domains 1

### 3.ii Candidats choisis dans la liste des gènes régulés par la forme nucléaire d'A1bZIP

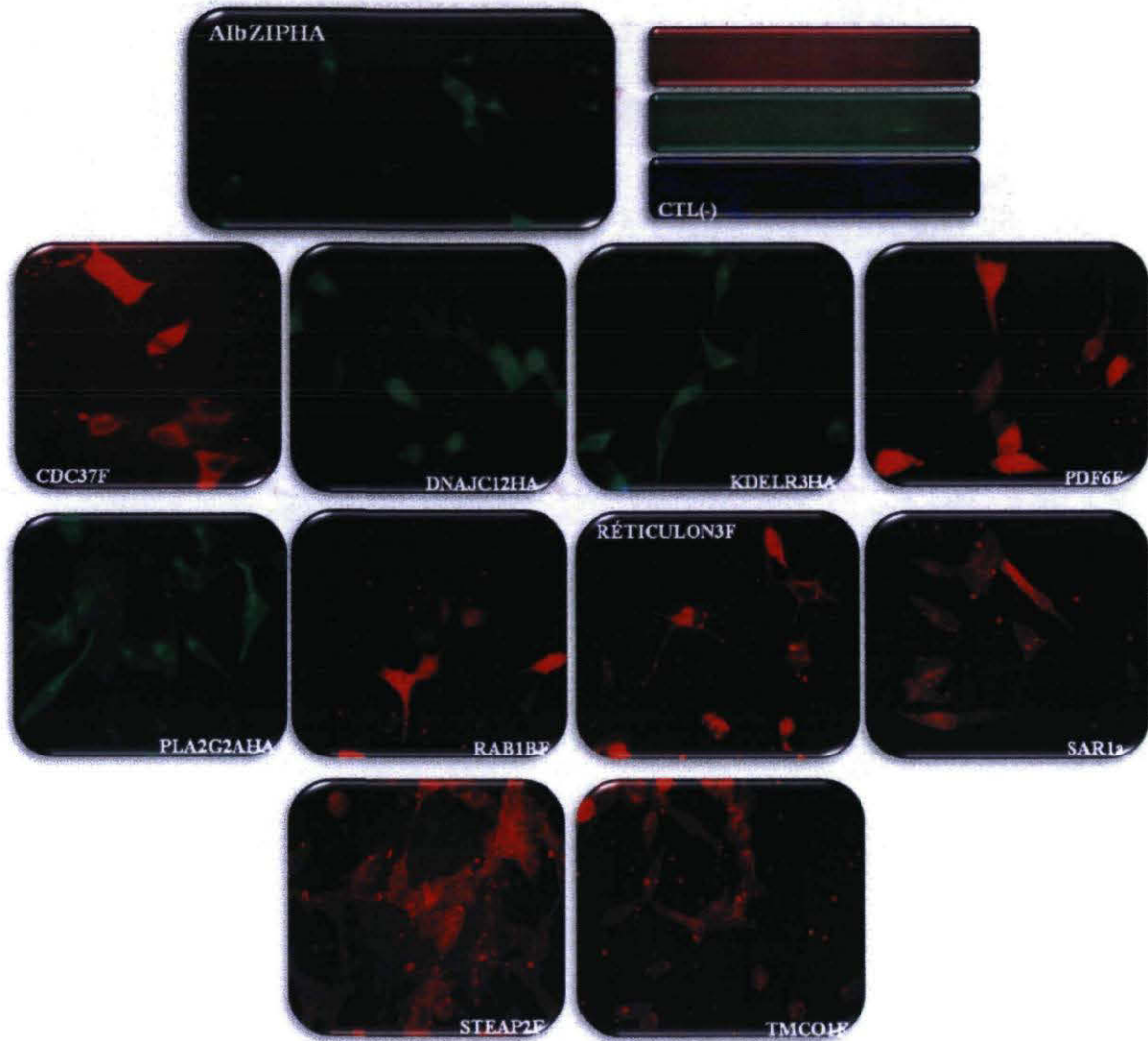
Une étude réalisée par notre équipe en 2007 a permis d'identifier une panoplie de gènes régulés par la forme nucléaire d'A1bZIP. En se basant sur les données de cette étude, nous avons sélectionné ceux dont le produit est localisé au cytoplasme et qui pourraient être des partenaires potentiels de la forme pleine longueur d'A1bZIP localisée au RE. Trois parmi ceux testés se sont révélés des partenaires d'A1bZIP, (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste des partenaires d'AlbZIP qui sont régulés par sa forme nucléaire

Protéines	Référence	Nom
<b>DNAJC12</b>	56521	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12
<b>KDELR3</b>	11015	KDEL endoplasmic réticulum retention receptor 3
<b>PLA2G2A</b>	5320	Phospholipase A2, group IIA

### 3.iii Localisation subcellulaire des candidats

La localisation subcellulaire de chaque candidat a été vérifiée par immunofluorescence dans les cellules prostatiques cancéreuses humaines LNCaP. L'ADNc de chaque candidat a été transfecté de façon transitoire dans les LNCaP. Tous les candidats testés co-localisent avec AlbZIP au niveau du cytoplasme. Toutefois, certains partenaires peuvent présenter une localisation diffuse au niveau de la cellule (Figure 3-2).

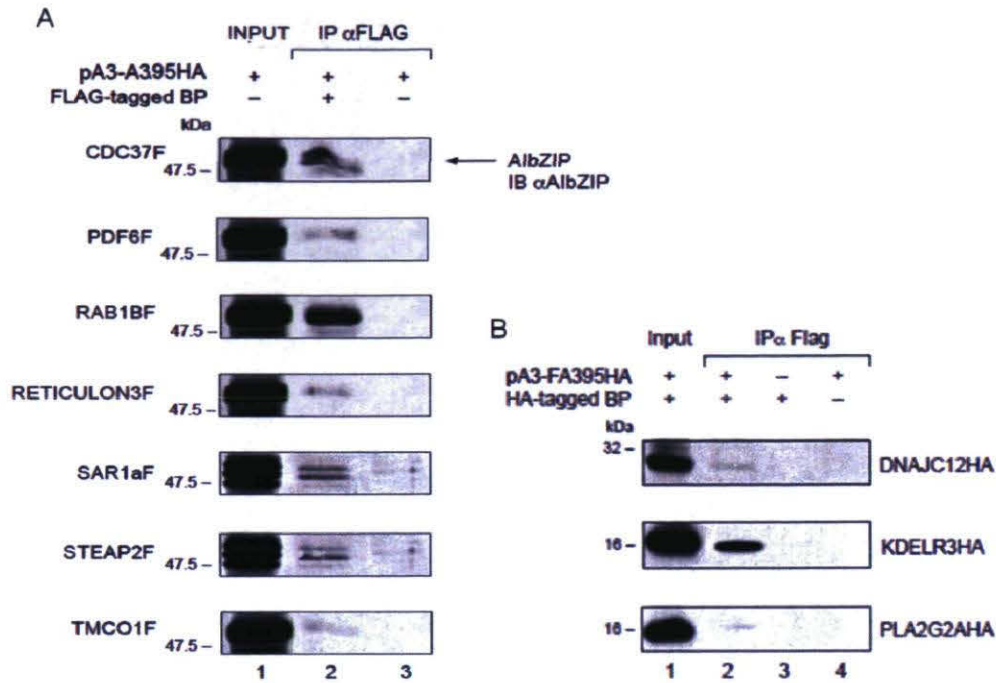


**Figure 3-2:** Localisation subcellulaire de la forme pleine longueur d'AibZIP et de ses différents partenaires. Les cellules LNCaP fixées avec la formaline ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-FLAG ou anti-HA et ensuite avec l'anticorps secondaire couplé au fluorophore Alexa 594 (rouge) ou au fluorophore 488 (vert), respectivement. CDC37F, KDEL3HA, PLA2G2AHA et RÉTICULON3F sont localisées au cytoplasme alors que les protéines DNAJC12HA, PDF6F, RAB1BF, SAR1a, STEAP2F et TMCO1F sont diffuses dans toute la cellule.

### **3.iv La forme pleine longueur d'AlbZIP interagit *in vivo* avec ses partenaires**

La validation de l'interaction potentielle entre AlbZIP et ses différents partenaires a été obtenue par co-immunoprécipitation. Dans le cas des partenaires obtenus par spectrométrie de masse, le plasmide exprimant la protéine candidate en fusion avec l'épitope FLAG a été co-transfecté avec le plasmide exprimant la forme pleine longueur d'AlbZIP en fusion avec l'épitope HA. Par contre, dans le cas des partenaires sélectionnés dans la liste des gènes cibles de la forme nucléaire d'AlbZIP, le plasmide exprimant la protéine candidate en fusion avec l'épitope HA a été co-transfecté avec le plasmide exprimant la forme pleine longueur d'AlbZIP en fusion en N-terminal avec l'épitope FLAG et en C-terminal avec l'épitope HA (FA395HA).

Dans le premier cas, la protéine candidate fusionnée à l'épitope FLAG a été immunoprécipitée avec une colonne de résine couplée à l'anticorps anti-FLAG. Ensuite, l'éluat a été analysé par immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre le domaine C-terminal d'AlbZIP. Quant au deuxième cas, la protéine FA395HA a été immunoprécipitée avec une colonne de résine couplée à l'anticorps anti-FLAG et l'éluat a été analysé par immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre l'épitope HA. Comme le montre la figure 3-3A, l'immunoprécipitation de chaque protéine candidate avec la résine couplée à l'anticorps anti-FLAG a permis la co-immunoprécipitation de la forme pleine longueur d'AlbZIP (A395HA) (piste 2). De plus, la figure 3-3B montre aussi que les protéines DNAJC12HA, KDELR3HA ou PLA2G2AHA s'associent avec la protéine FA395HA suite à son immunoprécipitation avec la résine anti-FLAG (piste 2).



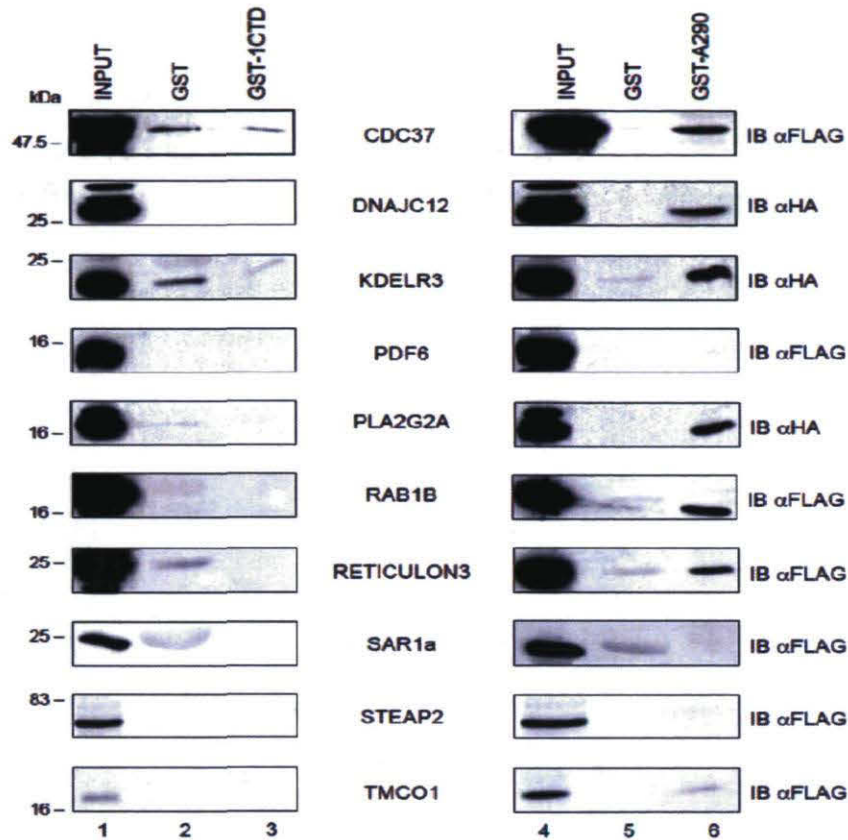
**Figure 3-3:** La protéine AIBZIP interagit avec ses partenaires *in vivo*. A. Validation des résultats de spectrométrie de masse. La co-immunoprécipitation de la forme pleine longueur d'AIBZIP suite à l'immunoprécipitation des protéines candidates avec la résine couplée à l'anticorps anti-FLAG est observée par la présence d'une bande à 47.5 KDa (piste 2). Cette bande est, par contre, absente au niveau de la co-IP contrôle (piste 3). B. Candidats choisis parmi la liste des gènes cibles d'AIBZIP nucléaire. Grâce à l'immunoprécipitation de la forme pleine longueur d'AIBZIP (FA395HA) avec la résine couplée à l'anticorps anti-FLAG, nous observons par immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA la présence de bandes correspondantes aux protéines DNAJC12, KDELR3 et PLA2G2A respectivement (piste 2). Cette bande est absente au niveau des co-IP contrôles (pistes 3 et 4).

### 3.v Les candidats identifiés s'associent à la forme pleine longueur d'AIBZIP *in vitro*

Dans le but de valider les résultats des co-immunoprécipitations, nous avons réalisé des expériences de type «pull down». Pour ce faire, le plasmide contenant l'ADNc de chaque candidat a été transfecté dans les LNCaP de façon transitoire. Les protéines solubles provenant de chaque transfection ont par la suite été incubées avec la GST seule, la GST-1CTD (une protéine de fusion qui exprime le domaine C-terminal d'AIBZIP en fusion avec la GST) ou la GST-A290 (une protéine de fusion qui exprime le domaine N-terminal d'AIBZIP en fusion avec la GST). Les échantillons ont été analysés par immunobuvardage en utilisant l'anticorps dirigé contre l'épitope FLAG ou HA selon le cas. Cette expérience a

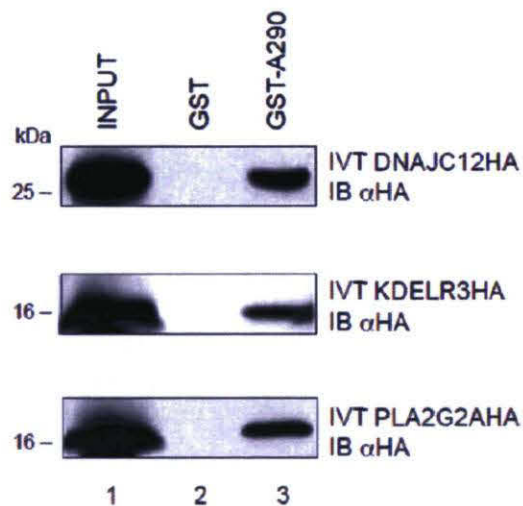


permis de confirmer l'expérience de co-immunoprécipitation pour 7 candidats sur 10. En effet, l'immunobuvardage de la Figure 3-4 montre que la GST-A290 s'associe avec la protéine candidate (piste 6). À l'inverse, la GST-1CTD ne lie aucune protéine candidate (piste 3). Toutefois, les candidats PDF6, SAR1a et STEAP2 ne s'associent ni avec la GST-1CTD ni avec la GST-A290. La GST seule a été utilisée comme contrôle négatif.



**Figure 3-4 :** Validation des résultats de co-IP par essai de type «pull down». D'abord, les cellules LNCaP ont été transfectées avec le plasmide contenant l'ADNc de chaque candidat. Ensuite, les protéines solubles provenant de chaque transfection ont été incubées soit avec la GST seule, la GST-1CTD ou la GST-A290 (toutes couplées à une résine de Gluthatione Sépharose). Nous observons au niveau de la piste 6, que la GST-A290 s'associe avec les protéines CDC37, DNAJC12, KDELR3, PLA2G2A, RAB1B, RÉTICULON3 et TMCO1. Par contre, la GST-1CTD ne lie pas ces protéines puisqu'aucune bande n'est observée au niveau de la piste 3. Pour les protéines PDF6, SAR1a et STEAP2, elles ne s'associent ni à la GST-1CTD ni à la GST-A290.

Grâce à l'expérience précédente nous avons démontré que 7 des partenaires de la forme pleine longueur d'AlbZIP interagissent avec elle via son domaine N-terminal. Nous avons alors voulu vérifier si cette interaction était directe ou non. Une synthèse *in vitro* (TnT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems) de chaque candidat a été incubée avec la GST seule ou la GST fusionnée au domaine N-ter d'AlbZIP (GST-A290) couplées à une résine de Gluthatione Sépharose. Après lavages et élution, les échantillons ont été analysés par immunobuvardage en utilisant un anticorps dirigé contre l'épitope FLAG ou l'épitope HA selon le cas. Cette expérience a permis d'observer que trois des candidats testés (DNAJC12, KDELR3 et PLA2G2A) lient la forme pleine longueur d'AlbZIP, quand celle-ci se trouve au RE, via son domaine N-terminal projeté dans le cytoplasme et ce de façon directe (Figure 3-5). Quand aux protéines, elles lient AlbZIP de façon indirecte en faisant probablement partie d'un complexe protéique comprenant cette dernière. Naturellement, elles peuvent appartenir toutes au même complexe ou chacune à des complexes différents.



**Figure 3-5 :** DNAJC12, KDELR3 et PLA2G2A interagissent directement avec AlbZIP. Chaque protéine candidate a été produite par synthèse *in vitro* et incubée avec la GST seule ou la GST-A290. L'analyse de cette expérience a été réalisée par immunobuvardage en utilisant l'anticorps anti-HA. La GST-A290 s'associe avec DNAJC12HA, KDELR3HA et PLA2G2AHA puisque nous observons une bande au niveau de la piste 3 correspondant à ces protéines, respectivement. La GST seule a été utilisée comme contrôle négatif (piste 2).

## 4. Discussion

La cellule eucaryote est équipée de plusieurs voies de signalisation capables d'engendrer une réponse adaptative à un stress déclenché suite à la perturbation de son homéostasie. Cette réponse (UPR) repose sur trois effecteurs, dont le facteur de transcription ATF6. Aujourd'hui les facteurs de transcription bZIP, correspondants au modèle ATF6 et impliqués dans la réponse au stress du RE, sont de plus en plus nombreux et cette expansion reflète la sélectivité de la réponse. Le facteur de transcription A**IbZIP** est lui aussi impliqué dans le stress du RE déclenché par une déplétion des concentrations calciques de ce dernier. L'identification des partenaires de la forme pleine longueur d'A**IbZIP** était une étape importante dans la compréhension de l'environnement dans lequel A**IbZIP** baigne avant et après le déclenchement du stress du RE. Cet environnement participe à la rétention d'A**IbZIP** au RE quand elle est sous sa forme inactive. De plus, il se charge de son transport vers l'appareil de golgi où elle va subir deux protéolyses successives pour libérer sa forme active. Cette forme libérée participera alors à la réponse au stress du RE en régulant l'expression de ses gènes cibles. Cette étude a permis d'identifier plusieurs partenaires de la forme pleine longueur d'A**IbZIP** au RE (Tableau 3). Ces candidats peuvent être classés en différents groupes selon leur fonction. En effet, les partenaires d'A**IbZIP** sont des chaperonnes et des protéines de maturation (CDC37, DNAJC12 et PDF6), des protéines impliquées dans le transport entre le RE et l'appareil de golgi (RAB1B, RÉTICULON3 et SAR1a), des protéines transmembranaires ancrées au RE (KDELR3, STEAP2 et TMC01) et une phospholipase sécrétée dans le milieu extracellulaire (PLA2G2A) (Figure 3-3). Grâce à une expérience de type «pull down», nous avons réussi à confirmer les résultats des co-immunoprécipitations pour 7 des candidats testés. Cette expérience nous a aussi permis de délimiter grossièrement le domaine d'interaction au niveau d'A**IbZIP**. Nous avons démontré que CDC37, DNAJC12, KDELR3, PLA2G2A, RAB1B, RÉTICULON3 et TMC01 sont capables de lier la protéine pleine longueur d'A**IbZIP** via son domaine N-terminal projeté dans le cytoplasme (Figure 3-4). Toutefois, les protéines PDF6, STEAP2 et SAR1a ne s'associent ni avec le domaine C-terminal d'A**IbZIP** (GST-1CTD) ni avec celui en N-terminal (GST-A290) (Figure 3-4). Il est probable que ces protéines pourraient lier plus qu'un domaine au niveau d'A**IbZIP**. De plus, trois de ces partenaires (DNAJC12, KDELR3 et PLA2G2A) interagissent

directement avec ce domaine N-terminal (Figure 3-5). Fait intéressant, ces mêmes candidats font partie de la liste des gènes régulés par la forme nucléaire d'AibZIP. Plusieurs hypothèses sont émises quant à l'implication de ces protéines dans la régulation de l'activité d'AibZIP et ce selon leurs rôles rapportés dans la littérature. Ceci suggère que chaque groupe de candidats peut être impliqué dans une étape spécifique de l'activation d'AibZIP. Les protéines transmembranaires KDELR3, STEAP2 et TMCO1 pourraient participer à la rétention d'AibZIP quand celle-ci se trouve en état inactif au RE. Suite au déclenchement du stress du RE, les protéines RAB1B, RÉTICULON3 et SAR1a pourraient faciliter le transport d'AibZIP vers l'appareil de golgi. Naturellement, il faudra caractériser chaque interaction pour mettre en évidence le rôle de chaque protéine. Évidemment, ces résultats nous aideront à mieux comprendre la régulation de la forme pleine longueur d'AibZIP.

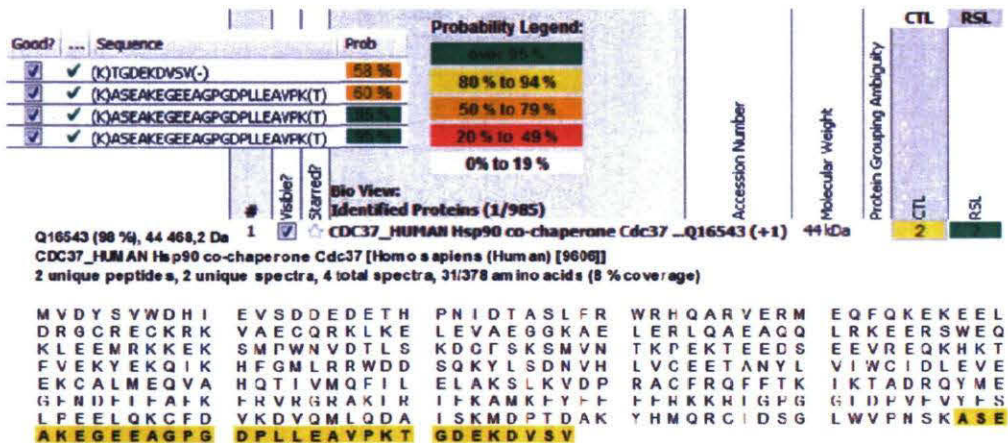
Tableau 3: tableau récapitulatif

	<u>IP<math>\alpha</math>Flag/IB<math>\alpha</math>HA</u>	<u>GST-1CTD</u>	<u>GST-A290</u>	<u>Localisation subcellulaire</u>
<i>Chaperonnes et protéine de maturation</i>				
CDC37	+	-	+	Cytoplasmique
DNAJC12	+	-	+	Diffuse
PDF6	+	-	-	Diffuse
<i>Protéines transmembranaires</i>				
KDEL3	+	-	+	RE, app de golgi
STEAP2	+	-	-	Diffuse
TMCO1	+	-	+	Diffuse
<i>Protéines impliquées dans le transport</i>				
RAB1B	+	-	+	Diffuse
RETICULON3	+	-	+	Cytoplasmique
SAR1a	+	-	-	Diffuse
<i>Protéine de sécrétion</i>				
PLA2G2A	+	-	+	Cytoplasmique

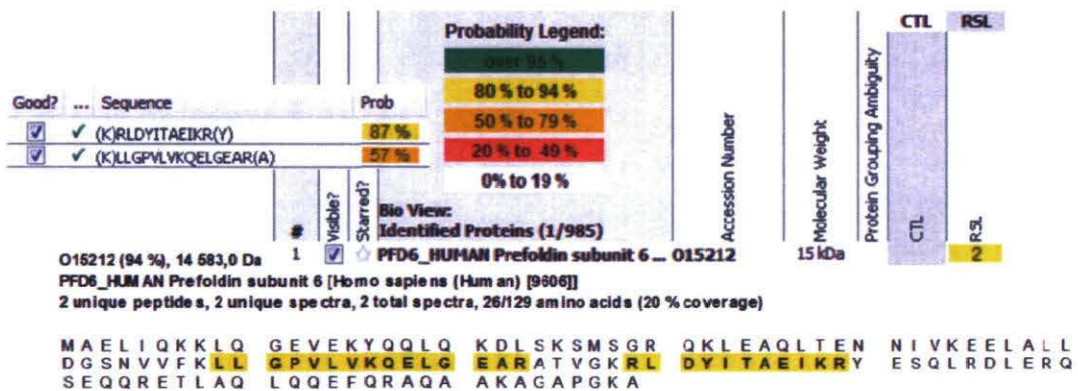
## 5. Matériel supplémentaire

### Résultats de spectrométrie de masse obtenus par le biais du programme Scaffold

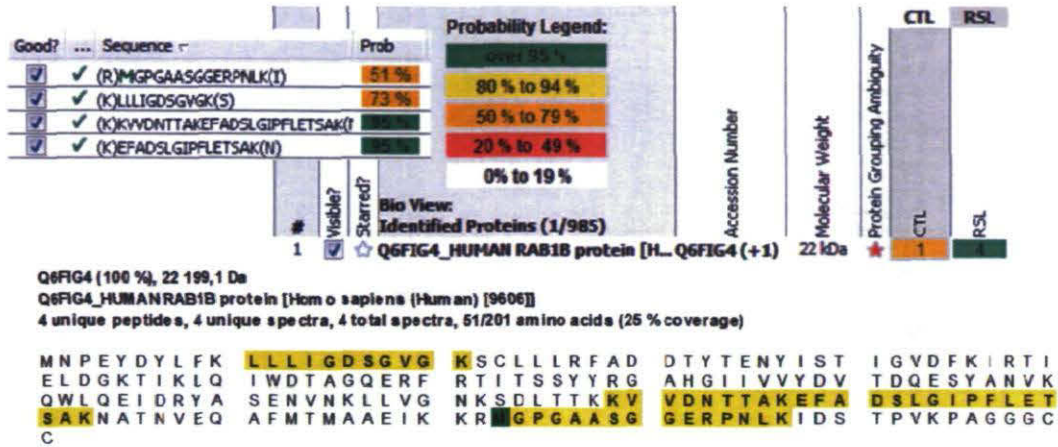
#### CDC37



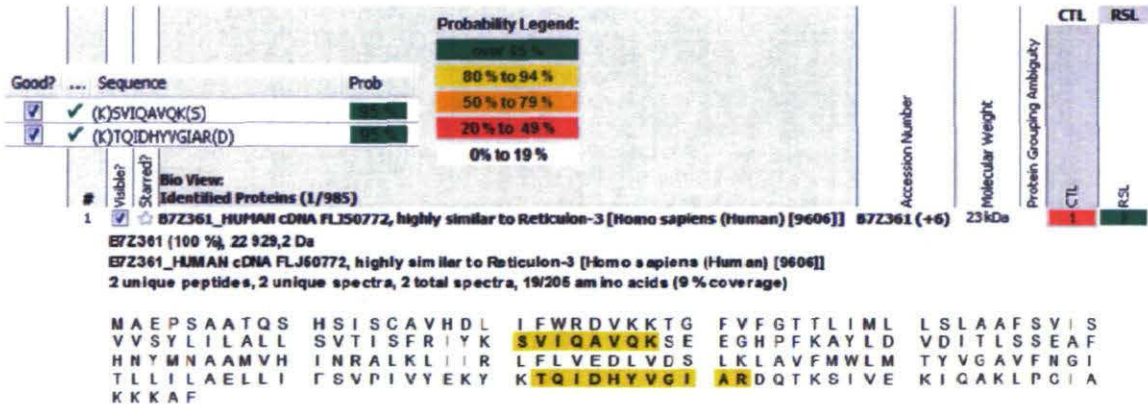
#### PDF6



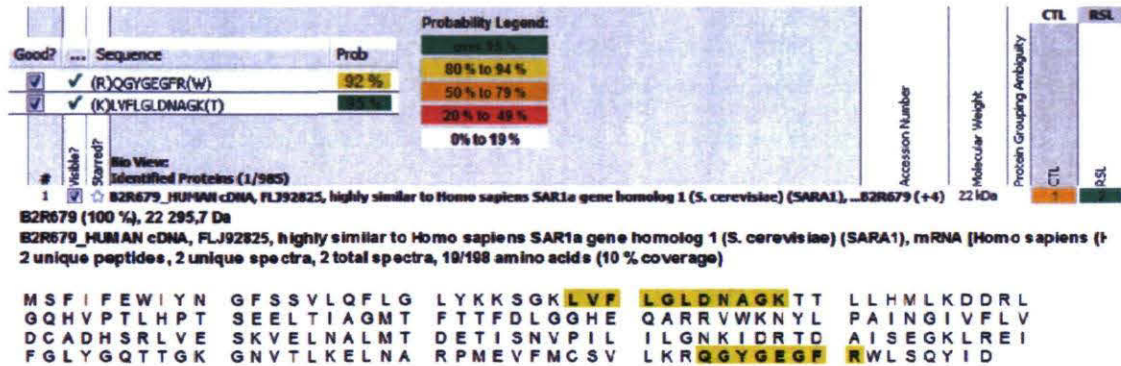
RAB1B



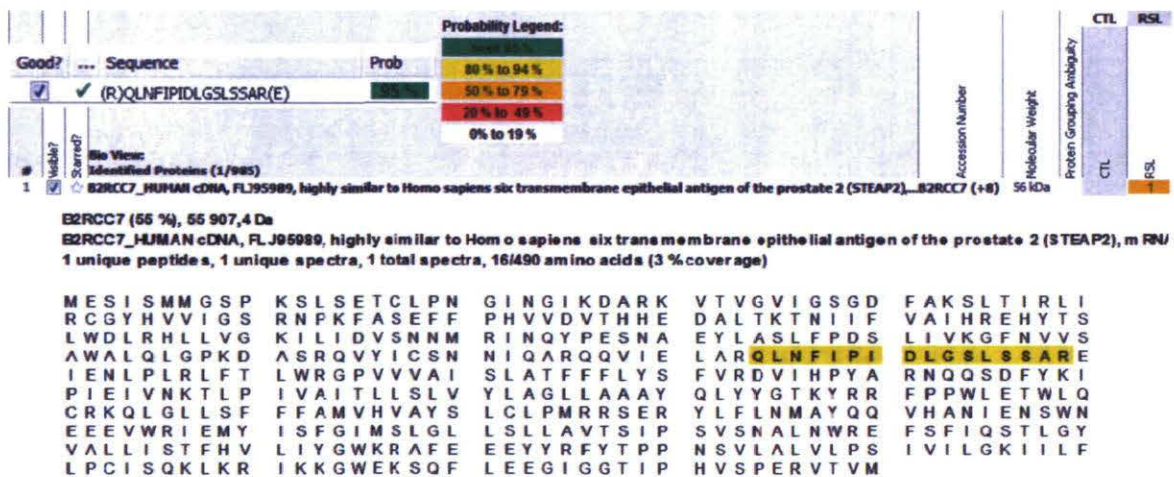
RETICULON3



## SAR1a



## STEAP2





TMCO1

Good?	Sequence	Prob
<input checked="" type="checkbox"/>	(K)LPFTPLSYIQGLSHR(N)	100%
<input checked="" type="checkbox"/>	(K)LPFTPLSYIQGLSHR(N)	88%

Probability Legend:

- Over 95%
- 80% to 94%
- 50% to 79%
- 20% to 49%
- 0% to 19%

Accession Number: B7Z591 (+3)  
Molecular Weight: 20 kDa  
Protein Grouping Ambiguity: CTL, RSL

Bio View:  
Identified Proteins (1/985)  
1 B7Z591\_HUMAN cDNA FLJ50833, highly similar to Transmembrane and coiled-coil domains protein 1... B7Z591 (+3)  
B7Z591 (56%), 19 898,5 Da  
B7Z591\_HUMAN cDNA FLJ50833, highly similar to Transmembrane and coiled-coil domains protein 1 [Homo sapiens (Human) [9606]]  
1 unique peptide, 1 unique spectra, 2 total spectra, 16/176 amino acids (9% coverage)

```

M E S I A E F S L V   S G I T W V L V Y R   T D K Y K R L K A E   V E K Q S K K L E K   K K E T I T E S A G
R Q Q K K I E R Q   E E K L K N N R D   L S M V R M K S M F   A I G F C F T A L M   G M F N S I F D G R
V V A K L P F T P L   S Y I Q G L S H R N   L L G D D T T D C S   F I F L Y I L C T M   S I R Q N I Q K I L
G L A P S R A A T K   Q A C G F L C P P P   P S C K F S

```

## **Chapitre 4: Protéines qui interagissent avec la forme nucléaire d'AibZIP**

### **Mise en situation**

Dans le cadre de ce chapitre, je me suis intéressée de plus près à la forme nucléaire d'AibZIP. Il s'agit de résultats portant sur les partenaires de la forme active d'AibZIP. Le manuscrit présenté ici sera soumis sous peu pour publication. Les données qu'il englobe représentent une autre section de mes recherches de doctorat dont je suis la principale auteure. J'ai réalisé toutes les figures présentées dans cet article mis à part la figure 4-2 b et l'expérience d'immunoprécipitation de chromatine réalisées par ma collègue Sonia Djebbar. De plus le clone stable inductible produisant la forme nucléaire d'AibZIP a été généré et caractérisé par notre professionnelle de recherche Andréa Fournier.

AibZIP (Androgen-Induced bZIP) est un facteur de transcription appartenant à la famille ATF/CREB (Qi, Fillion et al. 2002). Cette famille constitue une des plus grandes classes de facteurs de transcription de type activateur. Cette famille est conservée à travers les eucaryotes et assure une multitude de processus critiques à la fonction de l'organisme (Deppmann, Alvania et al. 2006). Les facteurs de transcription de la famille ATF/CREB se trouvent dans la cellule sous leur forme inactive. En réponse à un stimulus particulier, ils sont activés par plusieurs mécanismes comme la phosphorylation ou le clivage protéolytique pour pouvoir réguler l'expression de leurs gènes cibles. Depuis les années 2000, 5 nouveaux membres bZIP appartenant à cette superfamille ont été découverts. Au-delà de la forte homologie observée entre leurs domaines bZIP, ces facteurs de transcription incarnent une sous-famille de bZIP impliquée dans le stress du réticulum endoplasmique (RE). Cette sous-famille se compose de CREB3/Luman (cAMP responsive element binding protein3), d'OASIS/CREB3L1 (old astrocyte specifically-induced substance), de BBF2H7/CREB3L2 (BBF2 human homolog on chromosome 7), de CREBH/CREB3L3 (CRE-binding and hepatocyte-specific factor) et d'AibZIP/CREB3L4. Tous les membres

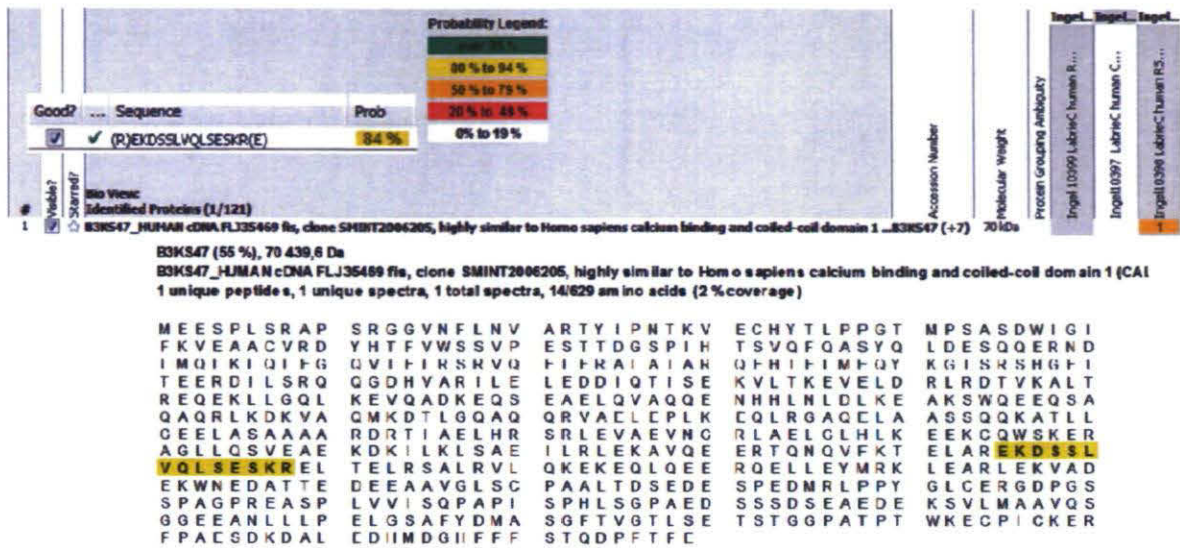
de cette sous-famille sont régulés par le mécanisme RIP (Regulated intramembrane proteolysis). Cependant, chacun est sollicité dans un contexte particulier.

L'altération des niveaux calciques au RE induit un stress et provoque, par conséquent, le clivage d'AlbZIP par les protéases S1P (Site-1 protease) et S2P (Site-2 protease). Par suite, la forme active libérée migre au noyau, lie le promoteur du gène cible sous forme de dimère et recrute ses cofacteurs ainsi que la machinerie de transcription pour induire la transcription. Grâce à une étude publiée en 2007 par notre équipe, nous avons réussi à identifier une panoplie de gènes cibles d'AlbZIP (Ben Aicha, Lessard et al. 2007). La caractérisation de ces gènes nous a même amené à identifier certaines séquences consensus liées par AlbZIP. Ainsi, identifier les protéines qui interagissent avec la forme nucléaire d'AlbZIP nous aidera à connaître le complexe protéique qu'elle recrute au niveau de ses séquences consensus et à comprendre, par conséquent, son mécanisme d'action au noyau (Ben Aicha, Lessard et al. 2007).

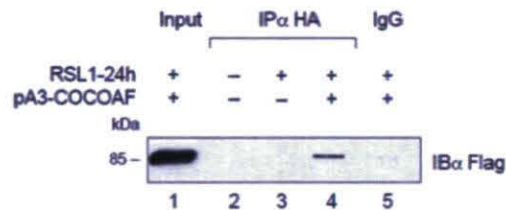
Pour réaliser cette étude, j'ai utilisé, dans un premier temps, le système de purification par affinité en tandem TAP (tandem affinity purification). Grâce au projet d'identification des partenaires d'AlbZIP au RE, que je menais en parallèle et qui a sollicité beaucoup de tentatives, j'ai vite compris que ce système de purification ne serait pas adéquat pour l'expérience que je voulais mener. Certes, les deux purifications successives permettent une diminution importante de la contamination par de faux positifs. Néanmoins, le rendement de l'élution finale est très faible et, par conséquent, difficilement analysable par spectrométrie de masse. J'ai alors utilisé un clone stable exprimant, de façon inductible, la forme nucléaire d'AlbZIP fusionnée en N-terminal avec deux épitopes HA. Les protéines associées ont été purifiées par chromatographie sur une colonne de résine couplée à l'anticorps anti-HA. Cette expérience a permis d'identifier plusieurs partenaires potentiels de la forme nucléaire d'AlbZIP. Deux d'entre eux ont été confirmés par immunoprécipitation et essai de type «pull down». Le premier est CALCOCO1 (calcium binding and coiled-coil domain 1) (Figure 4-I). Chez l'homme, COCOA est le produit du gène Calcoco1 et agit comme un deuxième coactivateur des récepteurs nucléaires. Cette protéine a été identifiée parmi les composants du complexe des coactivateurs des récepteurs nucléaires contenant CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase),

p300/CBP (p300/CREB-binding protein) et GRIP1 (glucocorticoid receptor-interacting protein 1). L'ensemble de ces protéines interagit avec le coactivateur  $\beta$  Catenin. Cette protéine est un composant important de la voie de signalisation du récepteur Wnt. L'interaction des différents composants du complexe des coactivateurs secondaires aide la  $\beta$  Catenin à induire la transcription via le facteur des cellules T TCF (T-cell factor) ou via le récepteur des androgènes (Yang, Kim et al. 2006).

A



B



C



**Figure 4-I:** CALCOCO1/COCOA, un nouveau partenaire d'AIBZIP identifié par spectrométrie de masse. A. La validation de l'identification de la protéine COCOA a été réalisée par le programme Scaffold. B et C. COCOA interagit avec la forme nucléaire d'AIBZIP *in vivo*. L'immunoprécipitation de la forme nucléaire recombinante 2HA-A290 (clone 70-2) avec l'anticorps anti-HA (B, piste 4) ou de la forme nucléaire endogène avec l'anticorps anti-515 (reconnait le domaine N-ter d'AIBZIP) (C, piste 4) permet de récupérer la protéine recombinante COCOA-Flag.

Le deuxième est WDR5 et sera présenté dans le chapitre suivant sous forme d'article.

# **WDR5, a histone methyltransferase adaptor protein, participates in transcriptional activation by the processed form of the ER stress-regulated transcription factor AIBZIP**

Hejer Boutej, Sonia Djebbar, Andréa Fournier, Claude Labrie.

## **1. Résumé**

Androgen-Induced bZIP (AIBZIP) est un facteur de transcription bZIP membre de la sous-famille de CREB3. La protéine pleine longueur est localisée au réticulum endoplasmique (RE) et elle est activée par protéolyse en réponse au stress du RE. L'objectif de la présente étude était d'identifier les protéines qui interagissent avec la forme active d'AIBZIP. Des expériences d'immunoprécipitation à large échelle ont été réalisées dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP qui expriment de façon inductible la forme nucléaire d'AIBZIP recombinante et les protéines associées à AIBZIP ont été identifiées par spectrométrie de masse. WDR5 (WD domain containing protein) a été identifiée parmi les partenaires de la forme nucléaire d'AIBZIP. Des expériences de co-immunoprécipitation ont confirmées que les protéines recombinantes et endogènes interagissent ensemble. De plus, des expériences de type «pull down» ont montré que WDR5 interagit directement avec le domaine bZIP d'AIBZIP. Encore, WDR5 induit l'activation de la transcription via AIBZIP puisque l'élimination de WDR5 par un ARN d'interférence diminue l'activation de la transcription via AIBZIP alors que la surexpression de WDR5 produit l'effet opposé. Finalement, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont montré qu'AIBZIP recrute WDR5 au niveau de régions régulatrices endogènes. Grâce à cette étude, nous avons identifié une nouvelle interaction entre un facteur de transcription régulé par le stress et WDR5 ce qui nous donne un nouvel aperçu sur le mécanisme d'action d'AIBZIP et WDR5.

## 2. Abstract

Androgen-Induced bZIP (AibZIP) is a member of the CREB3-like family of bZIP transcription factors. Full-length AibZIP localizes to the endoplasmic reticulum and is activated by proteolysis in response to ER stress. The objective of the present study was to identify proteins that interact with the transcriptionally active form of AibZIP. Large-scale immunoprecipitations were conducted in an LNCaP prostate cancer cell line that expresses an epitope-tagged form of AibZIP and AibZIP-associated proteins were identified by mass spectrometry following tryptic digestion. Peptides derived from the WD domain-containing protein WDR5, a histone methyltransferase adaptor protein, were recovered in AibZIP protein complexes. Co-immunoprecipitation experiments confirmed that epitope-tagged and endogenous forms of AibZIP and WDR5 interact with each other. GST pull-down experiments indicate that WDR5 interacts directly with the bZIP domain of AibZIP. In addition, WDR5 contributes to AibZIP-induced transcription activation since WDR5 depletion by siRNA diminished transcriptional activation by AibZIP whereas WDR5 overexpression produced the opposite effect. Finally, chromatin immunoprecipitation experiments show that AibZIP recruits WDR5 to endogenous regulatory elements. Taken together, this study identifies a novel interaction between a stress-regulated transcription factor and WDR5 and provides new insight into the molecular mechanism of action of AibZIP and WDR5.

## 3. Introduction

In eukaryotic cells, the endoplasmic reticulum (ER) regulates the folding, maturation and transport of newly synthesized proteins destined for the secretory pathway (Nicchitta 2002). Conditions that alter protein folding result in the perturbation of the internal environment of the ER and lead to ER stress. To cope with the resulting stress, cells elicit an adaptive signalling cascade called the Unfolded Protein Response (UPR) (Malhotra and Kaufman 2007). This response reduces the amount of newly synthesized proteins, increases the production of molecular chaperones and induces the degradation of unfolded protein via the ERAD pathway (Kaufman 2002). One of the key transducers of this response is activating transcription factor 6 (ATF6), a bZIP transcription factor of the ATF/CREB family. ATF6 is localized at the ER membrane as a type II transmembrane protein and



binds to the chaperone BiP/GRP78/HSPA5 (IgG heavy chain-binding protein; glucose regulated protein, 78 KDa; heat shock 70 KDa protein 5) via its intraluminal regulatory domain. When unfolded proteins accumulate, ATF6 is translocated to the Golgi apparatus where it is cleaved by the proteases S1P and S2P (Ma and Hendershot 2002). Once in the nucleus, the processed form of ATF6 activates the transcription of target genes by binding to the cAMP response element (CRE) and the ER stress response element (ERSE) (Malhotra and Kaufman 2007).

The recently identified CREB3 family of bZIP proteins (CREB3/LUMEN/LZIP; OASIS/CREB3L1; BBF2H7/CREB3L2; CREBH/CREB3L3 and AIBZIP/CREB3L4) are structurally related to ATF6 and are also regulated through ER-stress induced proteolytic processing in a manner akin to ATF6 (Labrie, Lessard et al. 2008). Androgen-induced bZIP (AIBZIP) is a prostate-enriched transcription factor the expression of which is up-regulated by androgens in a dose-dependent manner (Qi, Fillion et al. 2002). AIBZIP can be processed to its transcriptionally active form in cells exposed to drugs that disturb calcium homeostasis (i.e. the ionophore A23187) (Ben Aicha, Lessard et al. 2007). The recombinant processed form of AIBZIP activates transcription via the unfolded protein response element (UPRE, TGACGTGG ) and endoplasmic reticulum stress response element 2 (ERSEII, ATTGGNGCCACG). A search for AIBZIP-regulated genes using high-density oligonucleotide microarrays identified several potential targets including ER proteins as well as proteins involved in diverse and poorly understood signalling pathways (Ben Aicha, Lessard et al. 2007).

To gain a better understanding of the molecular mechanisms involved in gene regulation by AIBZIP we sought to identify proteins that interact with the processed form of AIBZIP in human prostate cancer cells. For this purpose, we generated a cell line that conditionally expresses an epitope-tagged recombinant form of processed AIBZIP and isolated AIBZIP-binding proteins by coimmunoprecipitation followed by mass spectrometry. One of the AIBZIP-binding proteins we identified is WDR5, a highly conserved WD40-repeat protein involved in histone methylation. We show here that the nuclear form of AIBZIP recruits WDR5 to endogenous regulatory elements and this cofactor contributes to AIBZIP-induced transcription activity.

## **4. Materials and methods**

### **4.i Cell lines**

LNCaP cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultured as described (Lessard et al., 2007). The modified RheoSwitch conditional expression system vectors have been described previously (Lessard et al., 2007). Clone 6-6 was obtained by transfecting LNCaP cells with a plasmid (pZRD) that constitutively produces the RheoSwitch transcription factors, the green fluorescent protein hrGFP and the Zeocin resistance gene. Clone 70-2 was generated by stably transfecting LNCaP cells with plasmid pRZ-2HA-A290 that contains all of the above elements in addition to an inducible expression cassette that encodes the first 290 amino acids of AibZIP fused to two copies of the HA epitope (YPYDVPDYASL) (NH<sub>2</sub>-terminal) at its amino terminus. The inducing agent RSL1 was purchased from New England Biolabs. Plasmid construction details are available upon request.

### **4.ii Whole cell extracts**

Cells were pelleted and homogenized in buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)) at a ratio of 1.33 ml per g of cells. The mixture was then passed through a 22-gauge needle 30 times. Buffer B (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1.26M K acetate, glycerol 75%, complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)) was added at a ratio 1/1 (ml/g of cells) and the mixture was passed through a 22-gauge needle 30 times. The lysate was incubated 30 min at 4°C on an orbital shaker and centrifuged at 37,000 rpm for 3hr at 4°C in a 70 Ti rotor (Beckman). The soluble fraction was dialyzed overnight using a snakeskin Pleated Dialysis Tubing (10000 MWCO, Pierce) in 3 l dialysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.1 M K acetate). The following day, cell extracts were centrifuged at 14,000 rpm for 30 min at 4°C.

### **4.iii Large scale co-immunoprecipitation experiment**

Whole cell extracts were prepared as described previously from clone 6-6 and clone 70-2 exposed to RSL1 (500 nM) for 24 hr. Approximately  $4.2 \times 10^9$  cells were used for each condition. 2HA-A290 or empty vector complexes were immunoprecipitated with anti-HA agarose affinity resin overnight at 4°C on an orbital shaker. The following day, the beads were recovered by centrifugation and washed three times with 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1% NP40 buffer and eluted with HA peptide according to the manufacturer's instructions. Samples processed for MALDI-TOF were subjected to SDS-PAGE and colloidal blue staining. Bands (1 cm<sup>2</sup>) corresponding to the total eluate were excised directly from the gel. The in-gel digest and mass spectrometry experiments were performed by the Proteomics platform of the Eastern Quebec Genomics Center, Quebec, Canada.

### **4.iv Protein in-gel digestion**

Bands of interest were extracted from gels and placed in 96-well plates and then washed with water. Trypsin digestion was performed on a MassPrep liquid handling robot (Waters, Milford, USA) according to the manufacturer's specifications and to the protocol of Shevchenko et al (Shevchenko, Wilm et al. 1996) with the modifications suggested by Havlis et al (Havlis, Thomas et al. 2003). Briefly, proteins were reduced with 10mM DTT and alkylated with 55 mM iodoacetamide. Trypsin digestion was performed using 105 mM of modified porcine trypsin (Sequencing grade, Promega, Madison, WI) at 58°C for 1 h. Digestion products were extracted using 1% formic acid/ 2% acetonitrile followed by 1% formic acid/50% acetonitrile. The recovered extracts were pooled, vacuum centrifuge dried and then resuspended into 7 µl of 0.1% formic acid and 3 µl were analyzed by mass spectrometry.

### **4.v Mass spectrometry**

Peptide samples were separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary liquid chromatography (nanoLC) and analyzed by electrospray mass spectrometry (ES MS/MS). The experiments were performed with a Thermo Surveyor MS pump connected to a LTQ linear ion trap mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ion source

(ThermoFisher, San Jose, Ca USA). Peptide separation took place on a self-packed PicoFrit column (New Objective, Woburn, MA) packed with Jupiter (Phenomenex) 5u, 300A C18, 10 cm x 0.075 mm internal diameter. Peptides were eluted with a linear gradient from 2-50% solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) in 30 minutes, at 200 nL/min (obtained by flow-splitting). Mass spectra were acquired using a data-dependent acquisition mode using Xcalibur software version 2.0. Each full scan mass spectrum (400 to 2000 m/z) was followed by collision-induced dissociation of the seven most intense ions. The dynamic exclusion (30 sec exclusion duration) function was enabled, and the relative collisional fragmentation energy was set to 35%.

#### **4.vi Database searching**

All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.02.01). Mascot was set up to search the uniref100\_14\_7\_Homo\_sapiens\_9606 database (98017) assuming the digestion enzyme trypsin. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.50 Da and a parent ion tolerance of 2.0 Da. Iodoacetamide derivative of cysteine was specified as a fixed modification and oxidation of methionine was specified as a variable modification. Two missed cleavages were allowed.

#### **4.vii Criteria for protein identification**

Scaffold (version Scaffold\_3\_00\_04, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm (Keller, A et al *Anal. Chem.* 2002;74(20):5383-92). Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability and contained at least 2 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Nesvizhskii, AI *Anal Chem.* 2003 Sep 1;75(17):4646-58). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

#### 4.viii Candidate protein validation by co-IP

LNCaP cells and LNCaP cells that conditionally express the HA-tagged N-terminal fragment of AIBZIP (clone 70-2) were used for immunoprecipitation analysis.

For experiments performed in Clone 70-2, 10 cm<sup>2</sup> dishes were transfected with 16 µg of pA3-WDR5-Flag/dish using Lipofectin. The culture medium was changed approximately 16 hr after transfection and cells were treated with the inducing agent RSL1 (500 nM) or the corresponding vehicle for 24 hr. 48 hr after transfection, cells were collected and pellet was resuspended in IP buffer (TNES) (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) NP40 and complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)) for 1 hr at 4°C on an orbital shaker. The insoluble material was recovered by centrifugation and the supernatant was transferred into new tubes. Soluble fractions were pre-cleared with 40 µl of protein A sepharose beads (50 % slurry) for 4 hr at 4°C on an orbital shaker. Beads were discarded by centrifugation at 3000 rpm for 3 min and supernatant protein concentration was quantified using the DC Protein Assay (Bio-Rad). Cell lysates were incubated overnight with anti-rabbit IgG (Jackson IR lab), anti HA antibody (Santa-Cruz), anti-mouse IgG (Jackson IR lab) or anti-FLAG agarose resin (Promega) at 4°C on an orbital shaker. The next day, 50 µl of protein A sepharose beads were added to each sample for 1 hr at 4°C, (except those incubated with anti-FLAG resin). Beads were pelleted by centrifugation, washed 3 times with washing buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 180 mM NaCl, 1% (v/v) NP40). Bound proteins were eluted by boiling 10 min in sample loading buffer freshly supplemented with 100 mM DTT. Samples were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using anti-FLAG or anti-HA antibodies.

To immunoprecipitate endogenous proteins, LNCaP cells were treated with A23187 (2 µM) for 6 hr. Nuclear extracts were prepared as described previously (Ben Aïcha et al., 2007) and processed for immunoprecipitation as described above. Cell lysates were incubated overnight with anti-WDR5 antibody, an affinity-purified rabbit polyclonal antibody against AIBZIP (AB515) or anti-rabbit IgG at 4°C on an orbital shaker. After extensive washing, the precipitated proteins were subjected to western blot analysis using anti-WDR5 or anti-AIBZIP antibodies.

#### **4.ix Production of GST fusion proteins**

GST, GST-A290 and GST-WDR5 (kindly provided by Dr. Jean François Couture) fusion proteins were expressed in *E. coli* strain BL21 grown at 37°C in LB medium containing 50 µg/ml ampicillin. When the density of the cell cultures reached an O.D. value between 0.8 and 2.0, protein production was induced with 1 mM isopropyl β-thiogalactopyranoside overnight at room temperature. The following day cells were collected by centrifugation and pellets were resuspended in pull-down lysis (NETN) buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) NP40, 5% (v/v) glycerol, complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)). The cells were sonicated and insoluble material was pelleted by centrifugation at 12,000 rpm at 4°C. The supernatants were transferred to new tubes and GST fusion proteins were conjugated to glutathione sepharose 4B fast flow beads (GE healthcare) overnight at 4°C on an orbital shaker. The beads were recovered by centrifugation and washed three times with NETN buffer.

#### **4.x Pull down assays**

Recombinant proteins were produced *in vitro* using the TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) with T7 polymerase according to the manufacturer's instructions. GST fusion proteins (5-10 µg) were added to 10% of TNT reaction or to nuclear extracts of LNCaP cells treated with A23187 (2 µM) for 6 hr. The pull down assay is incubated overnight at 4°C on an orbital shaker. The beads were recovered by centrifugation and washed three times with NETN buffer. Pellets were resuspended in sample loading buffer (60 mM tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM DTT and 0.1% bromophenol blue), boiled, separated on 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane for immunoblotting.

#### **4.xi Luciferase assays**

Plasmid pGL3-UPRE contains five copies of the unfolded protein response element (UPRE, 5'-TGACGTGG-3') cloned upstream of a TATA box (5'-TATATAA-3'). Cells in 12 well plates were transfected with 1.375 µg DNA/well using Lipofectin as follows: 250 ng firefly luciferase reporter plasmid, 125 ng pRL-null (to correct for transfection efficiency), 5, 10 or 50 ng pA3-A290HA, 250 ng pA3-WDR5-Flag, completed with empty

pA3 vector. The culture medium was changed approximately 16 hr after transfection and the cells were harvested 24 hr later. Firefly and renilla luciferase activities were determined using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)

#### **4.xii Antibodies**

Mouse monoclonal anti-CREB3L4 (Novus Biological), rabbit polyclonal anti-WDR5 (Upstate), rabbit polyclonal anti-WDR5 was kind gift of Dr. W. Herr, mouse monoclonal and rabbit polyclonal anti-HA (Santa Cruz), mouse monoclonal anti-Flag (Sigma), an affinity-purified rabbit polyclonal antibody (AB515) that was raised against a peptide of mouse AIBZIP (LPSHLPLTKAEERILKK) which is nearly identical (16 of 17 residues) to residues 204–220 of human AIBZIP, peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories), anti-HA agarose affinity resin and anti-FLAG affinity resin (Sigma-Aldrich).

#### **4.xiii ChIP**

Clone 70-2 cells in 15 cm dishes were treated with inducing agent RSL1 (500 nM) or RSL1 vehicle (DMSO) for 24 hr. Cells were fixed in 1% formaldehyde for 1 hr at room temperature. The purified chromatin was sonicated in order to obtain fragments of approximately 600 pb in length. Recombinant 2HA-A290 and endogenous WDR5 proteins were immunoprecipitated using mouse monoclonal anti-HA (Santa Cruz) and rabbit polyclonal anti-WDR5 (Upstate) antibodies, respectively. Anti-mouse IgG was used as a negative control. To detect CREB3 fragment in protein-DNA complexes, a 300-bp fragment corresponding to exon1-exon3 region of CREB3 gene was amplified by PCR using oligonucleotides 5'-GGAAAGCGTGGGATGTCCAT-3' (+126 to +146) and 5'-TGGTCATGGTGGACAAGGCA-3' (+298 to +318). The positions of primers used to detect the  $\beta$  actin gene fragment are (-212 to -190) and (-72 to -48).

#### **4.xiv Immunostaining**

To detect endogenous WDR5 in LNCaP cells or epitope-tagged proteins in transfected LNCaP cells, the cells were fixed in a 10% formalin solution for 1 hr, then stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear stain (15 min at RT) and permeabilized with

0.2% Triton X-100 in TBS (15 min at RT). Cells were blocked for 1 hr in 2% fat-free milk and then incubated with either rabbit polyclonal anti-WDR5 antibody (1:1000) (Upstate), mouse monoclonal anti-Flag (1:1000) (Sigma) or rabbit polyclonal anti-HA antibody (1:1000) (Santa Cruz), overnight at 4°C. The cells were then incubated with Alexa 594-labeled goat anti-mouse IgG or Alexa 488-labeled goat anti-rabbit IgG for 1 hr at RT. Cover slips were mounted on slides, visualized with a fluorescence microscope and images were captured by a digital camera (Leica DFC 350 FX).

#### **4.xv WDR5 knockdown in LNCaP cells**

The human WDR5 siRNA SMART pool consisting of four siRNA duplexes was purchased from Dharmacon. LNCaP cells were transfected with siRNA SMART pool using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

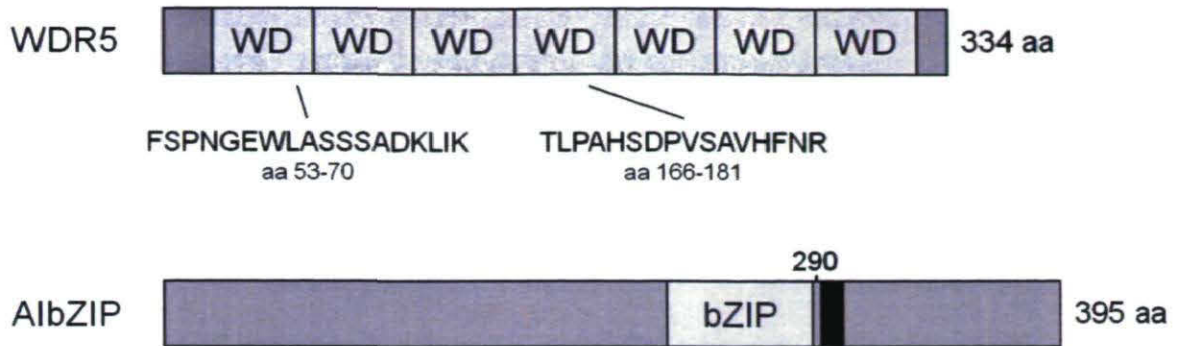
## **5. Results**

### **5.i AIBZIP interacts with WDR5**

To identify proteins that interact with the processed form of the ER stress-regulated transcription factor AIBZIP, large-scale co-immunoprecipitations were performed in a cell line that conditionally expresses an epitope-tagged form of the transcriptionally active N-terminal fragment of AIBZIP designated 2HA-A290. This recombinant AIBZIP protein consists of two N-terminal HA epitopes appended to the transcriptional activation and bZIP domains of AIBZIP (aa 2-290). As a negative control, an identical co-immunoprecipitation was performed in a cell line that does not produce recombinant AIBZIP. Tryptic fragments of AIBZIP-associated proteins were sequenced by mass spectrometry.

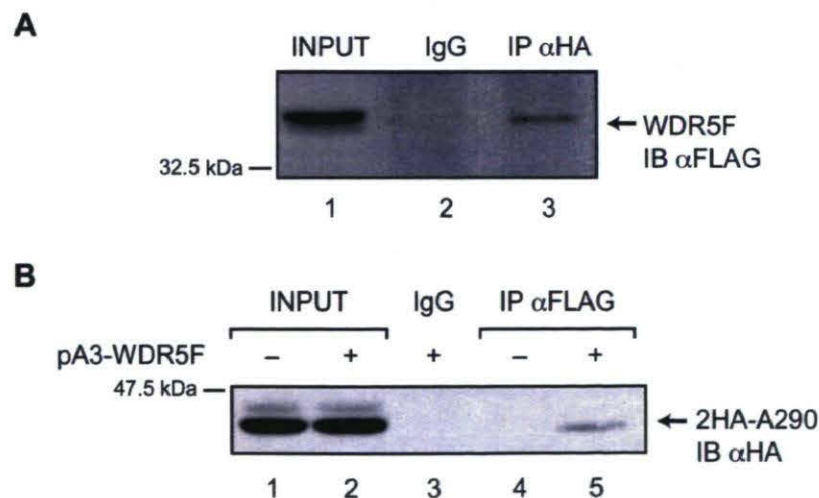
Two of the peptides that were identified in AIBZIP-expressing cells but not in control cells correspond to aa 53-70 and 166-181 of WDR5, a member of the WD repeat family of proteins (Fig. 4-1).





**Figure 4-1:** Schematic domain structure of human WDR5 and AibZIP. The seven WD domains of WDR5 are shown as are the sequences and positions of the peptides identified by mass spectrometry. The positions of the bZIP domain (aa 219-280) and transmembrane segment (black box) of AibZIP are illustrated. The recombinant processed forms of AibZIP that were used in this study contain the first 290 aa of the protein.

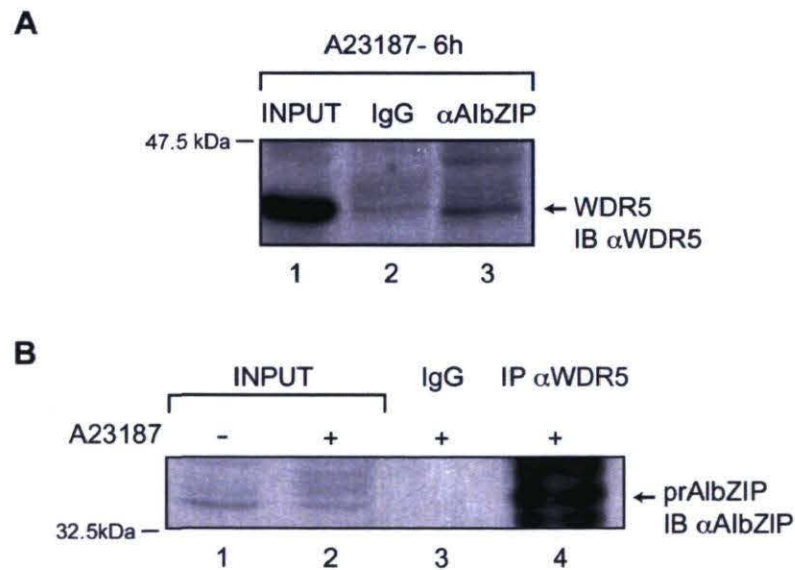
To validate the results of the MS analysis, FLAG-tagged WDR5 was transiently expressed in LNCaP cells that conditionally express 2HA-A290 and co-immunoprecipitations were performed using antibodies against each tagged protein. As shown in Figure 4-2A, FLAG-tagged WDR5 was recovered when 2HA-A290 was immunoprecipitated using an anti-HA antibody. Conversely, 2HA-A290 was recovered when FLAG-tagged WDR5 was immunoprecipitated using an anti-FLAG antibody (Fig. 4-2B). These interactions were not seen when immunoprecipitations were performed using IgG as a negative control. These experiments confirmed that epitope-tagged AibZIP and WDR5 interact when co-expressed in LNCaP cells.



**Figure 4-2:** Transiently expressed WDR5 interacts with AibZIP. FLAG-tagged WDR5 (WDR5-F) was transiently expressed in an LNCaP cell line that conditionally produces the

HA-tagged amino-terminal fragment of AibZIP (2HA-A290). (A) WDR5-F was detected by immunoblotting with anti-FLAG antibody following immunoprecipitation of 2HA-A290 with an anti-HA antibody. (B) 2HA-A290 was detected by immunoblotting with anti-HA antibody following immunoprecipitation of WDR5-F with an anti-FLAG antibody.

We next sought to verify if the endogenous AibZIP and WDR5 proteins interact. As mentioned previously, the full-length AibZIP protein localizes to the ER and its transcriptionally active N-terminal fragment is generated by regulated intramembrane proteolysis in response to ER stress. We therefore treated LNCaP cells with A23187 for 6 hr to induce AibZIP processing and performed immunoprecipitations using antibodies directed against each protein. The AibZIP antibody (AB515) was generated against an epitope within the N-terminal fragment of AibZIP whereas the anti-WDR5 antibody was generously provided Dr. Winship Herr (Wysocka, Myers et al. 2003). As shown in Figure 4-3A, WDR5 was recovered when AibZIP was immunoprecipitated from nuclear extracts of A23187-treated cells. Conversely, the processed form of AibZIP was recovered following immunoprecipitation of WDR5 (Fig. 4-3B). These interactions were not seen when immunoprecipitations were performed using IgG as a negative control. These experiments convincingly show that the processed form of AibZIP interacts with WDR5.

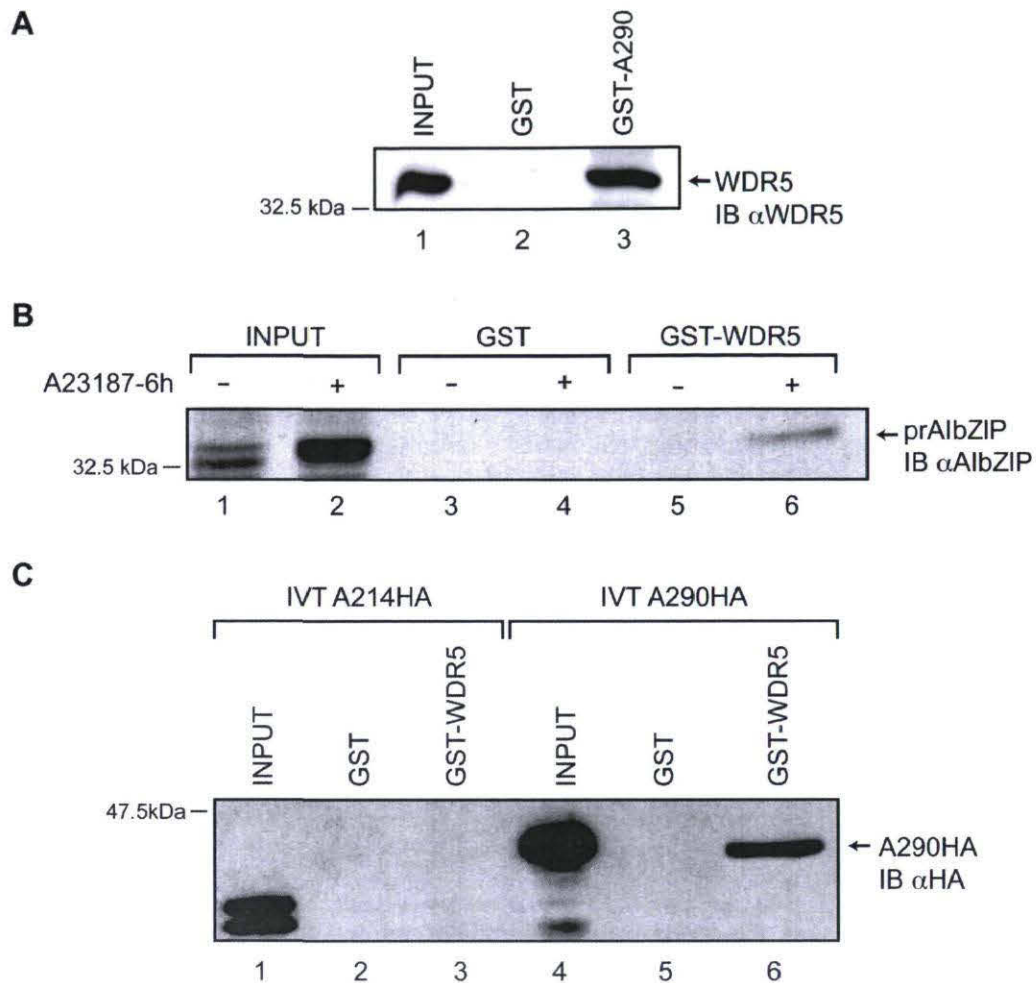


**Figure 4-3:** WDR5 interacts with AibZIP *in vivo*. LNCaP cells were treated with A23187 to induce ER stress and the processing of endogenous AibZIP to its transcriptionally active form. (A) WDR5 was detected by immunoblotting with anti-WDR5 antibody following immunoprecipitation of endogenous AibZIP with an anti-AibZIP antibody (AB515). (B) Processed AibZIP (prAibZIP) was detected by immunoblotting with anti-AibZIP antibody following immunoprecipitation of endogenous WDR5 with an anti-WDR5 antibody.

## 5.ii WDR5 interacts directly with AIBZIP

To further confirm the interaction between AIBZIP and WDR5, we conducted pull-down experiments using GST fusion proteins as baits and nuclear extracts of LNCaP cells. We first incubated nuclear extracts of LNCaP cells with either GST alone or GST fused to the N-terminal fragment of AIBZIP (GST-A290). As shown in Figure 4-4A, WDR5 bound to GST-A290 but not to GST alone. We then performed the reverse experiment by incubating nuclear extracts of LNCaP cells with a GST-WDR5 fusion protein (generously provided by Dr. Jean-François Couture). As shown in Figure 4-4B, nuclear extracts of LNCaP cells treated with A23187 contained significantly more AIBZIP than control extracts (lanes 1 and 2). Accordingly, an interaction between processed AIBZIP and GST-WDR5 was detected in A23187-treated cells but not in control cells (lanes 5 and 6).

To determine if AIBZIP interacts directly with WDR5, HA epitope-tagged recombinant AIBZIP proteins containing the first 214 amino acids (A214HA) or the first 290 amino acids (A290HA) of AIBZIP were synthesized *in vitro* and incubated with GST-WDR5. As shown in Figure 4-4C, A290HA interacted with GST-WDR5 whereas A214HA did not. Neither protein interacted with GST alone. These results indicate that AIBZIP interacts directly with WDR5 and that this interaction is mediated by residues within the bZIP domain of AIBZIP (aa 219-280).



**Figure 4-4:** WDR5 interacts directly with AIBZIP. (A) Nuclear extracts of LNCaP cells were incubated with GST or GST-A290 and WDR5 was detected by immunoblotting using anti-WDR5 antibody. (B) Nuclear extracts of untreated LNCaP cells (-) or LNCaP cells treated with A23187 for 6 hr (+) were incubated with GST or GST-WDR5. Processed AIBZIP (prAIBZIP) was detected by immunoblotting with anti-AIBZIP antibody. (C) HA-tagged recombinant proteins containing the first 214 (A214HA) or first 290 (A290HA) residues of AIBZIP were incubated with GST or GST-WDR5 and detected by immunoblotting using anti-HA antibody.

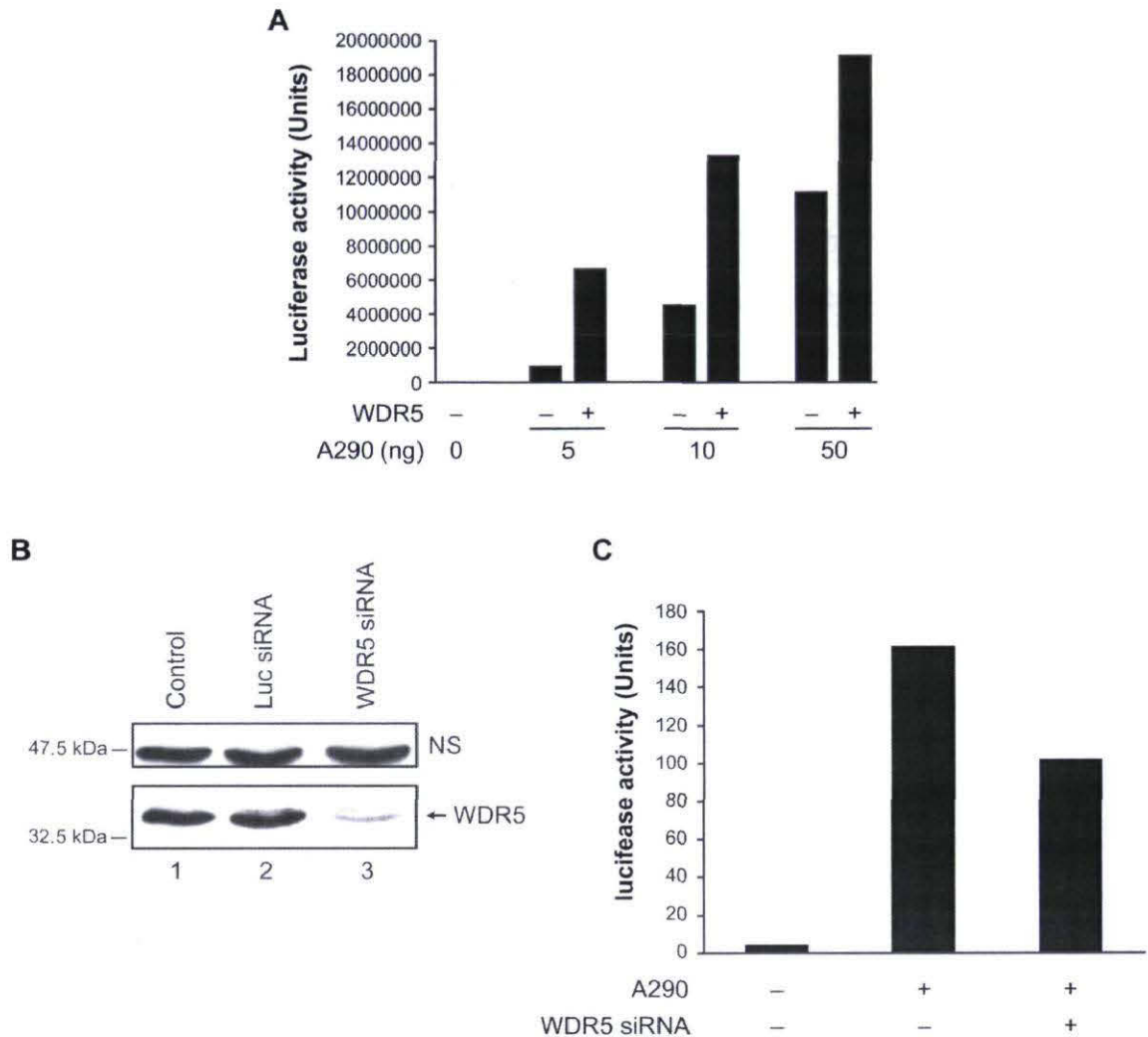
### 5.iii WDR5 contributes to transcriptional activation by AIBZIP

WDR5 is important for methylation of lysine 4 in histone H3 and functions to activate gene expression (Wysocka, Swigut et al. 2005), which led us to hypothesize that WDR5 might be implicated in transactivation by AIBZIP. We therefore tested the effect of WDR5

overexpression and knockdown on a synthetic AibZIP-responsive luciferase reporter construct.

The regulatory regions of some genes that are induced during ER stress contain unfolded protein response elements (UPRE, 5'-TGACGTGG-3') that mediate activation by stress-activated bZIP transcription factors. As shown in Figure 4-5A, when a UPRE-luciferase reporter gene was co-transfected with increasing amounts of a plasmid encoding A290 in LNCaP cells, A290 produced a dose-dependent increase in luciferase activity. In addition, coexpression of WDR5 produced a further increase in luciferase activity, which suggests that WDR5 does in fact contribute to gene activation by AibZIP.

To verify this theory, we silenced WDR5 expression in LNCaP cells using a validated pool of siRNAs (Wysocka, Swigut et al. 2005). As observed in other cell lines, these siRNAs caused a marked decrease in WDR5 protein levels in LNCaP cells (Fig. 4-5B). Interestingly, silencing of WDR5 reduced AibZIP-induced activation of the UPRE-luciferase reporter gene (Fig. 4-5C). Taken together, these results strongly suggest that WDR5 contributes to transcriptional activation by AibZIP.



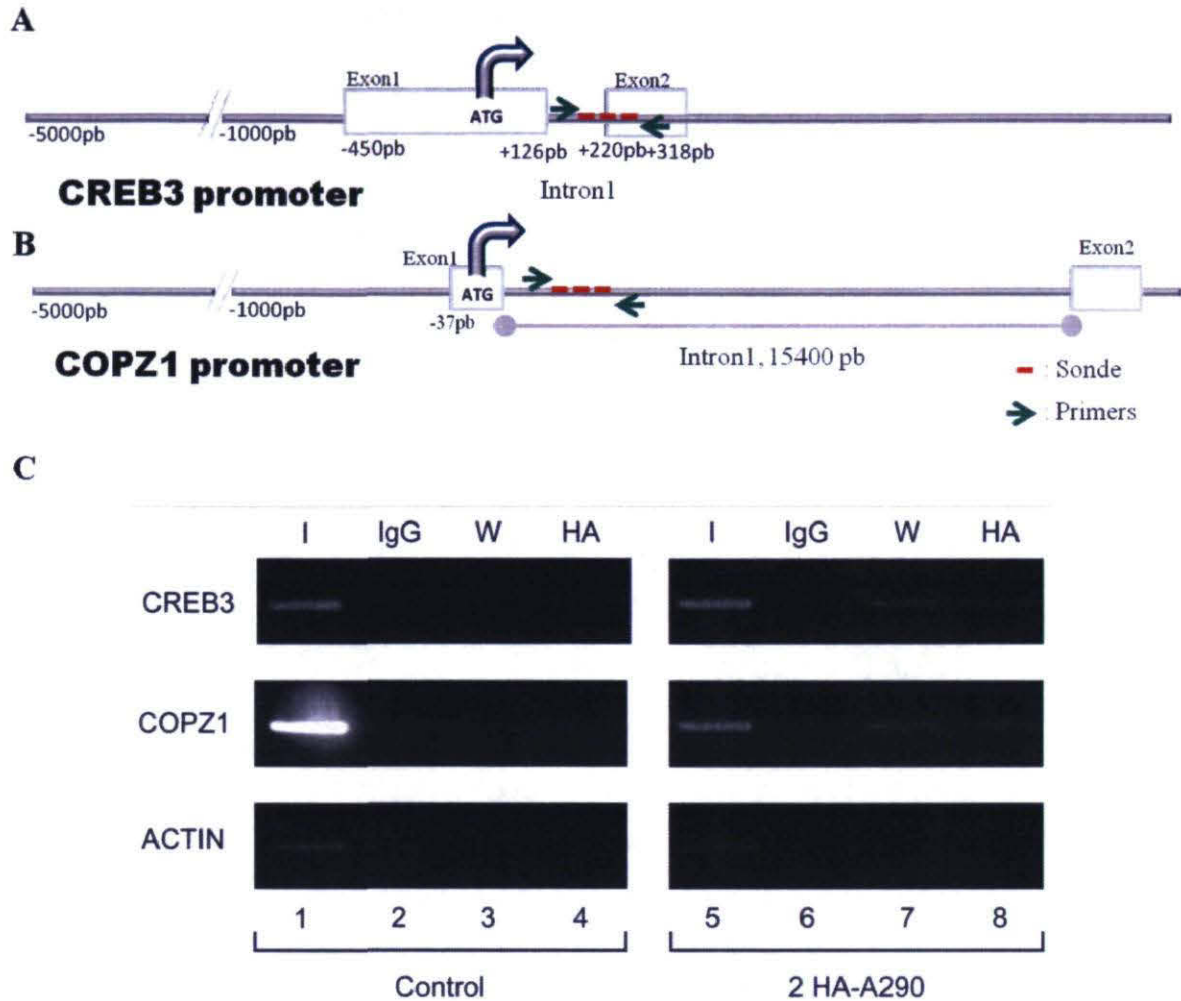
**Figure 4-5:** WDR5 contributes to transcriptional activation by AibZIP. (A) LNCaP cells were transfected with a UPRE-luciferase reporter construct along with increasing amounts (5-50 ng) of a plasmid encoding A290 alone or in combination with a plasmid encoding WDR5. (B) LNCaP cells were transfected with a pool of siRNAs targeting WDR5 or a control siRNA targeting the luciferase open reading frame. WDR5 was detected in whole-cell extracts by immunoblotting using anti-WDR5 antibody. (NS) band served as a loading control. (C) LNCaP cells were transfected with the UPRE-luciferase reporter construct, a plasmid encoding A290 and a pool of siRNAs targeting WDR5 (+). The experiments shown in panels A and C were performed in duplicate and are representative of at least two independent experiments.

#### 5.iv AibZIP recruits WDR5 to the promoters of AibZIP target genes

Given the physical interaction between AibZIP and WDR5 and the effect of WDR5 overexpression/silencing on AibZIP-activated transcription, it was of interest to determine

if WDR5 is recruited to the promoters of AlbZIP target genes. We recently conducted a ChIP-on-chip experiment using Affymetrix promoter arrays to identify gene promoters that could potentially interact directly with processed AlbZIP (Lessard et al., unpublished). Two of these genes are the *CREB3* gene, which codes for an ER stress-regulated bZIP transcription factor (Wegmann, Hess et al. 2004; Liang, Audas et al. 2006), and the *COPZ1* gene, which codes for a protein involved in vesicle transport (Wegmann, Hess et al. 2004). As shown in Figure 4-6, the potential AlbZIP-binding regions of the *CREB3* and *COPZ1* genes are located downstream of their respective translation initiation sites. To verify if AlbZIP and/or WDR5 associate with these promoters, we conducted chromatin immunoprecipitation experiments in a cell line that conditionally produces 2HA290. As negative controls for these experiments, we used IgG for ChIP and the actin promoter for PCR. As a further control for specificity, we performed identical ChIP experiments in cells that do not produce 2HA290.

As revealed by PCR amplification of the *CREB3* and *COPZ1* fragments recovered by ChIP with the anti-HA antibody, 2HA290 bound specifically to both regulatory sequences in the transcribed region (lane 8). Neither DNA fragment was recovered in cells that do not express 2HA290 (compare lanes 4 and 8). Interestingly, both the *CREB3* and *COPZ1* promoter fragments were amplified when ChIP was performed using the anti-WDR5 antibody in cells that express 2HA290 (lane 7), but not in cells that do not express 2HA290 (lane 3). These results suggest that WDR5 associates with the *CREB3* and *COPZ1* promoters but that this interaction depends on AlbZIP.



**Figure 4-6:** Processed AibZIP recruits WDR5 to regulatory elements. Schematic representation of the 5' ends of the *CREB3* (A) and *COPZ1* (B) genes indicating the positions of the regulatory elements that were amplified by PCR in ChIP experiments. (C) ChIP experiments were performed in a cell line that conditionally expresses 2HA-A290 both in the absence (lanes 1-4) or presence (lanes 5-8) of 2HA-A290. ChIP was performed using IgG, anti-WDR5 (W) or anti-HA (HA) antibodies and fragments of the *CREB3*, *COPZ1* and  $\beta$ -actin genes were amplified by PCR.

## 6. Discussion

The results of the present study provide evidence that the processed form of AibZIP interacts with WDR5 and that this interaction is important for optimal transactivation by AibZIP. These novel findings provide new insight into the mechanism of transcriptional activation by ER-bound bZIP transcription factors, specifically AibZIP, and expand the repertoire of transcription factors that associate with WDR5.



AlbZIP is a member of the recently defined CREB3 family of bZIP transcription factors that localize to the ER membrane. In response to ER stress, AlbZIP and other CREB3-like proteins translocate to the Golgi apparatus where their membrane-bound C-terminal domains are separated from their N-terminal transcriptional regulatory domains by partial proteolysis. The overall scheme of CREB3-like protein activation is based on that of ATF6 as well as clear experimental evidence that these proteins undergo stress-induced proteolysis. Nonetheless, relatively little is known regarding the proteins that associate with AlbZIP and other CREB3-like proteins in different cellular compartments i.e. the ER, Golgi apparatus, and nucleus. In this regard, CREB3 is the protein for which the greatest number of binding partners have been identified. In fact, CREB3 has been shown to interact with DC-STAMP (Eleveld-Trancikova, Sanecka et al. 2010), the chemokine receptor CCR1 (Ko, Jang et al. 2004) as well as transcriptional regulators such as host cell factor (HCF) (Lu, Yang et al. 1997), a HCF-like protein (Zhou, Wong et al. 2001), Luman recruitment factor (LRF) (Audas, Li et al. 2008), TAF4 (Wang, Truckses et al. 2007) and histone deacetylase 3 (HDAC3) (Kim, Choi et al. 2010). Identifying binding partners for stress-regulated bZIP proteins is important since these may shed light on unsuspected roles of these recently discovered proteins as well as provide insight into the regulation of their activity. LRF, for example, is a leucine zipper protein that is induced during ER stress and that functions to inhibit CREB3 activity. In contrast, the present study is the first to identify a binding partner for AlbZIP.

WD repeat domain 5 (WDR5) encodes a highly conserved protein belonging to the WD repeat family (Gori, Divieti et al. 2001) which shares over 90% amino acid identity among all vertebrates (Schuetz, Allali-Hassani et al. 2006). The WD40-repeat proteins are a large family of proteins found in all eukaryotes and are involved in a variety of cellular processes such as signal transduction, vesicular trafficking, cytoskeletal assembly, cell cycle control, apoptosis and transcription regulation (Wysocka, Myers et al. 2003). WDR5 contains seven WD40 domains which fold into a seven-bladed  $\beta$ -propeller and each blade is composed of a four-stranded antiparallel  $\beta$ -sheets. This structure acts as a rigid scaffold for protein-protein interactions and facilitates formation of multiprotein complexes (Couture, Collazo et al. 2006).

Nuclear receptor coregulators (NRC) are required by nuclear receptors and transcription factors (i.e. c-Fos, c-Jun, CREB, NF $\kappa$ B, ATF2) to mediate their effects by efficient transcriptional regulation and WDR5 has been identified as a core component of several methyltransferase complexes containing NRC (Wysocka, Myers et al. 2003; Garapaty, Xu et al. 2009). Lysine methylation of histones is an important epigenetic regulator in eukaryotic genomes. Histone methylation is generally associated with transcriptional repression. However, methylation of lysine 4 of histone H3 has been linked to transcriptional activation in a variety of eukaryotes. As recently reported, WDR5 is an important regulator of gene regulation by virtue of its ability to recruit H3K4 methyltransferase to the K4-dimethylated H3 tail (Dou, Milne et al. 2006; Steward, Lee et al. 2006). Interestingly tri-methylation of lysine 4 of histone H3 is known to be strongly and preferentially associated with the promoter and proximal transcribed regions of active genes (Wysocka, Swigut et al. 2005). WDR5 is increasingly recognized as a partner of an expanding diversity of transcription factors as evidenced by the recent discovery that WDR5 interacts with a pituitary homeobox transcription factor (Gan, Thiebaud et al. 2011). The present study provides compelling evidence that WDR5 interacts with the transcriptionally active fragment of A1bZIP. This is supported by the identification of WDR5-derived peptides in large-scale immunoprecipitation/MS experiments as well as by co-immunoprecipitation of both transiently expressed epitope-tagged proteins and, more importantly, endogenous proteins. The processed form of A1bZIP is usually not detected in nuclear extracts of unstressed cells. Consequently, we induced the production of the processed form of endogenous A1bZIP by provoking ER stress using A23187 which disrupts ER calcium stores. Under these conditions, processed A1bZIP was seen to associate with WDR5 in reciprocal immunoprecipitation experiments.

The results of pull-down experiments suggest that WDR5 interacts directly with the bZIP domain of A1bZIP. While additional experiments will be required to more narrowly define the interacting domains of these proteins, it is tempting to speculate that WDR5 could also interact with other CREB3-like proteins given the similarities in the sequences of their bZIP domains. In fact, we have obtained preliminary data which suggest that this is the case (data not shown).

The results of luciferase reporter assays and chromatin immunoprecipitation experiments indicate that AIBZIP recruits WDR5 to regulatory regions and that WDR5 is necessary for optimal transactivation by AIBZIP. In the future, it will be of interest to characterize in greater detail the importance of WDR5 in the regulation of AIBZIP target genes.

In summary, our study provides a better understanding of the mechanism whereby AIBZIP, and possibly other related transcription factors, activate gene expression in the response to ER stress. These studies also define a new physiological role for WDR5 in a critically important transcription regulatory network.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research operating grant to CL. The authors gratefully acknowledge the generosity of Dr. Winship Herr for providing anti-WDR5 antibody and that of Dr. Jean-François Couture for GST-WDR5.

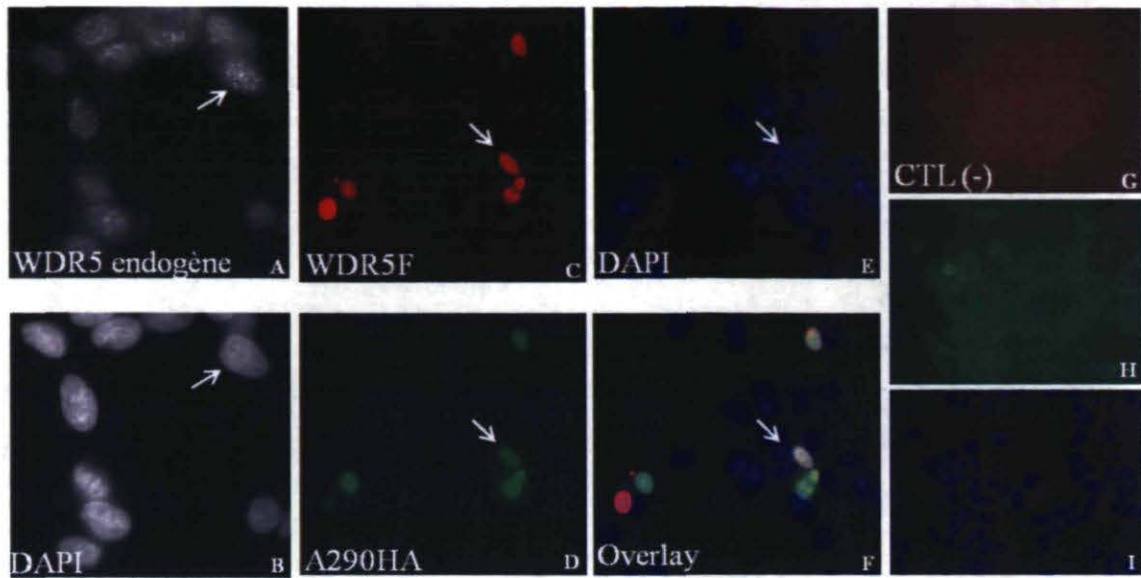
## REFERENCES

1. Audas, T. E., Y. Li, et al. (2008). "A novel protein, Luman/CREB3 recruitment factor, inhibits Luman activation of the unfolded protein response." Mol Cell Biol **28**(12): 3952-66.
2. Ben Aicha, S., J. Lessard, et al. (2007). "Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AlbZIP/CREB3L4 in prostate cells." Physiol Genomics **31**(2): 295-305.
3. Couture, J. F., E. Collazo, et al. (2006). "Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5." Nat Struct Mol Biol **13**(8): 698-703.
4. Dou, Y. L., T. A. Milne, et al. (2006). "Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components." Nature Structural & Molecular Biology **13**(8): 713-719.
5. Eleveld-Trancikova, D., A. Sanecka, et al. "DC-STAMP interacts with ER-resident transcription factor LUMAN which becomes activated during DC maturation." Mol Immunol **47**(11-12): 1963-73.
6. Gan, Q., P. Thiebaud, et al. "WD repeat-containing protein 5, a ubiquitously expressed histone methyltransferase adaptor protein, regulates smooth muscle cell selective gene activation through interaction with pituitary homeobox 2." J Biol Chem.
7. Garapaty, S., C. F. Xu, et al. (2009). "Identification and characterization of a novel nuclear protein complex involved in nuclear hormone receptor-mediated gene regulation." J Biol Chem **284**(12): 7542-52.
8. Gori, F., P. Divieti, et al. (2001). "Cloning and characterization of a novel WD-40 repeat protein that dramatically accelerates osteoblastic differentiation." J Biol Chem **276**(49): 46515-22.
9. Havlis, J., H. Thomas, et al. (2003). "Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins." Anal Chem **75**(6): 1300-6.
10. Kaufman, R. J. (2002). "Orchestrating the unfolded protein response in health and disease." J Clin Invest **110**(10): 1389-98.

11. Kim, H. C., K. C. Choi, et al. "HDAC3 selectively represses CREB3-mediated transcription and migration of metastatic breast cancer cells." *Cell Mol Life Sci* **67**(20): 3499-510.
12. Ko, J., S. W. Jang, et al. (2004). "Human LZIP binds to CCR1 and differentially affects the chemotactic activities of CCR1-dependent chemokines." *FASEB J* **18**(7): 890-2.
13. Labrie, C., J. Lessard, et al. (2008). "Androgen-regulated transcription factor AlbZIP in prostate cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* **108**(3-5): 237-44.
14. Liang, G., T. E. Audas, et al. (2006). "Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element." *Mol Cell Biol* **26**(21): 7999-8010.
15. Lu, R., P. Yang, et al. (1997). "Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor." *Mol Cell Biol* **17**(9): 5117-26.
16. Ma, Y. and L. M. Hendershot (2002). "The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress." *Cell Stress Chaperones* **7**(2): 222-9.
17. Malhotra, J. D. and R. J. Kaufman (2007). "The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response." *Semin Cell Dev Biol* **18**(6): 716-31.
18. Nicchitta, C. V. (2002). "A platform for compartmentalized protein synthesis: protein translation and translocation in the ER." *Curr Opin Cell Biol* **14**(4): 412-6.
19. Qi, H., C. Fillion, et al. (2002). "AlbZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells." *Cancer Res* **62**(3): 721-33.
20. Schuetz, A., A. Allali-Hassani, et al. (2006). "Structural basis for molecular recognition and presentation of histone H3 by WDR5." *EMBO J* **25**(18): 4245-52.
21. Shevchenko, A., M. Wilm, et al. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem* **68**(5): 850-8.
22. Steward, M. M., J. S. Lee, et al. (2006). "Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes." *Nature Structural & Molecular Biology* **13**(9): 852-854.

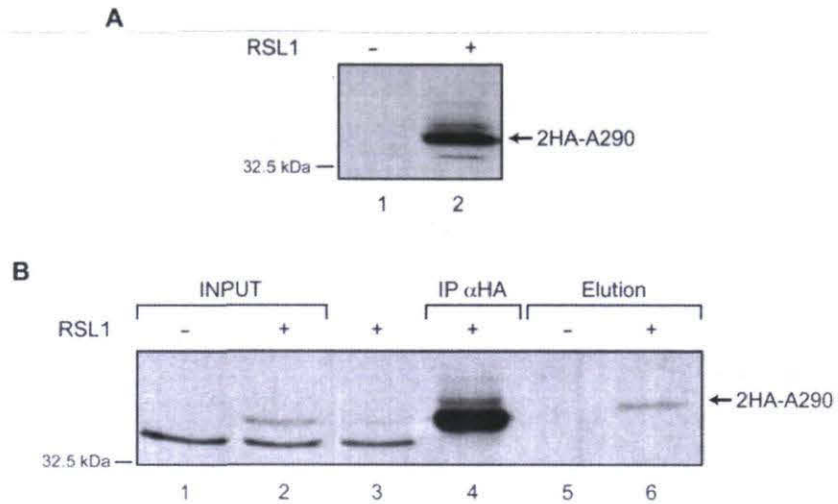
23. Wang, X., D. M. Truckses, et al. (2007). "Conserved region I of human coactivator TAF4 binds to a short hydrophobic motif present in transcriptional regulators." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7839-44.
24. Wegmann, D., P. Hess, et al. (2004). "Novel isotypic gamma/zeta subunits reveal three coatomer complexes in mammals." Mol Cell Biol **24**(3): 1070-80.
25. Wysocka, J., M. P. Myers, et al. (2003). "Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1." Genes Dev **17**(7): 896-911.
26. Wysocka, J., T. Swigut, et al. (2005). "WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3K4 methylation and vertebrate development." Cell **121**(6): 859-872.
27. Zhou, H. J., C. M. Wong, et al. (2001). "Inhibition of LZIP-mediated transcription through direct interaction with a novel host cell factor-like protein." J Biol Chem **276**(31): 28933-8.

## Supplementary Figure 1



**WDR5 co-localizes with the processed form of AibZIP in LNCaP cells.** (A) Endogenous WDR5 was detected by indirect immunofluorescence using anti-WDR5 primary antibody. (B) DAPI stain of the cells in panel A. FLAG-tagged WDR5 (C) and HA-tagged A290 (D) were co-transfected in LNCaP and detected by indirect immunofluorescence. (E) DAPI stain of panels C and D. (F) Overlay of panels C, D and E. As negative controls, untransfected cells were stained with anti-FLAG (G), anti-HA (H) and Alexa-conjugated antibodies. (I) DAPI stain of panels G and H.

## Supplementary figure 2



**Identification of AlbZIP partners by mass spectrometry.** (A). RSL1-dependent production of recombinant AlbZIP (2HA-A290) in stable cell line (clone 70-2). (B). Steps of large scale co-immunoprecipitation experiment: Purification of the 2HA-A290 protein as shown by detection of the fusion protein in the initial cell lysate (lane 2), after IP  $\alpha$ HA (lane 4) and in the final elution from HA resin (lane 6).



## Chapitre 5: Discussion et Conclusion

### 1. Discussion

En dépit d'une amélioration des connaissances durant cette dernière décennie, le stress du RE et sa réponse méritent néanmoins beaucoup d'investigations. Le stress du RE est un phénomène très complexe qui met en œuvre plusieurs voies de signalisation. Il est clair aujourd'hui que chaque type de stress est associé à un ensemble de protéines capable de transduire un signal permettant à la cellule de donner une réponse adaptée pour rétablir son homéostasie. Au niveau du noyau, cette réponse se manifeste par la formation de complexes protéiques caractéristiques qui vont lier l'élément de réponse et engendrer une régulation transcriptionnelle appropriée. Le mécanisme RIP (*Regulated intramembrane proteolysis*) représente une étape clé dans la mise en œuvre de cette réponse adaptative suite à l'accumulation de protéines mal-repliées, au changement du niveau d'acides gras ou à l'altération du niveau du calcium. Ce système se compose de facteurs de transcription inactifs ancrés au RE par leur domaine transmembranaire et de protéases localisées au niveau d'autres organites vers lesquels ils seront transloqués une fois le stress déclenché (Sannerud and Annaert 2009). Par ailleurs, la régulation de l'activité de ces facteurs dépend de la régulation de leur libération suite à un stimulus spécifique (Bailey and O'Hare 2007). ATF6 et SREBP sont deux facteurs de transcription appartenant à ce système de régulation. Le premier est un membre de la superfamille ATF/CREB de type bZIP (Haze, Yoshida et al. 1999) et le deuxième est un facteur de transcription de type hélice-boucle-hélice (Sakai, Nohturfft et al. 1997; Haze, Yoshida et al. 1999). Les deux sont impliqués dans le stress du RE mais chacun est sollicité dans un contexte différent. Toutefois, les études publiées récemment dévoilent d'autres facteurs de transcription correspondants au modèle ATF6 et l'expansion de la famille des protéines bZIP transmembranaires reflète la sélectivité de la réponse au stress selon le type cellulaire, le type de stress déclenché ou sa durée (Bailey and O'Hare 2007).

A**IbZIP** fait partie des facteurs de transcription sollicités lors du stress du RE. Sous sa forme inactive, la protéine pleine longueur est ancrée à la membrane du RE de sorte que son domaine C-terminal soit projeté dans la lumière et que son domaine N-terminal soit orienté vers le cytoplasme. Suite à la perturbation des concentrations du calcium, mimée par l'ajout de l'ionophore A23187, A**IbZIP** est alors transloquée vers l'appareil de Golgi où elle va subir le clivage par les protéases S1P/S2P et la forme active libérée migre au noyau (Ben Aïcha, Lessard et al. 2007). Au noyau, A**IbZIP** sous forme de dimère, va lier l'élément de réponse au niveau du promoteur du gène cible, former un complexe protéique avec ses co-facteurs et recruter la machinerie de transcription pour activer l'expression de ses gènes cibles (Ben Aïcha, Lessard et al. 2007).

Ceci résume brièvement les deux contextes cellulaires dans lesquels A**IbZIP** baigne et son rôle dans la réponse au stress du RE à travers la régulation de l'expression de ses gènes cibles. La suite de cette discussion portera sur trois points distincts qui sont, : i) l'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'A**IbZIP** par la génération de dominant négatif, ii) l'identification des protéines qui interagissent avec la protéine pleine longueur localisée au RE et finalement, iii) l'identification des protéines qui interagissent avec la forme nucléaire d'A**IbZIP**.

Nous savons pertinemment que le domaine bZIP est un joueur important quant au choix des dimères d'A**IbZIP** mais aussi pour leur liaison à l'élément de réponse et ce grâce à la glissière de leucine et à la région basique en amont, respectivement. C'est donc un outil de travail très intéressant pour bloquer l'activité transcriptionnelle d'A**IbZIP**. En effet, l'intérêt d'inhiber l'activité des facteurs de transcription bZIP remonte à 1995 et la première tentative a donné naissance au dimère bZIP-AZIP (Krylov, Olive et al. 1995; Grigoryan, Reinke et al. 2009). Dans ce cas, la région basique a été échangée par une région acide ce qui augmente l'affinité du dimère grâce à la force d'attraction créée entre la charge positive de la région basique et la charge négative de la région acide. Cependant, ce dominant négatif AZIP présente une grosse lacune quant à sa spécificité. En effet, comme la glissière de leucine n'a pas été modifiée, ce dominant mime les protéines dont il provient et lie plusieurs membres de différentes sous-familles bZIP. Mais vu l'avenir prometteur de cette méthode pour la création de nouvelles molécules et thérapies de blocage de voies de signalisation, plusieurs équipes se sont concentrées durant la dernière décennie afin de

trouver le meilleur programme informatisé pour la conception de dominants négatifs. Dans le cadre de mes études doctorales, j'ai utilisé l'algorithme développé par Mason et collaborateurs (bCIPA : bZIP Coiled-coil Interaction Prediction Algorithm) (Mason and Arndt 2004). Malgré une formule compliquée, cet algorithme est facile d'utilisation et permet de calculer la température de fusion d'un dimère. La glissière de leucine est une structure simple composée de moins de 40 acides aminés formant plusieurs hélices. Ces acides aminés sont divisés en 4 à 5 répétitions et chaque répétition est formée de 7 aa désignés a, b, c, d, e, f et g (Deppmann, Alvania et al. 2006).

AlbZIP appartient à la sous-famille de CREB3 et nous savons pertinemment que les 5 membres de cette sous-famille présentent une forte homologie au niveau de leurs domaines bZIP. Il était alors impératif, avant de commencer la conception du mutant, d'identifier les caractéristiques structurelles communes relatives à ces membres et précisément les résidus conservés entre les différentes glissières de leucines. Ensuite, afin de concevoir le meilleur dominant négatif, j'ai procédé par l'introduction d'une ou de plusieurs substitutions dans le but d'augmenter l'enroulement du noyau hydrophobe (positions a et d) et de renforcer les interactions ioniques (positions g et e). J'ai testé aussi des substitutions au niveau des positions b, c et f sans toucher aux résidus conservés entre les membres de la sous-famille de CREB3 à l'exception de la valine en position a de l'hélice numéro 4. Par la suite, la température de fusion ( $T^{\circ}m$ ) de chaque hétérodimère formé de glissière de leucine de type sauvage et de glissière de leucine mutée est calculée et comparée à la température de fusion de l'homodimère de type sauvage. L'activité et l'affinité des mutants les plus prometteurs ont été testées par la suite à l'aide d'essais luciférase en transfection transitoire dans les cellules prostatiques humaines LNCaP. Le meilleur mutant (M15) obtenu de cette série présente 16 substitutions d'acides aminés et la température de fusion du dimère M15-AlbZIP est de 29°C plus haute que celle de l'homodimère de type sauvage. De plus, d'autres expériences réalisées auparavant par notre équipe ont montré que le simple fait de remplacer la région basique du domaine bZIP d'AlbZIP par une région acide fournit un bon dominant négatif pour ce dernier. La combinaison de ces deux expériences a permis de concevoir un dominant négatif encore plus puissant. Pour ce faire, la glissière de leucine du mutant M15 a été fusionnée à une région acide en N-terminal. De plus, deux signaux de localisation nucléaire ont été ajoutés pour donner, en fin de compte, le dominant négatif

AZM15N. Le tout a servi pour générer un clone stable inductible (65-12) en utilisant le système RhéoSwitch modifié par notre équipe (Lessard, Aïcha et al. 2007). L'ajout de l'agent inducteur RSL1 induit l'expression de ce dominant négatif et inhibe l'activité d'AlbZIP nucléaire de 94% via l'élément de réponse UPRE. J'ai réussi, grâce à cette méthode, à générer un inhibiteur puissant de l'activité transcriptionnelle d'AlbZIP *in vivo*. Le domaine bZIP constitue un outil de travail très intéressant mais aucun membre de la sous-famille de CREB3 n'a été utilisé pour faire ce genre d'étude. De plus, avoir un clone stable inductible permet de contrôler la durée de l'induction et le niveau d'expression de ce dominant négatif tout en ayant un niveau basal d'expression en absence de RSL1 nul. Toutefois, les programmes de calcul utilisent des algorithmes qui prennent en compte toutes les considérations nécessaires pour concevoir un dominant négatif à haute affinité en ignorant malheureusement la notion de spécificité et ceci constitue, à un certain degré, la faiblesse de mon dominant négatif. Vu la forte homologie présente entre les membres de la sous-famille de CREB3, nous nous doutions qu'AZM15N pourrait lier d'autres membres de la sous-famille de CREB3. Surtout que nous avons observé que la forme nucléaire d'AlbZIP est capable de lier *in vivo* les formes nucléaires de BBF2H7, de CREBH et d'OASIS. Pour vérifier cette affinité, j'ai réalisé une co-immunoprécipitation en utilisant le clone qui exprime de façon inductible le dominant négatif. L'avantage de cette expérience *in vivo* est la sensibilité de l'interaction entre le dominant négatif et le facteur de transcription. En effet, des 4 membres de cette sous-famille, AZM15N est capable de se dimériser avec la forme nucléaire de BBF2H7 et CREBH. Toutefois, il ne lie ni la forme nucléaire de CREB3 ni celle d'OASIS. Malgré une sélectivité plus accrue d'AZM15N vers les membres de la sous-famille de CREB3 comparativement à la protéine naturelle, le point à discuter suite à ce résultat est l'utilité d'un dominant négatif à haut effet inhibiteur mais pas très spécifique. Au niveau des cellules prostatiques cancéreuses humaines LNCaP, aucune évidence ne nous permet, aujourd'hui, de penser que BBF2H7 coexiste avec AlbZIP au niveau de ces cellules prostatiques. De plus, CREBH est exclusivement exprimée au niveau du foie. Ainsi, ce mutant puissant pourrait nous aider à mieux étudier l'effet de l'inhibition de l'activité d'AlbZIP sur ses gènes cibles et, par conséquent, sur la réponse au stress du RE tout en gardant à l'esprit qu'AlbZIP est un gène régulé indirectement par les androgènes. Inhiber son activité transcriptionnelle revient donc à

bloquer une voie de signalisation des androgènes. De plus, l'implication d'AlbZIP dans le cancer de la prostate n'est pas très bien caractérisée et nous ne savons pas si sa surexpression est une conséquence ou une cause du cancer. Nous pensons que grâce à ce dominant négatif nous pourrions établir cette relation de cause à effet et ce en observant l'impact de l'inactivation d'AlbZIP sur l'augmentation ou la diminution de l'apoptose au niveau des cellules LNCaP. Par contre, l'étude sera plus compliquée au niveau d'autres tissus où certains membres de cette sous-famille s'exprimeront en même temps avec AlbZIP et là, il sera nécessaire d'améliorer la spécificité de ce dominant négatif. Pour ce faire, je suggère pour des expériences futures de conserver la structure de base du mutant M15 et d'introduire des substitutions au niveau de certains résidus conservés permettant peut être d'augmenter la spécificité du dominant négatif à AlbZIP. Il s'agit bien sûr d'un moyen très rudimentaire qui n'est pas fondé sur des programmes informatisés mais qui peut aider à trouver un mutant puissant et spécifique. Toutefois il est clair, aujourd'hui, que la spécificité de l'interaction constitue un défi de taille pour ce genre de projet vu l'impact que peuvent avoir ces petites molécules. D'ailleurs, les expériences à large échelle qui ont été réalisées pour caractériser la spécificité de l'interaction constituent un progrès significatif dans cette voie durant cette dernière décennie et particulièrement les essais qui permettent de comparer les profils d'interaction d'une protéine avec plusieurs candidats. Ces nouveaux programmes, qui tentent de trouver un équilibre entre la spécificité et l'affinité, aideront probablement à construire un dominant négatif aussi puissant et spécifique à AlbZIP (Grigoryan, Reinke et al. 2009).

Le deuxième volet de mes recherches porte sur l'identification des protéines qui interagissent avec la protéine AlbZIP quand celle-ci est localisée au RE. Notre hypothèse de travail est la suivante : sous sa forme inactive, AlbZIP lierait une protéine de nature indéterminée via son domaine régulateur et cette protéine pourrait jouer le rôle de détecteur de stress. En réponse au stress, cette protéine permettrait la libération d'AlbZIP du RE en l'escortant vers l'appareil de golgi ou en la confiant à une ou plusieurs protéines qui vont se charger de son transport. Nous pensons aussi qu'une fois clivée par les protéases SIP et S2P, AlbZIP va lier un autre complexe protéique qui va assurer la migration de la forme clivée vers le noyau. Dans le but d'identifier les protéines qui interviennent directement ou

indirectement dans la régulation d'AlbZIP, j'ai mis au point une méthode qui répond à tous nos besoins dans la mesure du possible. Pour ce faire, j'ai utilisé un clone stable qui exprime de façon inductible une forme recombinante d'AlbZIP pleine longueur à laquelle nous avons greffé un épitope FLAG en N-terminal. Cette forme recombinante d'AlbZIP présente une mutation au niveau du site consensus de la protéase S1P afin de contourner le problème de clivage spontané. En effet, la surexpression de la forme pleine longueur d'AlbZIP produit un clivage spontané. Les protéines associées à AlbZIP ont, par la suite, été purifiées par chromatographie à l'aide d'une résine couplée à l'anticorps anti-FLAG puis analysées par spectrométrie de masse. Cette méthode entièrement ajustée pour AlbZIP a permis de résoudre plusieurs problèmes rencontrés durant les premières tentatives comme la solubilité, le clivage spontané suite à la surexpression et la faiblesse du rendement. L'utilisation d'un clone stable inductible nous a beaucoup aidé. En effet, ce système RheoSwitch modifié par notre équipe est un outil de travail très puissant (Lessard, Aicha et al. 2007). Il est facile à transfecter dans les cellules LNCaP et ses composantes (facteurs de transcription, agent inducteur) présentent un effet minimal sur ces dernières. De plus, il nous permet de contrôler l'expression de la protéine d'intérêt tout en modulant son abondance selon nos besoins. Ajouté à tout ceci, ce système présente une expression basale nulle. Toutefois, dans le cadre de cette expérience, j'ai utilisé un clone stable inductible qui n'exprime que les facteurs de transcription du système RheoSwitch comme contrôle négatif et ce pour n'avoir aucune trace, même indétectable en immunobuvardage, de la protéine recombinante d'AlbZIP dans ce dernier. Cependant, le point qui a, à mon avis, contribué beaucoup à la réussite de cette expérience est le fait de faire migrer l'éluat sur un gel d'acrylamide sur une distance d'environ 8 cm et de couper par la suite la piste entière en 8 bandes de 1cm<sup>2</sup> de surface chacune. Chaque bande a été digérée et analysée par spectrométrie de masse individuellement. Cependant, les résultats des 8 analyses ont été compilés au même temps. Plus de 900 candidats ont été obtenus suite à cette expérience et ceux qui ont été sélectionnés pour approfondir leur caractérisation présentent une localisation subcellulaire au niveau de la région péri-nucléaire incluant le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi. Les résultats obtenus par cette expérience sont fort intéressants, ils ouvriront plusieurs portes d'investigations et aideront à mieux comprendre la fonction de chaque protéine dans la régulation d'AlbZIP suite au stress du RE.

Jusque là rien n'a été fait pour identifier les partenaires d'AlbZIP au réticulum endoplasmique. Même les équipes qui travaillent sur les autres membres de la sous-famille de CREB3 ne se sont pas attardées à identifier les partenaires de ces facteurs de transcription au RE. À mon avis, c'est le degré de difficulté élevé qui retarde le progrès dans ce domaine parce qu'il s'agit de protéines transmembranaires, pas très solubles et dont le mécanisme de régulation n'est pas très bien compris. Encore les rares partenaires identifiés de CREB3, par exemple, sont le fruit d'expériences de double hybride chez la levure dans lesquelles on a identifié CREB3 par hasard comme partenaire de telle ou telle protéine et non l'inverse. L'exemple le plus intéressant parmi les partenaires de CREB3 au RE est la protéine DC-STAMP. Au niveau des cellules dendritiques, CREB3 et DC-STAMP interagissent ensemble *in vitro* et *in vivo*. Cette interaction se fait entre le domaine N-terminal cytosolique de CREB3 et le domaine C-terminal cytosolique de DC-STAMP. Les expériences réalisées par l'équipe du Dr Adema montrent que cette protéine est impliquée dans la modulation du clivage de CREB3 (Eleveld-Trancikova, Sanecka et al. 2010). À part l'exemple de BIP pour ATF6 et SCAP pour SREBP, c'est la première protéine, de type régulatrice, identifiée pour un membre de la sous-famille de CREB3.

Ce genre de projet est assez innovateur dans le cadre de cette sous-famille mais demande beaucoup de mises au point et par conséquent beaucoup de temps. Mais une fois tout en place les résultats obtenus ajouteront beaucoup aux connaissances acquises jusque là sur la fonction des protéines bZIP dans la réponse au stress et plus précisément sur le déroulement des événements suite au déclenchement de ce dernier. Néanmoins certains points pourront être améliorés. Lors des premières tentatives de purification des partenaires d'AlbZIP, j'ai utilisé le système de purification par affinité en tandem TAP (*tandem affinity purification*) (Puig, Caspary et al. 2001). Cette technique permet au final de récupérer des complexes protéiques non dénaturés grâce à deux purifications successives. Malheureusement, le rendement suite à ces deux purifications était très faible et par conséquent difficilement analysable par spectrométrie de masse. Ceci m'a amené à faire une seule purification au lieu de deux pour diminuer les pertes. Certes j'ai réglé le problème du rendement et j'ai obtenu un résultat important mais l'analyse et la confirmation de ces résultats sont devenues très difficiles à réaliser. La liste des candidats était très longue, pleine de faux positifs, ce qui m'a obligé à établir certains critères pour limiter le choix.

Malheureusement à cause de cette façon de procéder je peux rater certains candidats intéressants. Ce genre de problèmes n'est pas observé quand on utilise des cellules qui prolifèrent en suspension. En effet, le problème du rendement peut être contourné par l'augmentation du nombre de cellules utilisées et conserver par conséquent les deux étapes de purifications. En considérant les études publiées sur l'identification des complexes protéiques chez les mammifères, nous nous rendons compte que la réussite de ces expériences se fait grâce à des lignées cellulaires qui prolifèrent en suspension et qui donnent jusqu'à  $1 \times 10^6$  de cellules par millilitre de milieu. Or au sein de notre équipe, nous travaillons dans un cadre particulier, soit le cancer de la prostate en utilisant le modèle des cellules LNCaP. Ce sont des cellules adhérentes de grande taille et ceci constitue, à mon avis, un facteur limitant pour ces expériences de purification. De plus, utiliser  $6 \times 10^9$  cellules par condition a constitué dans le cadre de mes expériences un défi de taille quant à la gestion des pétris, des sous-cultures et de l'espace dans les incubateurs.

Toujours dans le but d'identifier les protéines qui interagissent avec la forme pleine longueur d'AlbZIP, je me suis arrêtée au cas très documenté du facteur de transcription ATF6. Nous savons aujourd'hui que sous sa forme inactive le facteur de transcription ATF6, ancré à la membrane du RE, lie la chaperonne BIP via son domaine C-terminal et que suite à un stress dû à l'accumulation des protéines mal-repliées, ATF6 est clivée et s'en va au noyau pour réguler positivement l'expression de la chaperonne BIP. Fait intéressant, c'est la régulation de BIP par ATF6 qui a été découverte avant l'interaction entre ces deux protéines au RE. En effet, l'élément de réponse ERSE (CCAAT-N<sub>9</sub>CCACG), découvert par Yoshida et collaborateurs en 1998 suite à l'analyse de la région promotrice du gène codant la chaperonne BIP/GRP78, a été utilisé pour faire un essai de type simple hybride. Cette expérience a révélé que le facteur de transcription ATF6 lie cet élément de réponse et régule, par conséquent, l'expression de BIP (Yoshida, Haze et al. 1998). Plus tard il a été démontré que, lorsque ATF6 est ancrée à la membrane du RE, la même chaperonne BIP interagit avec le domaine C-terminal de ce facteur de transcription pour moduler son activation suite à un stress (Shen, Chen et al. 2002). Nous observons donc une boucle de régulation entre ATF6 et BIP. Dans un état normal, BIP régule négativement ATF6 en la séquestrant au RE. Mais suite à un stress, ATF6 s'en va au noyau pour réguler positivement l'expression de BIP et intervient dans la réponse au stress. Ceci nous a amené à nous



intéresser aux gènes dont l'expression est régulée par la forme nucléaire d'AlbZIP. Ces gènes codent pour des protéines qui pourraient être des partenaires de la forme pleine longueur d'AlbZIP quand celle-ci est localisée au RE et reproduiraient le même schéma BIP-ATF6. J'ai utilisé, pour ce faire, l'étude réalisée par notre équipe pour l'identification des gènes cibles d'AlbZIP (Ben Aicha, Lessard et al. 2007). Cette étude a permis d'identifier plusieurs cibles dont la régulation a été confirmée par buvardage de type «Northern» et ces gènes ont été classés en groupes selon leur fonction. Le gène codant la chaperonne BIP ne fait pas partie de la liste des gènes cibles AlbZIP. Toutefois, d'autres candidats comme DNAJC12 et KDELR3 pourraient jouer le rôle de BIP quant à la régulation négative d'AlbZIP. Pour mettre toutes les chances de mon côté, j'ai décidé de choisir plusieurs candidats en m'intéressant à toutes les interactions éventuelles puisqu'elles pourraient toutes m'aider à comprendre le rôle d'AlbZIP dans la réponse au stress mais aussi dans d'autres voies de signalisation. J'ai alors choisi une dizaine de candidats dans le but d'identifier des partenaires d'AlbZIP.

L'ADNc de tous les candidats sélectionnés a, tout d'abord, été sous-cloné dans les vecteurs d'expression en fusion avec l'épitope HA ou FLAG. Ensuite, les interactions ont été vérifiées par co-immunoprécipitation et essais de type «pull down». De plus, la localisation subcellulaire de chaque protéine a été vérifiée par immunofluorescence.

Cette étude est la première à présenter autant de partenaires pour une seule protéine. Trente-cinq candidats potentiels ont été choisis pour la validation. Grâce à des expériences de co-immunoprécipitation, nous avons validé l'interaction, *in vivo*, de dix candidats avec la forme pleine longueur d'AlbZIP. Parmi ces candidats, sept proviennent de l'expérience d'immunopurification et trois font partie de la liste des gènes régulés par la forme nucléaire d'AlbZIP. Ces protéines sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires et peuvent être regroupées selon leur fonction. Cependant, comprendre comment chacune est impliquée dans la régulation de la protéine AlbZIP constitue un défi de taille. Nous pouvons imaginer et émettre des hypothèses sur le rôle que pourra jouer chaque protéine en s'appuyant sur les études publiées. En 2009, une étude réalisée par Schindler et collaborateurs a permis de démontrer que durant le stress du RE, ATF6 se détache de la chaperonne BIP et lie le complexe COPII (Schindler and Schekman 2009). Ce complexe protéique va assurer son transport vers l'appareil de golgi pour son activation. Nous savons

aujourd'hui que ce complexe est formé de 5 protéines qui sont les suivantes SAR1a, le complexe SEC23/SEC24 et le complexe SEC13/SEC31 (Schindler and Schekman 2009). SAR1a semble jouer un rôle important dans la mise en place du dispositif de transport puisque son activation est nécessaire pour le recrutement des deux complexes SEC23/24 et SEC13/31. De plus, l'inhibition de COPII par la surexpression d'un dominant négatif dirigé contre SAR1 provoque le blocage du transport d'ATF6. Toutefois, la protéine de type récepteur qui va amener ATF6 dans la vésicule de transport demeure encore inconnue (Schindler and Schekman 2009). Encore le facteur de transcription SREBP est lui aussi transporté vers l'appareil de golgi via le complexe COPII. SREBP est ancrée à la membrane du RE avec les protéines SCAP et INSIG. Cette interaction avec INSIG empêche le complexe SREBP-SCAP de lier le complexe COPII. Suite à la déplétion des niveaux du cholestérol dans la cellule, la protéine INSIG se détache de ce complexe permettant à la protéine SCAP d'interagir avec la protéine SEC24 recrutée par SAR1a active. Dans ce cas SCAP joue un double rôle dans l'homéostasie du cholestérol. D'une part elle agit comme un détecteur des niveaux du cholestérol et d'autre part elle escorte SREBP jusqu'à l'appareil de golgi (Sun, Seemann et al. 2007). Ce rôle pourrait être joué par la protéine KDELR3. Les expériences réalisées au cours de ce projet de recherche ont montré que cette protéine transmembranaire du RE lie la forme pleine longueur d'AlbZIP via son domaine N-terminal et ce de manière directe. De plus, le gène codant KDELR3 est régulé par la forme nucléaire d'AlbZIP. Évidemment il faudra compléter une étude plus approfondie pour démontrer la participation de chaque protéine (SAR1a, KDELR3, STEAP2, TMC01, RAB1B, RÉTICULON3, DNAJC12, PDF6, CDC37) dans la rétention d'AlbZIP au RE mais aussi dans son transport vers l'appareil de golgi suite à la perturbation des concentrations calciques du RE.

Quand j'ai procédé à la mise au point de la méthode d'immunopurification des partenaires d'AlbZIP, notre hypothèse de travail était qu'une protéine de nature indéterminée lierait le domaine régulateur d'AlbZIP et que cette protéine jouerait le rôle de détecteur de stress à l'image de BIP pour ATF6. Malheureusement, aucune protéine parmi celles validées par co-immunoprécipitation ne lierait le domaine régulateur d'AlbZIP. Ceci nous ramène à la limite d'une immunopurification à une seule étape (une seule immunoprécipitation) où le nombre de partenaires potentiels obtenu est très important. Toutefois, nous savons que la

surexpression d'AlbZIP déclenche un stress et produit un clivage spontané d'AlbZIP. Ce stress pourrait alors provoquer la dissociation de cette protéine de type détecteur de stress du domaine régulateur d'AlbZIP. Pour contourner ce problème et cibler spécialement cette protéine j'opterais pour une expérience d'immunopurification en utilisant AlbZIP endogène, en s'approchant le plus des conditions normales (pas de stress) et ce, bien sûr, malgré les limites de cette méthode (solubilité, anticorps). Mais si cette protéine existe vraiment c'est la meilleure façon pour l'identifier.

PLA2G2A représente une autre protéine intéressante parmi les partenaires d'AlbZIP. Elle fait aussi partie de la liste des gènes régulés par la forme nucléaire d'AlbZIP (Ben Aicha, Lessard et al. 2007). Elle lie directement sa forme pleine longueur *in vivo* via son domaine N-terminal. Fait intéressant, cette phospholipase, sécrétée dans le milieu extracellulaire, est surexprimée au niveau des lésions préneoplasiques et au niveau des adénocarcinomes comparativement à la prostate normale. Le rôle spécifique de cette phospholipase n'est pas très bien connu mais elle est impliquée dans la libération de l'acide arachidonique des membranes cellulaires, un substrat pour la biosynthèse des eicosanoïdes connus pour leur régulation de la prolifération cellulaire (Kallajoki, Alanen et al. 1998; Ben Aicha, Lessard et al. 2007). Il serait très intéressant de comprendre le rôle de cette interaction dans le cancer de la prostate (Figure 5-2).

Le troisième volet de mes travaux de recherche s'est penché sur l'identification des partenaires de la forme nucléaire d'AlbZIP. À ce niveau-ci nous changeons de contexte cellulaire, AlbZIP est transloquée au noyau, elle est sous sa forme active et va réguler l'expression de ses gènes cibles. Le but de cette étude est donc d'identifier le complexe protéique qu'AlbZIP recrute pour lier l'ADN et activer l'expression du gène cible. Ce complexe protéique peut contenir des facteurs de transcription et des cofacteurs nécessaires pour la régulation de la transcription.

Pour ce faire, j'ai utilisé la même méthode décrite précédemment avec quelques modifications qui s'adaptent avec la solubilité de la forme nucléaire. D'une manière plus détaillée, nous avons généré par transfection stable une lignée cellulaire prostatique qui exprime de façon inductible la forme nucléaire d'AlbZIP fusionnée en N-terminal avec deux épitopes de l'hémagglutinine du virus de l'influenza (HA) (clone 70-2). Après avoir

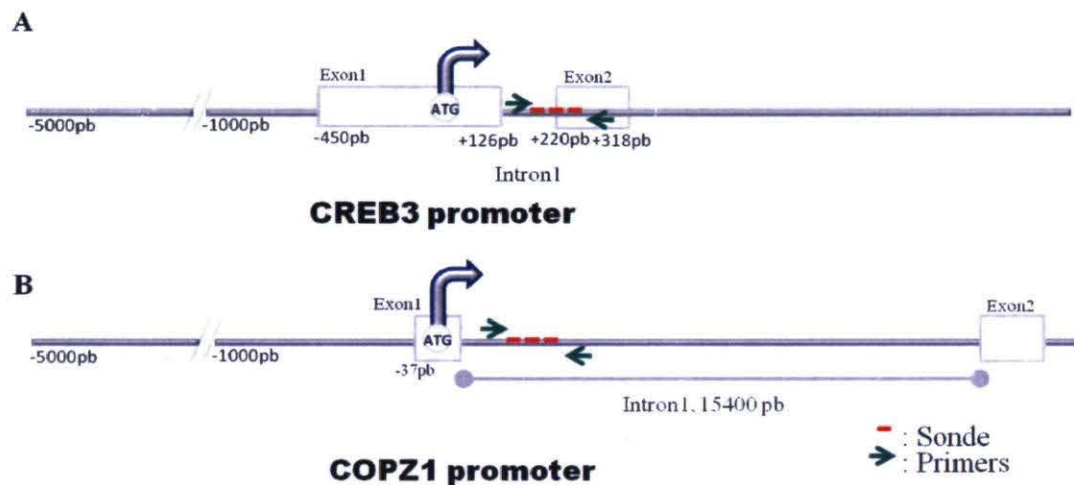
induit la production de la protéine recombinante par ajout de l'agent inducteur RSL1, nous avons passé les extraits nucléaires enrichis sur une colonne de résine couplée à l'anticorps anti-HA. Après plusieurs lavages, l'éluat a été effectué par compétition en utilisant un peptide HA et l'éluat a été analysé par spectrométrie de masse. Une fois encore, j'ai utilisé un clone stable inductible pour cette expérience (Lessard, Aicha et al. 2007). AIBZIP est un facteur de transcription surexprimé dans les cellules prostatiques cancéreuses, mais une fois activée, une partie infiniment petite est suffisante pour activer la transcription de ses gènes cibles. D'ailleurs, il est difficile de détecter la forme nucléaire d'AIBZIP endogène suite à une altération des niveaux calciques sans effectuer des extraits nucléaires pour enrichir cette fraction. De plus, au noyau, il va lier l'ADN sous forme de complexes protéiques ce qui rend sa solubilité très faible. Or, dans le cadre d'une expérience de purification de protéines suivie de séquençage par spectrométrie de masse, il faut être au-dessus du seuil de détection du spectromètre. De plus, en surexprimant la forme nucléaire d'AIBZIP, j'augmenterais nécessairement l'abondance des protéines qui interagiraient avec elle.

Grâce à cette expérience, j'ai identifié la protéine WDR5 (*WD repeat domain 5*) comme partenaire de la forme nucléaire d'AIBZIP. Le gène WDR5 code pour une protéine très conservée chez les vertébrés appartenant à la famille des répétitions WD40. Cette protéine est impliquée dans plusieurs processus cellulaires comme le contrôle du cycle cellulaire, la régulation de la transcription et la régulation de l'apoptose (Wysocka, Myers et al. 2003). WDR5 présente 7 répétitions WD40 formant une structure rigide nécessaire pour les interactions protéine-protéine (Wysocka, Myers et al. 2003; Couture, Collazo et al. 2006). WDR5 a été identifiée parmi les composants des corégulateurs des récepteurs nucléaires (NRC). Elle incarne même le composant central de certains complexes protéiques NRC contenant des méthyltransférases. Ces complexes protéiques sont impliqués dans la régulation de la transcription grâce à la méthylation des histones (Wysocka, Myers et al. 2003). Cette dernière est une modification post-traductionnelle qui s'opère sur la queue de l'histone grâce aux méthyltransférases. Cette méthylation peut se faire à plusieurs degrés, ce qui ajoute une complexité potentielle à la régulation épigénétique de l'histone. Il a été démontré que WDR5 s'associe directement avec l'histone H3 di-méthylé et permet la triméthylation de cette dernière en permettant au complexe de méthyltransférase de lier la queue de l'histone H3 (Dou, Milne et al. 2006; Steward, Lee et al. 2006). Malgré une

association de la méthylation des histones à la répression de la transcription, la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est associée à l'activation de la transcription. En effet, il a été rapporté que la méthylation des lysines est un système important pour différencier les domaines chromatiniens actifs des domaines inactifs. De plus, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est fortement associée au promoteur proximal et aux régions codantes du gène (Wysocka, Swigut et al. 2005).

Toutes ces informations sur WDR5 nous orientent un peu pour comprendre le mécanisme d'action de la forme nucléaire d'AlbZIP. Tout d'abord, j'ai observé par immunofluorescence que WDR5 co-localise avec AlbZIP au noyau. Ensuite, pour confirmer le résultat de la spectrométrie de masse, j'ai réalisé des expériences d'immunoprécipitation démontrant l'interaction *in vivo* entre la forme nucléaire d'AlbZIP et WDR5. Cette interaction a été démontrée entre les formes recombinantes transfectées mais aussi entre les formes endogènes. Ensuite, j'ai démontré *in vitro* par essai de type pull down que cette interaction est directe et qu'elle se fait via le domaine bZIP. Donc une fois l'interaction démontrée et confirmée, la question qui se posait était comment WDR5 participe dans le mécanisme d'action d'AlbZIP. Afin de déterminer si les deux protéines lient les mêmes régions d'ADN *in vivo*, j'ai utilisé le clone stable 70-2 pour réaliser une immunoprécipitation de la chromatine. Grâce à ce clone, je pourrais comparer l'effet de l'induction de la forme nucléaire d'AlbZIP sur le recrutement de WDR5. L'expérience consiste à immunoprécipiter la forme nucléaire d'AlbZIP ou la protéine endogène WDR5 au niveau du clone induit avec RSL1. La même expérience a été réalisée dans le clone 70-2 non traité avec l'agent inducteur. Pour analyser cette expérience j'ai utilisé le promoteur du gène CREB3, une cible d'AlbZIP. L'étude publiée en 2007 par notre équipe a mis en évidence la régulation positive de ce gène par la forme nucléaire d'AlbZIP (Ben Aicha, Lessard et al. 2007). De plus, des expériences réalisées par mes collègues (non publiées) ont permis d'identifier l'élément de réponse que lie AlbZIP pour activer l'expression de CREB3. Cette région a été ciblée par une paire d'amorces pour analyser l'expérience de ChIP. Malheureusement, j'observe uniquement l'amplification de la région ciblée suite à l'immunoprécipitation d'AlbZIP, élément déjà démontré par ma collègue. Or, il était clair dans la littérature que la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 s'associe aussi aux régions codantes. Au même temps, une expérience de puces Affymetrix de promoteurs

(ChIP-CHIP) a été réalisée par notre équipe dans le but d'identifier des éléments de réponses propres à AlbZIP. Cette expérience a révélé d'autres régions liées par la forme active d'AlbZIP sur le gène de CREB3. Fait intéressant parmi ces régions, nous avons trouvé une région couvrant l'intron 1 et l'exon 2 (Figure 5-1). Grâce à des amorces ciblant cette région, j'ai réussi à démontrer qu'AlbZIP recrute WDR5 au niveau de la région transcrite du gène CREB3 et que cette liaison de WDR5 à l'ADN est dépendante d'AlbZIP. Grâce à l'expérience de ChIP-CHIP, de nouveaux gènes ont été identifiés comme cibles potentielles d'AlbZIP. COPZ1 fait partie de cette liste de cibles potentielles et parmi les régions découvertes sur son promoteur, il y en a une qui couvre l'intron 1 (Figure 5-1). La même expérience d'immunoprécipitation de la chromatine décrite plus tôt a été réalisée. J'ai réussi à montrer qu'au niveau de cette région, il y a recrutement de WDR5 seulement en présence d'AlbZIP.



**Figure 5-1** : Représentation schématique du promoteur du gène de CREB3 et COPZ1.

Ensemble ces informations nous permettent de comprendre comment AlbZIP active l'expression de ces gènes cibles. Cette activation est observée, *in vitro*, par essai luciférase qui démontre l'effet de l'ajout de WDR5 sur l'activité de la forme nucléaire d'AlbZIP via l'élément de réponse UPRE (TGACGTGG). Le seul problème avec cet essai est malheureusement l'effet de la surexpression de WDR5 sur la luciférase «*Renilla*». Vu l'implication de WDR5 dans la régulation de la transcription, sa surexpression agit probablement sur la transcription générale et augmente considérablement la valeur de la

luciférase «*Renilla*». Cette luciférase est le contrôle interne de l'expression qui reflète le pourcentage de cellules transfectées dans chaque puits. Elle est utilisée pour normaliser les valeurs de la luciférase «*Firefly*» mesurée dans chaque puits. Or, la transfection de WDR5 dans le puits augmente la valeur de la «*Renilla*» de 2 fois ce qui fausse le résultat final et m'oblige à utiliser les résultats bruts de cet essai. Le problème occasionné par la surexpression de WDR5 a été contourné par l'utilisation d'un ARN d'interférence contre WDR5. En effet, la transfection de cet ARN d'interférence a permis d'observer la diminution de l'activité de la forme nucléaire d'AIBZIP via l'élément de réponse UPRE. À mon avis, l'inhibition de l'expression de WDR5 aura un effet sur la modification de la chromatine et, par conséquent, sur l'initiation de la transcription. Encore, grâce à cette expérience, nous pourrions observer l'effet de cette inhibition sur l'expression des gènes cibles d'AIBZIP.

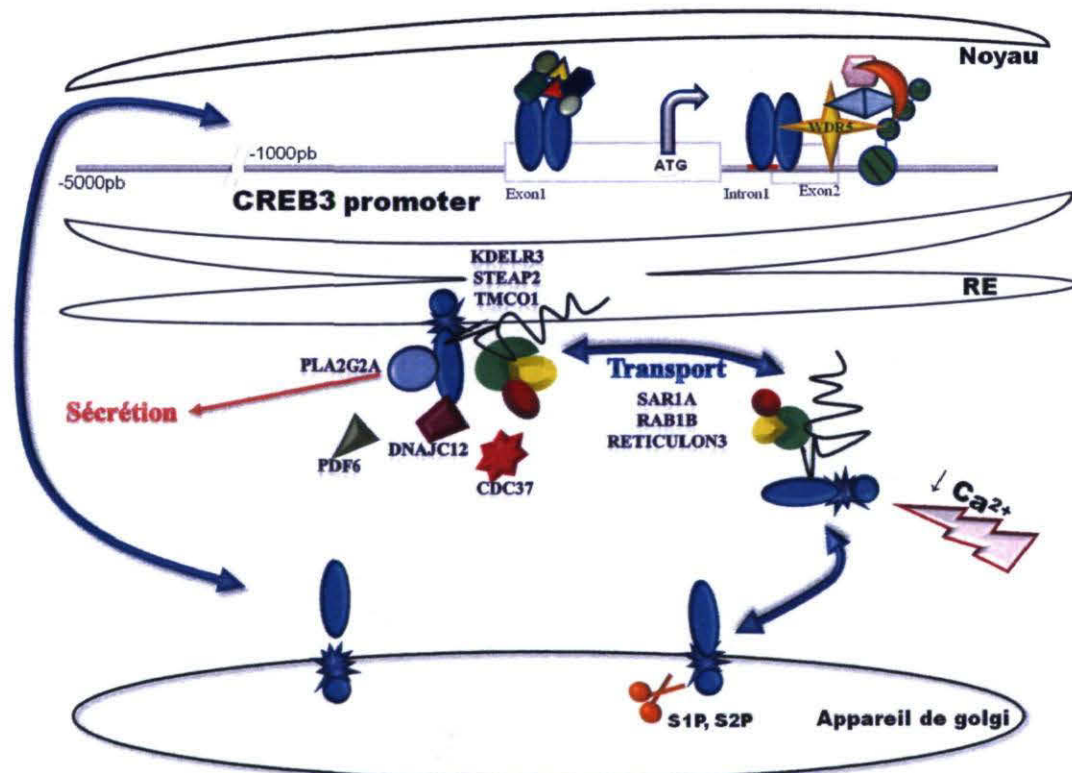
En récapitulant, la forme nucléaire d'AIBZIP recrute WDR5 au niveau de la région transcrite du gène cible pour modifier la chromatine et la rendre accessible à la machinerie de la transcription. Je pense qu'à son tour, WDR5 recrute un complexe protéique de méthyltransférase pour la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 nécessaire à l'activation de la transcription. Pour confirmer l'interaction entre AIBZIP et WDR5, j'ai réalisé un essai de type «pull down» dans lequel j'ai incubé la protéine de fusion GST-WDR5 avec des extraits nucléaires provenant de cellules LNCaP traitées avec l'agent A23187 pendant 6 heures. L'éluat a été ensuite analysé par immunobuvardage en utilisant un anticorps dirigé contre la forme nucléaire d'AIBZIP endogène. Toutefois, cet éluat pourra être analysé par spectrométrie de masse. Les candidats obtenus par ce séquençage constitueraient des partenaires potentiels directs et indirects d'AIBZIP et WDR5. Nous savons déjà que WDR5 constitue le composant central de certains NRC contenant des méthyltransférases. Comme AIBZIP recrute WDR5 sur l'ADN donc, sans doute, elle recrute le NRC dont elle fait partie. Cette expérience pourra nous renseigner sur la composition de ce NRC et sur l'identité de la méthyltransférase utilisée dans ce contexte.

Aucun partenaire de la forme nucléaire d'AIBZIP n'a été identifié à ce jour. Par contre une étude publiée en 2006 par l'équipe du Dr Nojima a permis d'identifier la chaperonne HIRA comme partenaire de la forme murine d'AIBZIP Tisp40. HIRA est la chaperonne de l'histone H3, impliquée dans le dépôt et/ou le remplacement de l'histone H3 (H3.3). De

plus, cette étude a montré que l'hétérodimère Tisp40/Crem lie l'élément de réponse CRE et recrute HIRA. Toutefois, ce recrutement est dépendant de la présence de Tisp40 (Nagamori, Yomogida et al. 2006).

Une autre étude publiée par l'équipe du Dr Yoon en 2010 a identifié, grâce à une expérience de double hybride chez la levure, CREB3 comme partenaire de l'histone déacétylase HDAC3. Cette enzyme est impliquée dans la modification des protéines non histones par désacétylation. La forme nucléaire de CREB3 interagit spécifiquement avec HDAC3 *in vivo* et *in vitro*. De plus, la liaison de ce complexe à l'ADN est associée à la répression de l'activité de CREB3. D'ailleurs, il a été démontré que la surexpression de CREB3 induit l'expression de son gène cible CXCR4 suite à la dissociation de HDAC3 et qu'un ARN d'interférence dirigé contre HDAC3 augmente l'effet activateur de CREB3. Donc HDAC3 joue un rôle inhibiteur sur CREB3 (Kim, Choi et al. 2010).

Donc comme Tisp40 et CREB3, A1bZIP contribuerait via WDR5 à la modification, par méthylation, de la queue de l'histone H3 au niveau de la lysine 4 pour rendre la chromatine accessible et initier la transcription de son gène cible (Figure 5-2).





**Figure 5-2:** Figure récapitulative. L'environnement dans lequel se trouve AlbZIP avant et après le stress du RE et sa fonction dans la réponse à ce stress.

## 2. Conclusion

AlbZIP semble jouer un rôle important dans la réponse au stress du RE suite à la perturbation des concentrations calciques de ce dernier. De plus, sa surexpression au niveau des cellules prostatiques cancéreuses humaines nous intrigue quant à son rôle dans le cancer de la prostate. Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de mieux comprendre l'implication d'AlbZIP dans la réponse au stress en découvrant l'environnement qui l'entoure et qui participe avec elle à cette réponse. De plus, les outils que j'ai développés pourront aider les générations futures à décortiquer le rôle d'AlbZIP dans le cancer de la prostate.

En effet, le 1<sup>er</sup> projet de ma thèse m'a permis de générer et caractériser un dominant négatif puissant à haute affinité pour AlbZIP dans les LNCaP. Ce dernier constitue un outil très intéressant pour mieux cerner le rôle physiologique d'AlbZIP en observant l'impact de son inactivation sur ses gènes cibles mais aussi sur les cellules prostatiques cancéreuses humaines.

De plus, lors de mon second projet j'ai mis au point une méthode d'immunopurification qui pourra servir pour d'autres expériences. Cette étude a permis d'identifier plusieurs partenaires d'AlbZIP. Ces protéines s'associent avec la forme pleine longueur d'AlbZIP ancrée au RE. Elles pourraient participer à sa retenue au RE ou à son transport vers l'appareil de Golgi en réponse au stress de ce dernier. D'autres protéines pourraient être impliquées dans d'autres voies encore inconnues. L'ensemble de ces données constitue une avancée importante dans la compréhension du mécanisme d'activation d'AlbZIP et ouvre de nouvelles issues quant au rôle d'AlbZIP dans les processus physiologiques et physiopathologiques.

Finalement, la 3<sup>ème</sup> partie de ma thèse a permis d'identifier et de caractériser un des co-facteurs de la forme nucléaire d'AlbZIP. Une fois au noyau, AlbZIP recrute WDR5 pour activer l'expression de ses gènes cibles. Cette étude a permis de comprendre exactement le mécanisme d'action d'AlbZIP dans la régulation de ses gènes cibles.



## Bibliographie

- Adham, I. M., T. J. Eck, et al. (2005). "Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice." *Mol Cell Biol* **25**(17): 7657-64.
- Agoulnik, I. U. and N. L. Weigel (2006). "Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer." *J Cell Biochem* **99**(2): 362-72.
- Amoutzias, G. D., D. L. Robertson, et al. (2008). "Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors." *Trends Biochem Sci* **33**(5): 220-9.
- Antony, J. M., K. K. Ellestad, et al. (2007). "The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes." *J Immunol* **179**(2): 1210-24.
- Audas, T. E., Y. Li, et al. (2008). "A novel protein, Luman/CREB3 recruitment factor, inhibits Luman activation of the unfolded protein response." *Mol Cell Biol* **28**(12): 3952-66.
- Bailey, D., C. Barreca, et al. (2007). "Trafficking of the bZIP transmembrane transcription factor CREB-H into alternate pathways of ERAD and stress-regulated intramembrane proteolysis." *Traffic* **8**(12): 1796-814.
- Bailey, D. and P. O'Hare (2007). "Transmembrane bZIP transcription factors in ER stress signaling and the unfolded protein response." *Antioxid Redox Signal* **9**(12): 2305-21.
- Barlowe, C. (2002). "Three-dimensional structure of a COPII prebudding complex." *Dev Cell* **3**(4): 467-8.
- Ben Aicha, S., J. Lessard, et al. (2007). "Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AlbZIP/CREB3L4 in prostate cells." *Physiol Genomics* **31**(2): 295-305.
- Bengochea-Alonso, M. T. and J. Ericsson (2007). "SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond." *Curr Opin Cell Biol* **19**(2): 215-22.
- Berg, T. (2008). "Inhibition of transcription factors with small organic molecules." *Curr Opin Chem Biol* **12**(4): 464-71.
- Brown, M. S., J. Ye, et al. (2000). "Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans." *Cell* **100**(4): 391-8.
- Burd, C. J., L. M. Morey, et al. (2006). "Androgen receptor corepressors and prostate cancer." *Endocr Relat Cancer* **13**(4): 979-94.
- Burdakov, D., O. H. Petersen, et al. (2005). "Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function." *Cell Calcium* **38**(3-4): 303-10.
- Carmo-Fonseca, M. (2002). "The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation." *Cell* **108**(4): 513-21.
- Chan, C. P., T. Y. Mak, et al. (2010). "N-linked glycosylation is required for optimal proteolytic activation of membrane-bound transcription factor CREB-H." *J Cell Sci* **123**(Pt 9): 1438-48.
- Chihara, K., A. Saito, et al. (2009). "Increased vulnerability of hippocampal pyramidal neurons to the toxicity of kainic acid in OASIS-deficient mice." *J Neurochem* **110**(3): 956-65.

- Chin, K. T., H. J. Zhou, et al. (2005). "The liver-enriched transcription factor CREB-H is a growth suppressor protein underexpressed in hepatocellular carcinoma." Nucleic Acids Res **33**(6): 1859-73.
- Choi, K. C., M. G. Jung, et al. (2009). "Epigallocatechin-3-gallate, a histone acetyltransferase inhibitor, inhibits EBV-induced B lymphocyte transformation via suppression of RelA acetylation." Cancer Res **69**(2): 583-92.
- Couture, J. F., E. Collazo, et al. (2006). "Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5." Nat Struct Mol Biol **13**(8): 698-703.
- Coyle, J. T., J. W. Ferkany, et al. (1983). "Kainic acid: insights from a neurotoxin into the pathophysiology of Huntington's disease." Neurobehav Toxicol Teratol **5**(6): 617-24.
- Cunha, A. C., B. Weigle, et al. (2006). "Tissue-specificity of prostate specific antigens: comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues." Cancer Lett **236**(2): 229-38.
- Danno, H., K. A. Ishii, et al. (2009). "The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPARalpha." Biochem Biophys Res Commun **391**(2): 1222-7.
- Dejgaard, S., J. Nicolay, et al. (2004). "The ER glycoprotein quality control system." Curr Issues Mol Biol **6**(1): 29-42.
- DenBoer, L. M., P. W. Hardy-Smith, et al. (2005). "Luman is capable of binding and activating transcription from the unfolded protein response element." Biochem Biophys Res Commun **331**(1): 113-9.
- Deppmann, C. D., R. S. Alvania, et al. (2006). "Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: Insight into the evolution of closed interaction networks." Mol Biol Evol **23**(8): 1480-92.
- Dou, Y. L., T. A. Milne, et al. (2006). "Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components." Nature Structural & Molecular Biology **13**(8): 713-719.
- El-Alfy, M., L. Azzi, et al. (2006). "Stage-specific expression of the Atce1/Tisp40alpha isoform of CREB3L4 in mouse spermatids." J Androl **27**(5): 686-94.
- Eleveld-Trancikova, D., A. Sanecka, et al. (2010). "DC-STAMP interacts with ER-resident transcription factor LUMAN which becomes activated during DC maturation." Mol Immunol **47**(11-12): 1963-73.
- Ellgaard, L. and A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 181-91.
- Fagone, P. and S. Jackowski (2009). "Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function." J Lipid Res **50** *Suppl*: S311-6.
- Farnham, P. J. (2009). "Insights from genomic profiling of transcription factors." Nat Rev Genet **10**(9): 605-16.
- Ferkany, J. W., R. Zaczek, et al. (1984). "The mechanism of kainic acid neurotoxicity." Nature **308**(5959): 561-2.
- Fong, J. H., A. E. Keating, et al. (2004). "Predicting specificity in bZIP coiled-coil protein interactions." Genome Biol **5**(2): R11.
- Freiman, R. N. and W. Herr (1997). "Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP." Genes Dev **11**(23): 3122-7.

- Fujii, T., K. Tamura, et al. (2002). "Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is up-regulated during spermiogenesis." EMBO Rep **3**(4): 367-72.
- Gan, Q., P. Thiebaud, et al. (2011). "WD repeat-containing protein 5, a ubiquitously expressed histone methyltransferase adaptor protein, regulates smooth muscle cell selective gene activation through interaction with pituitary homeobox 2." J Biol Chem.
- Garapaty, S., C. F. Xu, et al. (2009). "Identification and characterization of a novel nuclear protein complex involved in nuclear hormone receptor-mediated gene regulation." J Biol Chem **284**(12): 7542-52.
- Gil, S., D. Yosef, et al. (2006). "The enigma of ATCE1, an acrosome-associated transcription factor." Dev Biol **298**(1): 201-11.
- Gori, F., P. Divieti, et al. (2001). "Cloning and characterization of a novel WD-40 repeat protein that dramatically accelerates osteoblastic differentiation." J Biol Chem **276**(49): 46515-22.
- Grant, P. A. (2001). "A tale of histone modifications." Genome Biol **2**(4): REVIEWS0003.
- Grigoryan, G., A. W. Reinke, et al. (2009). "Design of protein-interaction specificity gives selective bZIP-binding peptides." Nature **458**(7240): 859-64.
- Havlis, J., H. Thomas, et al. (2003). "Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins." Anal Chem **75**(6): 1300-6.
- Haze, K., H. Yoshida, et al. (1999). "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." Mol Biol Cell **10**(11): 3787-99.
- Hikake, T., T. Mori, et al. (2003). "Comparison of expression patterns between CREB family transcription factor OASIS and proteoglycan core protein genes during murine tooth development." Anat Embryol (Berl) **206**(5): 373-80.
- Honma, Y., K. Kanazawa, et al. (1999). "Identification of a novel gene, OASIS, which encodes for a putative CREB/ATF family transcription factor in the long-term cultured astrocytes and gliotic tissue." Brain Res Mol Brain Res **69**(1): 93-103.
- Hori, O., F. Ichinoda, et al. (2004). "Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response." Genes Cells **9**(5): 457-69.
- Horoszewicz, J. S., S. S. Leong, et al. (1983). "LNCaP model of human prostatic carcinoma." Cancer Res **43**(4): 1809-18.
- Huang, H., H. Que, et al. (2009). "Preparation and characterization of murine monoclonal antibodies against rat spinal cord injury and regeneration related protein no. 69." Hybridoma (Larchmt) **28**(1): 27-31.
- Jang, S. W., Y. S. Kim, et al. (2007). "Regulation of human LZIP expression by NF-kappaB and its involvement in monocyte cell migration induced by Lkn-1." J Biol Chem **282**(15): 11092-100.
- Jang, S. W., Y. S. Kim, et al. (2007). "Role of human LZIP in differential activation of the NF-kappaB pathway that is induced by CCR1-dependent chemokines." J Cell Physiol **211**(3): 630-7.
- Jenster, G. (1999). "The role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer." Semin Oncol **26**(4): 407-21.
- Jin, D. Y., H. L. Wang, et al. (2000). "Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation." EMBO J **19**(4): 729-40.

- Johnson, K. M., S. S. Mahajan, et al. (1999). "Herpes simplex virus transactivator VP16 discriminates between HCF-1 and a novel family member, HCF-2." *J Virol* **73**(5): 3930-40.
- Johnstone, R. W. (2002). "Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer." *Nat Rev Drug Discov* **1**(4): 287-99.
- Kallajoki, M., K. A. Alanen, et al. (1998). "Group II phospholipase A2 in human male reproductive organs and genital tumors." *Prostate* **35**(4): 263-72.
- Kaufman, R. J. (2002). "Orchestrating the unfolded protein response in health and disease." *J Clin Invest* **110**(10): 1389-98.
- Kaufman, R. J., D. Scheuner, et al. (2002). "The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(6): 411-21.
- Kim, H. C., K. C. Choi, et al. "HDAC3 selectively represses CREB3-mediated transcription and migration of metastatic breast cancer cells." *Cell Mol Life Sci* **67**(20): 3499-510.
- Kim, H. C., K. C. Choi, et al. (2010). "HDAC3 selectively represses CREB3-mediated transcription and migration of metastatic breast cancer cells." *Cell Mol Life Sci* **67**(20): 3499-510.
- Kim, T. Y., E. Kim, et al. (2008). "Herp enhances ER-associated protein degradation by recruiting ubiquitins." *Biochem Biophys Res Commun* **369**(2): 741-6.
- Kitamura, M. (2008). "Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces." *Am J Physiol Renal Physiol* **295**(2): F323-34.
- Ko, J., S. W. Jang, et al. (2004). "Human LZIP binds to CCR1 and differentially affects the chemotactic activities of CCR1-dependent chemokines." *FASEB J* **18**(7): 890-2.
- Kondo, S., T. Murakami, et al. (2005). "OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes." *Nat Cell Biol* **7**(2): 186-94.
- Kondo, S., A. Saito, et al. (2007). "BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer." *Mol Cell Biol* **27**(5): 1716-29.
- Krylov, D., M. Olive, et al. (1995). "Extending dimerization interfaces: the bZIP basic region can form a coiled coil." *EMBO J* **14**(21): 5329-37.
- Kuznetsov, G. and S. K. Nigam (1998). "Folding of secretory and membrane proteins." *N Engl J Med* **339**(23): 1688-95.
- Labrie, C., J. Lessard, et al. (2008). "Androgen-regulated transcription factor A1bZIP in prostate cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* **108**(3-5): 237-44.
- Latchman, D. S. (1990). "Eukaryotic transcription factors." *Biochem J* **270**(2): 281-9.
- Lessard, J., S. B. Aicha, et al. (2007). "Characterization of the RSL1-dependent conditional expression system in LNCaP prostate cancer cells and development of a single vector format." *Prostate* **67**(8): 808-19.
- Levesque, M. H., M. El-Alfy, et al. (2007). "Evaluation of A1bZIP and Cdc47 as markers for human prostatic diseases." *Urology* **69**(1): 196-201.
- Li, J., G. Ning, et al. (2000). "Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha." *Genes Dev* **14**(4): 464-74.
- Liang, G., T. E. Audas, et al. (2006). "Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element." *Mol Cell Biol* **26**(21): 7999-8010.

- Lu, R. and V. Misra (2000). "Zhangfei: a second cellular protein interacts with herpes simplex virus accessory factor HCF in a manner similar to Luman and VP16." *Nucleic Acids Res* **28**(12): 2446-54.
- Lu, R., P. Yang, et al. (1997). "Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor." *Mol Cell Biol* **17**(9): 5117-26.
- Lu, R., P. Yang, et al. (1998). "The herpesvirus transactivator VP16 mimics a human basic domain leucine zipper protein, luman, in its interaction with HCF." *J Virol* **72**(8): 6291-7.
- Luciano, R. L. and A. C. Wilson (2000). "N-terminal transcriptional activation domain of LZIP comprises two LxxLL motifs and the host cell factor-1 binding motif." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20): 10757-62.
- Luebke-Wheeler, J., K. Zhang, et al. (2008). "Hepatocyte nuclear factor 4alpha is implicated in endoplasmic reticulum stress-induced acute phase response by regulating expression of cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein H." *Hepatology* **48**(4): 1242-50.
- Lui, W. O., L. Zeng, et al. (2008). "CREB3L2-PPARgamma fusion mutation identifies a thyroid signaling pathway regulated by intramembrane proteolysis." *Cancer Res* **68**(17): 7156-64.
- Ma, Y. and L. M. Hendershot (2002). "The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress." *Cell Stress Chaperones* **7**(2): 222-9.
- Malhotra, J. D. and R. J. Kaufman (2007). "The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response." *Semin Cell Dev Biol* **18**(6): 716-31.
- Mandl, J., T. Meszaros, et al. (2009). "Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology." *Trends Endocrinol Metab* **20**(4): 194-201.
- Mason, J. M. and K. M. Arndt (2004). "Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications." *Chembiochem* **5**(2): 170-6.
- Mason, J. M., M. M. K., et al. (2008). "iPEP: peptides designed and selected for interfering with protein interaction and function." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 6): 1442-7.
- Mason, J. M., M. A. Schmitz, et al. (2006). "Semirational design of Jun-Fos coiled coils with increased affinity: Universal implications for leucine zipper prediction and design." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(24): 8989-94.
- Mast, S. W., K. Diekman, et al. (2005). "Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins." *Glycobiology* **15**(4): 421-36.
- Mees, C., J. Nemunaitis, et al. (2009). "Transcription factors: their potential as targets for an individualized therapeutic approach to cancer." *Cancer Gene Ther* **16**(2): 103-12.
- Misra, V., N. Rapin, et al. (2005). "Zhangfei is a potent and specific inhibitor of the host cell factor-binding transcription factor Luman." *J Biol Chem* **280**(15): 15257-66.
- Monte, M., M. Simonatto, et al. (2006). "MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(30): 11160-5.
- Murakami, T., S. Kondo, et al. (2006). "Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress." *J Neurochem* **96**(4): 1090-100.



- Murakami, T., A. Saito, et al. (2009). "Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation." *Nat Cell Biol* **11**(10): 1205-11.
- Nagamori, I., N. Yabuta, et al. (2005). "Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway." *Genes Cells* **10**(6): 575-94.
- Nagamori, I., K. Yomogida, et al. (2006). "Transcription factors, cAMP-responsive element modulator (CREM) and Tisp40, act in concert in postmeiotic transcriptional regulation." *J Biol Chem* **281**(22): 15073-81.
- Nagamori, I., K. Yomogida, et al. (2006). "The testes-specific bZip type transcription factor Tisp40 plays a role in ER stress responses and chromatin packaging during spermiogenesis." *Genes Cells* **11**(10): 1161-71.
- Newman, J. R. and A. E. Keating (2003). "Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays." *Science* **300**(5628): 2097-101.
- Newport, J. W. and D. J. Forbes (1987). "The nucleus: structure, function, and dynamics." *Annu Rev Biochem* **56**: 535-65.
- Nicchitta, C. V. (2002). "A platform for compartmentalized protein synthesis: protein translation and translocation in the ER." *Curr Opin Cell Biol* **14**(4): 412-6.
- Nikaido, T., S. Yokoya, et al. (2001). "Expression of the novel transcription factor OASIS, which belongs to the CREB/ATF family, in mouse embryo with special reference to bone development." *Histochem Cell Biol* **116**(2): 141-8.
- Omori, Y., J. Imai, et al. (2002). "OASIS is a transcriptional activator of CREB/ATF family with a transmembrane domain." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(1): 470-7.
- Omori, Y., J. Imai, et al. (2001). "CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression." *Nucleic Acids Res* **29**(10): 2154-62.
- Panagopoulos, I., E. Moller, et al. (2007). "Characterization of the native CREB3L2 transcription factor and the FUS/CREB3L2 chimera." *Genes Chromosomes Cancer* **46**(2): 181-91.
- Panagopoulos, I., C. T. Storlazzi, et al. (2004). "The chimeric FUS/CREB3L2 gene is specific for low-grade fibromyxoid sarcoma." *Genes Chromosomes Cancer* **40**(3): 218-28.
- Perry, J. E., M. E. Grossmann, et al. (1996). "Androgen regulation of gene expression." *Prostate Suppl* **6**: 79-81.
- Pfluger, J. and D. Wagner (2007). "Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants." *Curr Opin Plant Biol* **10**(6): 645-52.
- Puig, O., F. Caspary, et al. (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification." *Methods* **24**(3): 218-29.
- Qi, H., C. Fillion, et al. (2002). "AIBZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells." *Cancer Res* **62**(3): 721-33.
- Qi, Y. M., T. Lei, et al. (2009). "Genomic organization, alternative splicing and tissues expression of porcine CREB3L4 gene." *Mol Biol Rep* **36**(7): 1881-8.
- Rago, C., N. Rapin, et al. (2002). "Luman, the cellular counterpart of herpes simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis." *Mol Cell Biol* **22**(16): 5639-49.

- Reddy, R. K., C. Mao, et al. (2003). "Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation." *J Biol Chem* **278**(23): 20915-24.
- Reinke, A. W., R. A. Grant, et al. "A synthetic coiled-coil interactome provides heterospecific modules for molecular engineering." *J Am Chem Soc* **132**(17): 6025-31.
- Saito, A., S. Hino, et al. (2009). "Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis." *Nat Cell Biol* **11**(10): 1197-204.
- Saito, A., S. Hino, et al. (2007). "A novel ER stress transducer, OASIS, expressed in astrocytes." *Antioxid Redox Signal* **9**(5): 563-71.
- Sakai, J., A. Nohturfft, et al. (1997). "Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein." *J Biol Chem* **272**(32): 20213-21.
- Sannerud, R. and W. Annaert (2009). "Trafficking, a key player in regulated intramembrane proteolysis." *Semin Cell Dev Biol* **20**(2): 183-90.
- Schindler, A. J. and R. Schekman (2009). "In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(42): 17775-80.
- Schmidt, U., S. Fuessel, et al. (2006). "Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer." *Prostate* **66**(14): 1521-34.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "The mammalian unfolded protein response." *Annu Rev Biochem* **74**: 739-89.
- Schubert, S. W., A. Abendroth, et al. (2008). "bZIP-Type transcription factors CREB and OASIS bind and stimulate the promoter of the mammalian transcription factor GCMa/Gcm1 in trophoblast cells." *Nucleic Acids Res* **36**(11): 3834-46.
- Schuetz, A., A. Allali-Hassani, et al. (2006). "Structural basis for molecular recognition and presentation of histone H3 by WDR5." *EMBO J* **25**(18): 4245-52.
- Shen, J., X. Chen, et al. (2002). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals." *Dev Cell* **3**(1): 99-111.
- Shen, X., R. E. Ellis, et al. (2005). "Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*." *PLoS Genet* **1**(3): e37.
- Shen, X., K. Zhang, et al. (2004). "The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum." *J Chem Neuroanat* **28**(1-2): 79-92.
- Sheng, Z., S. K. Evans, et al. "An activating transcription factor 5-mediated survival pathway as a target for cancer therapy?" *Oncotarget* **1**(6): 457-60.
- Sheng, Z., L. Li, et al. "A genome-wide RNA interference screen reveals an essential CREB3L2-ATF5-MCL1 survival pathway in malignant glioma with therapeutic implications." *Nat Med* **16**(6): 671-7.
- Shevchenko, A., M. Wilm, et al. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem* **68**(5): 850-8.
- Spector, D. L. (2001). "Nuclear domains." *J Cell Sci* **114**(Pt 16): 2891-3.
- Stelzer, G. and J. Don (2002). "Atcel1: a novel mouse cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive element-binding protein-like gene exclusively expressed in postmeiotic spermatids." *Endocrinology* **143**(5): 1578-88.

- Steward, M. M., J. S. Lee, et al. (2006). "Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes." Nature Structural & Molecular Biology **13**(9): 852-854.
- Stirling, J. and P. O'Hare (2006). "CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P." Mol Biol Cell **17**(1): 413-26.
- Storlazzi, C. T., F. Mertens, et al. (2003). "Fusion of the FUS and BFBF2H7 genes in low grade fibromyxoid sarcoma." Hum Mol Genet **12**(18): 2349-58.
- Sun, L. P., J. Seemann, et al. (2007). "Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(16): 6519-26.
- Sung, H. J., Y. S. Kim, et al. (2008). "Human LZIP induces monocyte CC chemokine receptor 2 expression leading to enhancement of monocyte chemoattractant protein 1/CCL2-induced cell migration." Exp Mol Med **40**(3): 332-8.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, et al. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep **7**(9): 880-5.
- Tabata, T., K. Kokura, et al. (2009). "Ski co-repressor complexes maintain the basal repressed state of the TGF-beta target gene, SMAD7, via HDAC3 and PRMT5." Genes Cells **14**(1): 17-28.
- Tanegashima, K., H. Zhao, et al. (2009). "Coordinated activation of the secretory pathway during notochord formation in the *Xenopus* embryo." Development **136**(21): 3543-8.
- Trapman, J. and K. B. Cleutjens (1997). "Androgen-regulated gene expression in prostate cancer." Semin Cancer Biol **8**(1): 29-36.
- Vecchi, C., G. Montosi, et al. (2009). "ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin." Science **325**(5942): 877-80.
- Vinson, C., M. Myakishev, et al. (2002). "Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties." Mol Cell Biol **22**(18): 6321-35.
- Wang, X., D. M. Truckses, et al. (2007). "Conserved region I of human coactivator TAF4 binds to a short hydrophobic motif present in transcriptional regulators." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7839-44.
- Warren, A. J. (2002). "Eukaryotic transcription factors." Curr Opin Struct Biol **12**(1): 107-14.
- Wegmann, D., P. Hess, et al. (2004). "Novel isotypic gamma/zeta subunits reveal three coatomer complexes in mammals." Mol Cell Biol **24**(3): 1070-80.
- Wysocka, J., M. P. Myers, et al. (2003). "Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1." Genes Dev **17**(7): 896-911.
- Wysocka, J., T. Swigut, et al. (2005). "WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3K4 methylation and vertebrate development." Cell **121**(6): 859-872.
- Xu, C., B. Bailly-Maitre, et al. (2005). "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions." J Clin Invest **115**(10): 2656-64.
- Yang, C. K., J. H. Kim, et al. (2006). "Differential use of functional domains by coiled-coil coactivator in its synergistic coactivator function with beta-catenin or GRIP1." J Biol Chem **281**(6): 3389-97.

- Yoshida, H., K. Haze, et al. (1998). "Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors." *J Biol Chem* **273**(50): 33741-9.
- Zhang, K., X. Shen, et al. (2006). "Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response." *Cell* **124**(3): 587-99.
- Zhong, N., G. Ramaswamy, et al. (2009). "Apolipoprotein E4 domain interaction induces endoplasmic reticulum stress and impairs astrocyte function." *J Biol Chem* **284**(40): 27273-80.
- Zhou, H. J., C. M. Wong, et al. (2001). "Inhibition of LZIP-mediated transcription through direct interaction with a novel host cell factor-like protein." *J Biol Chem* **276**(31): 28933-8.
- Zoppe, M., A. Frattini, et al. (1996). "The complete sequence of the host cell factor 1 (HCFC1) gene and its promoter: a role for YY1 transcription factor in the regulation of its expression." *Genomics* **34**(1): 85-91.