

Université de Sherbrooke

**ANALYSE PROTÉOMIQUE DE NOTCH1 : EXPLOITATION D'UN SYSTÈME
FIABLE POUR L'IDENTIFICATION DE NOUVEAUX PARTENAIRES
D'INTERACTION**

Par
Maureen Thompson
Programme de Biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maitre ès sciences (M. Sc.)
en Biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Septembre 2015

Membres du jury d'évaluation
Pr François-Michel Boisvert, programme de Biologie cellulaire
Pre Marie-Josée Boucher, programme de Biologie cellulaire
Pre Nathalie Perreault, programme de Biologie cellulaire
Pr Brendan Bell, programme de Microbiologie

© Maureen Thompson, 2015

RÉSUMÉ

Analyse protéomique de NOTCH1 : Exploitation d'un système fiable pour l'identification de nouveaux partenaires d'interaction

Par
Maureen Thompson
Programme de Biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

NOTCH1 est un récepteur transmembranaire qui, suite à la liaison de son ligand, subit une série de clivages protéolytiques libérant un fragment intracellulaire actif NIC1. Une fois libéré, NIC1 transloque au noyau où il s'associe à des cofacteurs transcriptionnels tels CSL et MAML1 afin d'initier la transcription de gènes cibles dont *HES1*. La voie Notch joue un rôle dans différents processus cellulaires, dont la prolifération, la mort cellulaire et la différenciation cellulaire. En conséquence, une mauvaise régulation ou une perte d'activité de cette voie de signalisation mène à des maladies humaines telles que des pathologies du développement et le cancer. De ce fait, la voie Notch est grandement régulée à divers niveaux. Entre autres, NIC1 subit des modifications post-traductionnelles qui régulent sa stabilité et par conséquent influence la durée du signal NOTCH1. L'activité transcriptionnelle de NIC1 est également régulée via le recrutement coordonné de cofacteurs transcriptionnels. Malgré tout, très peu de choses sont connues quant aux modifications post-traductionnelles pouvant moduler spécifiquement l'activité du complexe transcriptionnel formé par NIC1. De plus, les études jusqu'à présent n'ont pas permis d'identifier tous les partenaires d'interaction se retrouvant dans le complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1 et pouvant moduler son activité. Ainsi, l'objectif de cette étude était d'établir un système permettant l'identification de nouveaux partenaires transcriptionnels de NIC1. Nous avons exprimé une forme tronquée et constitutivement clivée de Notch1 et, suivant des analyses par spectrométrie de masse, nos résultats suggèrent l'interaction possible de NIC1 avec des membres du complexe médiateur et d'autres protéines impliquées dans la régulation génique. Nous avons également exprimé un NIC1-GFP et nos travaux ont permis de montrer qu'il était principalement localisé au noyau, où il s'associe à l'ARN polymérase II, et qu'il est dégradé par le protéasome. Suivant des analyses par spectrométrie de masse, nos résultats suggèrent l'interaction possible de NIC1 avec plusieurs régulateurs transcriptionnels et des protéines impliqués dans l'ubiquitination/Sumoylation. Bref, les analyses protéomiques sont un bon système d'exploitation pour l'identification de nouveaux partenaires d'interaction de NIC1. Ainsi, notre étude permettra une meilleure compréhension de la signalisation Notch d'apparence simple, mais plutôt complexe.

Mots clés : Notch, phosphorylation, transcription, spectrométrie de masse

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
I. Introduction.....	1
1.1 La voie de signalisation Notch.....	1
1.1.1 Organisation structurelle des récepteurs Notch.....	1
1.1.2 Organisation structurelle des ligands de Notch.....	3
1.1.3 Biosynthèse et maturation des récepteurs Notch.....	5
1.1.4 Mécanisme d'activation des récepteurs Notch.....	6
1.1.5 Les gènes cibles de la voie Notch.....	9
1.1.6 Rôles cellulaires de Notch et pathologies associées.....	11
1.2 Régulation de l'activité transcriptionnelle de NIC.....	14
1.2.1 Généralité sur la transcription.....	14
1.2.2 Répression des gènes cibles de Notch en absence de NIC.....	16
1.2.3 Co-activateurs de NIC et régulateurs épigénétiques.....	16
1.3 Régulation de la stabilité de NIC.....	19
1.3.1 Phosphorylation de NIC.....	19
1.3.2 Ubiquitination de NIC.....	20
1.3.3 Acétylation de NIC.....	20
1.3.4 Hydroxylation de NIC.....	21
1.4 Interactions potentielles entre la signalisation Notch et d'autres voies de signalisation.....	21
II. Matériel et méthodes.....	25
2.1 Les modèles cellulaires.....	25
2.2 Modulation de la voie de signalisation Notch.....	25
2.3 Vecteurs d'expression.....	26
2.4 Transfection transitoire.....	28
2.5 Transfection stable.....	28
2.6 Extraction des protéines.....	29
2.6.1 Lyse Triton.....	29

2.6.2 Lyse avec forte concentration en sels.....	30
2.6.3 Fractionnement cellulaire à l'aide de la nucléase micrococcale.....	30
2.6.4 Fractionnement cellulaire	32
2.7 Immunobuvardage.....	32
2.8 Immunoprécipitation.....	35
2.9 Essai phosphatase <i>in vitro</i>	36
2.10 Microscopie à fluorescence	36
2.11 Essai luciférase.....	37
2.12 Méthode SILAC et digestion à la trypsine	38
2.13 LC-MS/MS	39
2.14 Analyses bioinformatiques.....	40
III. Résultats	42
3.1 La forme clivée du récepteur NOTCH1, NIC1, subit des modifications post-traductionnelles.....	42
3.2 Notch1ΔE est une forme tronquée de Notch1, constitutivement activée par clivage via le complexe gamma-sécrétase, et mène à l'expression de NIC1.	43
3.3 NIC1 subit des modifications post-traductionnelles incluant la phosphorylation et s'associe à son partenaire transcriptionnel MAML1 dans les cellules pancréatiques tumorales humaines	44
3.4 Les analyses par spectrométrie de masse suggèrent l'interaction du NIC1 murin avec des protéines du complexe médiateur.....	45
3.5 NIC1-GFP est majoritairement localisé au noyau, où il peut s'associer à l'ARN polymérase II.....	49
3.6 NIC1-GFP est une protéine de courte demi-vie et dégradée par le protéasome....	51
3.7 Les 4 résidus sérine ne semblent pas être des sites de phosphorylation essentiels à la localisation cellulaire de NIC1.....	53
3.8 Les sérines 2521-24 de NIC1 ne semblent pas influencer la formation du complexe NIC1/CSL/MAML1.....	56
3.9 Les sérines 2521-24 ne semblent pas être des sites de phosphorylation essentiels à l'activité transcriptionnelle de NIC1.....	57
3.10 Génération d'une lignée cellulaire stable U2OS Flp-In™ T-REX™ NIC1-GFP permettant l'expression contrôlée de NIC1.	59

3.11 L'analyse par spectrométrie de masse des partenaires d'interaction de NIC1-GFP révèle plusieurs classes fonctionnelles de protéines	61
IV. Discussion.....	66
V. Conclusion et Perspectives.....	83
VI. Remerciements.....	87
VII. Liste des références.....	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les différents récepteurs Notch et leur structure.....	3
Figure 2. Les ligands de la voie Notch et leur structure	4
Figure 3. Biosynthèse et maturation de NOTCH chez les mammifères	6
Figure 4. La voie de signalisation Notch	8
Figure 5. Régulation de l'activité transcriptionnelle de NIC	18
Figure 6. L'EGTA mène à l'activation massive et synchronisée du récepteur NOTCH1 dans les cellules pancréatiques tumorales humaines.....	43
Figure 7. Le traitement avec l'inhibiteur du complexe γ -sécrétase DAPT prévient le clivage et l'activation du récepteur Notch1 Δ E dans les cellules pancréatiques tumorales humaines.....	44
Figure 8. Des essais phosphatases <i>in vitro</i> démontrent que NIC1 est une protéine phosphorylée.....	45
Figure 9. Design expérimental, double immunoprécipitation en milieu SILAC: Notch1 Δ E.	47
Figure 10. NIC1 nucléaire s'associe à son partenaire transcriptionnel CSL dans les cellules HEK293T.....	50
Figure 11. NIC1 nucléaire s'associe avec Rpb1 CTD, une sous-unité de l'ARN polymérase II.....	51
Figure 12. NIC1-GFP a une courte demi-vie et est dégradé par le protéasome dans les HEK293T.....	52
Figure 13. Représentation des mutants ponctuels de NIC1.....	53
Figure 14. NIC1 WT, S2521-24A et S2524D sont localisés dans la fraction chromatine. ...	55
Figure 15. Association de NIC1 WT, S2521-24A et S2524D à CSL et MAML1 dans les HEK293T.....	57
Figure 16. L'activité transcriptionnelle de NIC1 n'est pas modulée par la mutation des sites potentiels de phosphorylation S2521, 22, 23, 24.....	58
Figure 17. La population U2OS Flp-In TM T-REX TM NIC1-GFP exprime un NIC1 se comportant de façon semblable à la protéine endogène.....	60

Figure 18. Design expérimental, double immunoprécipitation en milieu SILAC: NIC1-GFP.....	62
Figure 19. Nouveaux partenaires d'interaction potentiels de NIC1 identifiés par spectrométrie de masse.	63
Figure 20. Regroupement fonctionnel des 97 protéines enrichies dans l'IP NIC1-GFP et identifiées par protéomique quantitative.....	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Complexes impliqués dans l'assemblage du PIC de l'ARN polymérase II.....	15
Tableau 2. Liste des vecteurs d'ADN utilisés.....	27
Tableau 3. Description des fractions du fractionnement cellulaire à l'aide de la nucléase micrococcale	31
Tableau 4. Liste et dilution des anticorps primaires utilisés en immunobuvardage	34
Tableau 5. Liste et dilution des anticorps secondaires utilisés en immunobuvardage	34
Tableau 6. Partenaires d'interaction de Notch1ΔE identifiés par spectrométrie de masse...48	
Tableau 7. Partenaires d'interaction de NIC1 impliqués dans la régulation transcriptionnelle.	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BAHD1	Bromo adjacent homology domain-containing protein 1
BioID	Proximity-dependent biotin identification
BRM	SWI/SNF chromatin-remodelling enzyme Brahma
BSA	Albumine de sérum bovin
BTD	Domaine β -trefoil de CSL
CaMKIV	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV
CARM1	Coactivator associated arginine methyltransferase 1
CBP	CREB binding protein
CDK8	Cyclin-dependent kinase 8
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CHX	Cycloheximide
c-MYC	Cellular-Myelocytomatosis oncogene
CRD	Domaine riche en cystéine
CSL	CBF1/RBPjk/Supressor of hairless/Lag-1
CtBP	C-terminal binding protein
CTD	Domaine C-terminal de CSL
CtIP	CtBP interacting protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAPT	N-[N(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine <i>t</i> -Butyl Ester
DLL	Ligand Delta-Like
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOS	Delta et OSM-11-like protein

DSL	Motif Delta, Serrate et LAG-2
EDTA	Acide tétraacétique diamine éthylène
EGTA	Acide tétraacétique glycol éthylène
EGF-Like	Epidermal Growth Factor-Like
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
EYA4	Eyes absent homologue 4
FBS	Sérum de veau foetal
FBW7	F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin ligase
FIH1	Asparagine hydroxylase inhibitrice du facteur HIF1 α
GCN5	General Control of Amino acid synthesis 5
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK3 β	Glycogène synthase kinase 3 beta
HD	Domaine d'hétérodimérisation
HDAC	Histone déacétylase
HERC2	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin ligase
HES	Hairy Enhancer of Split
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IB	Immunobuvardage
IP	Immunoprécipitation
JAG1et2	Ligand Jagged1 et 2
LNR	Domaine Notch/Lin12 riche en cystéine
MAML1	Mastermind-Like 1
MED	Médiateur, membre du complexe médiateur
MIA	Mia PaCa-2
MYBBP1A	Myb-binding protein 1A
<i>m/z</i>	Ratio masse sur charge
NAT14	N-acetyltransférase 14
N-coR	Nuclear receptor co-repressor
Ngn3	Neurogénine 3
NIC1	Domaine intracellulaire de NOTCH1
NLS	Signal de localisation nucléaire

NRIP1	Nuclear receptor-interacting protein 1
NRR	Région de régulation négative
NTD	Domaine N-terminal de CSL
p300	Histone acetyltransférase
PanIN	Néoplasie pancréatique intra-épithéliale
PCAF	p300/CBP-associated factor
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
PDA	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PEST	Domaine riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine
PFA	Paraformaldéhyde
PIC	Pre-Initiation Complex
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PPARG1B	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- beta
PPase	Protein Phosphatase
Pol II	ARN Polymérase II
Ptf1a	Pancreatic specific transcription factor 1a
RAM	RBPjk associated module
RHR	Rel homology region
RT-PCR	Transcription inverse et réaction de polymérase en chaîne
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis
SHARP	SMRT and HDAC associated repressor protein
SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture
SKIP	Ski-interacting protein
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2
SMRT	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptors
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
TAD	Domaine de transactivation
TAF	TBP-associated factor
T-ALL	T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia
TBP	TATA-binding protein

TFA	Trifluoroacetic acid
TGF β	Transforming growth factor beta
UBA1	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 1
UBB	Ubiquitin B
USPL1	Ubiquitin specific peptidase like 1
Wnt	Wingless/Int-1
YEATS2	YEATS domain-containing protein 2
<i>z</i>	Charge
ZNF	Zinc Finger Protein

I. INTRODUCTION

1.1 La voie de signalisation Notch

En 1917, Thomas Hunt Morgan et collaborateurs décrivent une lignée de Drosophiles dont les ailes sont dentelées (notched) aux extrémités. Ce trait est par la suite attribué à l'haploinsuffisance du futur gène *Notch*. Ce n'est qu'au milieu des années 80 que le gène codant pour le récepteur Notch est cloné par les groupes d'Artavanis-Tsakonas et de Young, marquant le début des recherches sur la voie de signalisation Notch (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1983; Radtke et Raj, 2003).

1.1.1 Organisation structurale des récepteurs Notch

Le récepteur Notch est une protéine possédant un unique domaine transmembranaire. Chez la Drosophile, on compte un seul récepteur Notch (dNotch) alors que chez les mammifères, il y a quatre isoformes (NOTCH1-4) (Figure 1), qui ont à la fois des rôles redondants et une fonction unique (Radtke et Raj, 2003). Les récepteurs Notch sont des hétérodimères dont les deux sous-unités sont maintenues ensemble via des interactions non-covalentes calcium-dépendantes. Le domaine extracellulaire de chaque protéine Notch contient 29 à 36 répétitions EGF (Epidermal growth factor)-like. Plus précisément, la région N-terminale extracellulaire des récepteurs NOTCH1 et NOTCH2 contient 36 répétitions EGF-Like alors que les récepteurs NOTCH3 et NOTCH4 n'en contiennent que 34 et 29 respectivement (Kopan et Ilagan, 2009). Les répétitions EGF-Like 11 et 12 sont essentielles à la liaison du ligand au récepteur (Bray, 2006). Ces répétitions EGF-Like sont suivies d'une unique région régulatrice (NRR) composée de trois répétitions Notch/Lin12 riche en cystéine (LNR) et d'un domaine d'hétérodimérisation (HD). En fait, la région NRR a pour rôle de prévenir l'activation du récepteur en absence du ligand. L'unique domaine transmembranaire (TMD) est terminé par un signal « stop

translocation » comprenant 3 à 4 résidus arginine et/ou lysine (Kopan et Ilagan, 2009). Au niveau intracellulaire, on retrouve le domaine RAM (RBPjk associated module), nécessaire à la liaison du domaine intracellulaire de Notch (NIC) à son partenaire transcriptionnel CSL (CBF-1/RBPjk/Suppressor of Hairless/Lag-1). On retrouve également un premier signal de localisation nucléaire (NLS) suivie d'un domaine ANK composé de 7 répétitions ankyrines jouant un rôle dans la modulation de l'activité transcriptionnelle de NIC. Ce domaine ANK, est suivi d'un second NLS. Enfin, on retrouve un domaine de transactivation (TAD) suivie d'un domaine PEST, riche en résidus proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T). Le domaine PEST est généralement associé à la régulation de la stabilité et de la dégradation de NIC (Figure 1) (Andersson *et al.*, 2011).

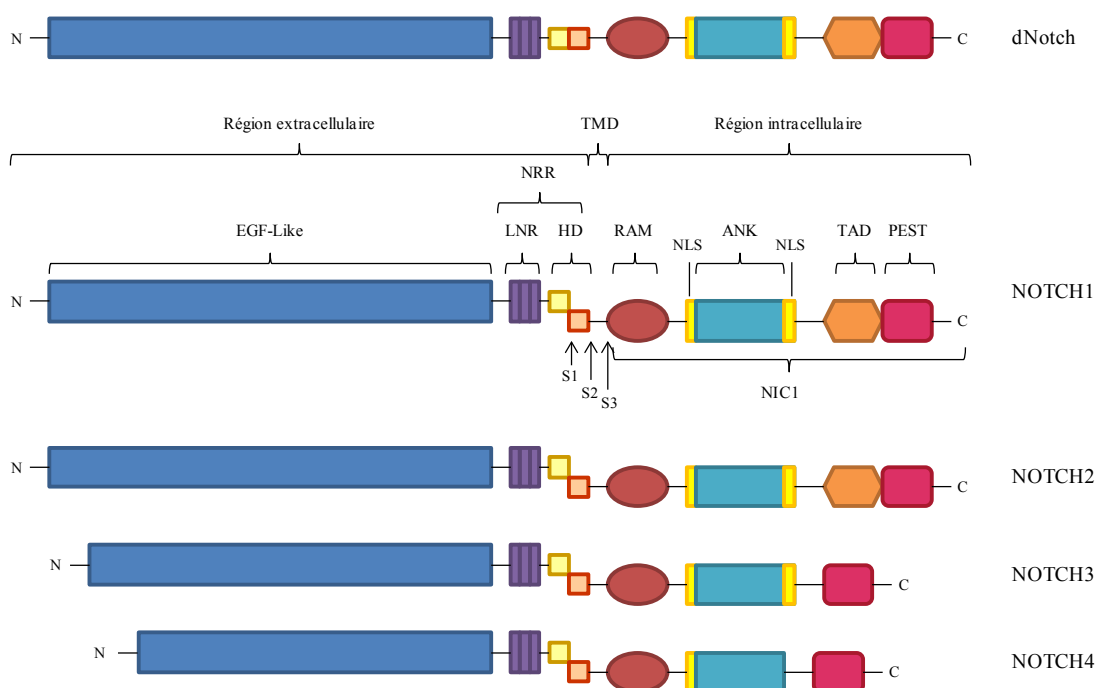


Figure 1. Les différents récepteurs Notch et leur structure

On retrouve un récepteur Notch chez la Drosophile (dNotch) et quatre chez les mammifères (NOTCH1-4). Région extracellulaire : séquences EGF-Like répétées, nécessaires à la liaison du ligand; Région NRR composée du domaine LNR, riche en cystéine, et du domaine d'hétérodimérisation (HD). TMD : domaine transmembranaire. Région intracellulaire : domaine RAM, important pour la liaison au cofacteur CSL; répétition ankyrine (ANK); Domaine de transactivation (TAD); séquence PEST, riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine.

1.1.2 Organisation structurale des ligands de Notch

Les ligands des récepteurs Notch sont aussi des protéines transmembranaires et c'est la liaison des récepteurs Notch à ces protéines transmembranaires qui permet l'activation de la voie de signalisation. Chez la Drosophile, deux ligands pour dNotch ont été identifiés, nommés Delta (DI) et Serrate (Ser) (Figure 2). Chez les mammifères, on compte trois homologues Delta, nommés Delta-Like (DLL)-1, -3 et -4, ainsi que deux homologues Serrate, nommés Jagged1 (JAG1) et Jagged2 (JAG2) (Figure 2). La structure en N-terminal est commune à tous les ligands de Notch et est formée d'un motif DSL (Delta, Serrate et

LAG-2) (Radtke et Raj, 2003). Le motif DSL est suivi de répétitions EGF-Like comprenant un domaine spécialisé nommé DOS (Delta et OSM-11-like protein) (Kopan et Ilagan, 2009). En fait, les domaines DSL et DOS sont essentiels à la liaison et à l'activation des récepteurs Notch en assurant l'interaction avec les répétitions EGF-Like 11 et 12 des récepteurs (Fiùza et Arias, 2007). Le domaine riche en cystéine (CRD) retrouvé dans les ligands Serrate, JAG1 et JAG2 permet de moduler les interactions avec les récepteurs Notch (Radtke et Raj, 2003).

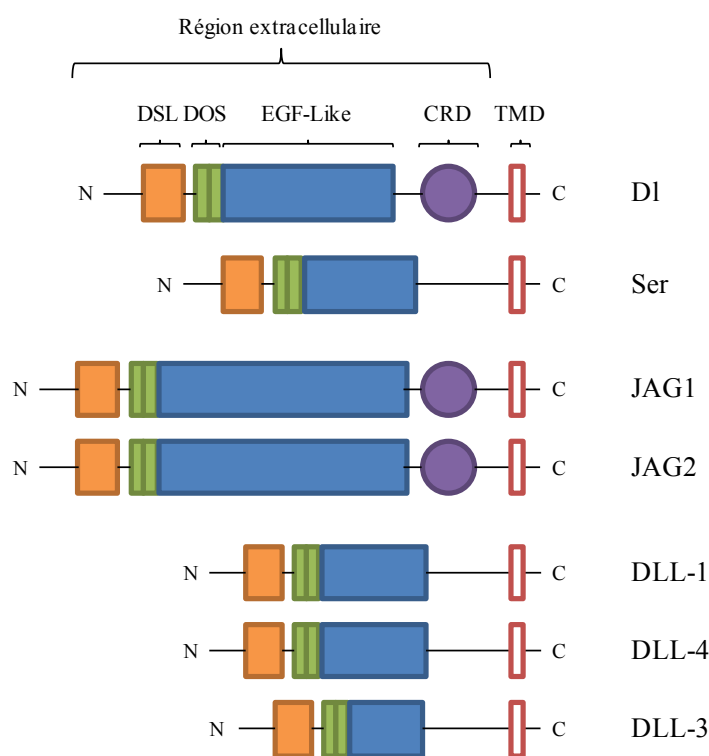


Figure 2. Les ligands de la voie Notch et leur structure

On retrouve deux ligands chez la Drosophile, Delta (DI) et Serrate (Ser), et cinq ligands chez les mammifères, Jagged1 et 2 (JAG1 et JAG2) ainsi que Delta-like-1,-3 et -4 (DLL-1,-3,-4). Région extracellulaire : séquence EGF-Like répétée incluant des répétitions EGF spécialisées nommées domaine DOS requises pour la liaison au récepteur Notch; DSL, structure commune aux ligands Delta, Serrate, LAG-2; CRD, domaine riche en cystéine; TMD, domaine transmembranaire.

1.1.3 Biosynthèse et maturation des récepteurs Notch

La biosynthèse et la maturation des récepteurs Notch est assurée par un ensemble de modifications post-traductionnelles. En effet, les nombreuses répétitions EGF-Like retrouvées dans le domaine extracellulaire de Notch servent de sites de glycosylation. Il est à noter que ces mécanismes ont principalement été étudiés chez la Drosophile. La protéine dNotch est d'abord produite dans le réticulum endoplasmique. À la suite de la traduction, une O-fucosyl-transférase (O-Fut) ajoute un premier fucose à la protéine dNotch, ce qui est essentiel pour générer un récepteur fonctionnel. En fait, O-Fut fonctionne comme un chaperon en permettant le bon repliement de la protéine dNotch, ce qui favorise son transport du réticulum endoplasmique jusqu'à la membrane cellulaire (Bray, 2006). Ainsi, ces modifications post-traductionnelles sont indispensables au bon fonctionnement du récepteur dNotch. Par exemple, une déficience fonctionnelle d'O-Fut mène à une perte de fonction du récepteur dNotch, car elle se traduit par une mauvaise conformation de la protéine dNotch menant à un défaut de liaison aux ligands (Fiùza et Arias, 2007). Chez les mammifères, suite à l'ajout de groupement fucose par l'homologue d'O-Fut, POFUT-1, la protéine NOTCH est transportée dans l'appareil de Golgi, où elle est clivée par une furine convertase au site de clivage 1 (S1) (Figure 3) (Fiùza et Arias, 2007). Il est à noter que ce mécanisme demeure à être identifié chez la Drosophile, car il ne semble pas être prédominant et/ou essentiel à l'éventuelle activation du récepteur. Chez la Drosophile, la protéine dNotch est glycosylée à partir des premiers résidus fucoses ajoutés par O-Fut et d'autres glycosyltransférases comme Fringe (Bray, 2006). En fait, il a été suggéré que ces modifications potentialisent les interactions dNotch-Delta alors qu'elles rendent dNotch résistant à l'activation par Serrate (Bray, 2006). La situation chez les mammifères est beaucoup plus compliquée. En effet, les mammifères possèdent trois homologues Fringe : Radical, Manic et Lunatic. Chaque homologue Fringe pourrait modifier spécifiquement les interactions de NOTCH, mais l'effet sur son activité requiert d'autres études (Fiùza et Arias, 2007). Enfin, chez les mammifères, le récepteur NOTCH est localisé à la surface de la cellule sous forme d'hétérodimère tenu ensemble par des interactions non-covalentes calcium-dépendantes (Figure 3) (Kopan et Ilagan, 2009).

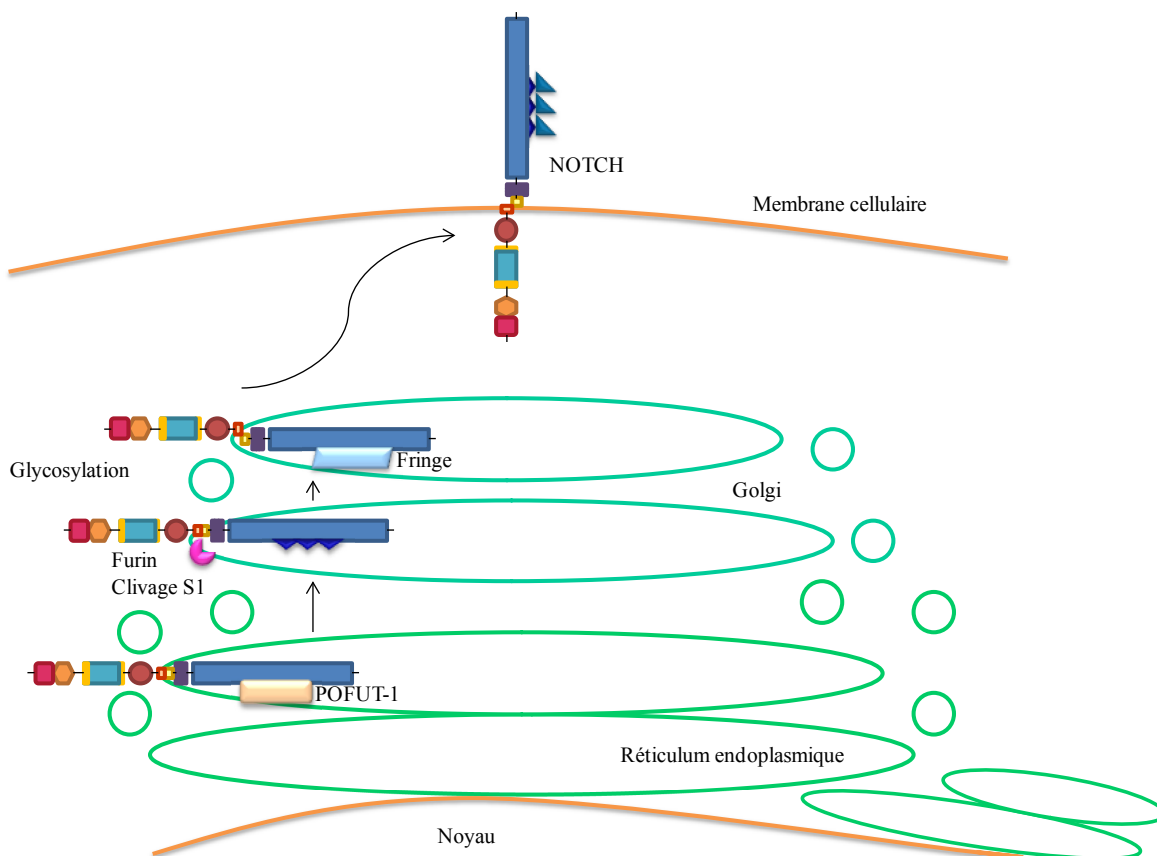


Figure 3. Biosynthèse et maturation de NOTCH chez les mammifères

La protéine NOTCH est produite dans le réticulum endoplasmique et interagit avec POFUT-1 une O-fucosyl-transférase. NOTCH est ensuite transporté dans l'appareil de Golgi, où se produit le clivage S1 par l'enzyme convertase Furine. Enfin, il est glycosylé par des protéines de la famille Fringe (Manic, Lunatic ou Radical), des glycosyltransférases, avant d'être exporté à la surface cellulaire.

1.1.4 Mécanisme d'activation des récepteurs Notch

La liaison du ligand au récepteur Notch favorise deux clivages protéolytiques. En effet, la liaison du ligand amène un changement de conformation du récepteur Notch permettant aux métalloprotéases de la famille ADAM/TACE de catalyser le premier clivage au site 2 (S2). Ce premier clivage amène la formation d'un intermédiaire instable de Notch, qui subit un second clivage au site 3 (S3) catalysé par le complexe gamma-sécrétase comprenant les enzymes preseniline, nicastrine, PEN2 et APH1 (Figure 4). Ce second

clivage libère le fragment intracellulaire actif de Notch (NIC) qui transloque au noyau, où il s'associe à des cofacteurs transcriptionnels afin d'initier la transcription de gènes cibles (Bray, 2006). NIC, ne pouvant se lier directement à l'ADN, va s'associer à la protéine de liaison à l'ADN CSL et va recruter un complexe de co-activateurs composé de Mastermind-Like 1 (MAML1) ainsi que de facteurs de transcription qui modifient la structure de la chromatine (Figure 4) (Borggreffe et Oswald, 2009). En effet, suite à la formation du complexe tertiaire NIC/CSL/MAML1, on retrouve la protéine SKIP (Ski-interacting protein) connue pour interagir avec NIC et CSL (Vasquez-Del Carpio *et al.*, 2011). En fait, SKIP et MAML1 vont permettre le recrutement d'histones acétyltransférases ainsi qu'un complexe de remodelage de la chromatine favorisant l'initiation de la transcription des gènes cibles de Notch (Bray, 2006). Enfin, la signalisation Notch se termine par le recrutement du complexe Cycline C/CDK8 phosphorylant NIC dans son domaine PEST, ce qui en fait une cible pour l'E3-ubiquitine ligase FBW7. En fait, ces modifications post-traductionnelles dans le domaine PEST mènent à la dégradation de NIC par le protéasome (Fryer *et al.*, 2004), ce qui conduit au désassemblage du complexe transcriptionnel et à l'arrêt de la transcription (Figure 4) (Freidmann *et al.*, 2008).

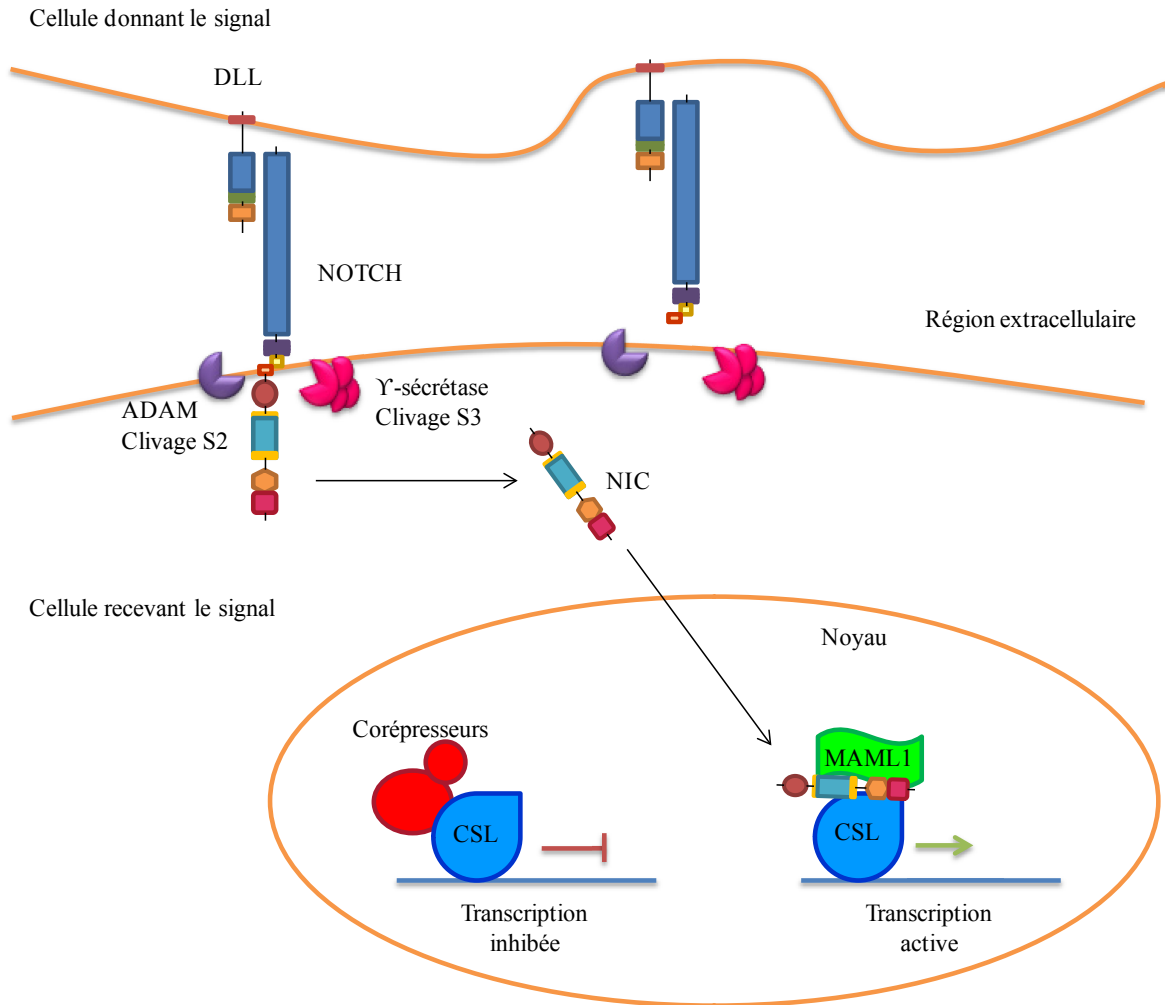


Figure 4. La voie de signalisation Notch

NOTCH est un récepteur transmembranaire qui, suite à la liaison de son ligand, subit une série de clivages protéolytiques libérant un fragment intracellulaire actif NIC. Une fois libéré, NIC transloque au noyau où il s'associe à des cofacteurs transcriptionnels tels CSL et MAML1 afin d'initier la transcription de gènes cibles.

1.1.5 Les gènes cibles de la voie Notch

Comme mentionné dans la section 1.1.4, NIC ne peut pas lier directement l'ADN. Il doit donc obligatoirement s'associer à une protéine de liaison à l'ADN, CSL (Borggreffe et Oswald, 2009). La protéine CSL est composée de trois domaines structuraux, NTD, BTM et CTD. Ses domaines N-terminal (NTD) et C-terminal (CTD) sont similaires au domaine RHR (Rel Homology Region) de la famille des facteurs de transcription Rel (NF κ B, NFAT). Le domaine BTM (domaine β -trefoil) se retrouve entre les domaines NTD et CTD. CSL lie spécifiquement l'ADN via ses domaines NTD et BTM en reconnaissant la séquence consensus GTGGGAA. Enfin, le domaine BTM est également nécessaire à l'interaction entre NIC et CSL (Kovall et Hendricson, 2005). La voie de signalisation Notch régule l'expression de gènes jouant un rôle dans la différenciation cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose dépendamment du contexte cellulaire (Kageyama *et al.*, 2007). Par exemple, les cibles transcriptionnelles de NIC comprennent les membres de la famille Hes (Hairy Enhancer of Split), soit Hes1, 5 et 7, ainsi que les membres de la famille Hey, soit Hey1, 2 et L (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Les membres de la famille Hes et Hey font partie de la grande famille des facteurs de transcription bHLH et ont la capacité de former des homodimères et des hétérodimères. Plus particulièrement, les membres de la famille Hes et Hey sont formés d'un domaine bHLH, d'un domaine Orange et d'un domaine WRPW. Le domaine bHLH contient une région basique nécessaire à la liaison à l'ADN via la séquence consensus CANNTG nommée E-box et une région HLH nécessaire à la dimérisation. Le domaine Orange contient deux hélices amphipatiques qui régulent la sélection des partenaires d'interaction. Enfin, le domaine WRPW est un térapeptide (Tryptophane-Arginine-Proline-Tryptophane) qui réprime la transcription et il peut également agir comme signal de poly-ubiquitination. En effet, Hes et Hey sont des répresseurs transcriptionnels à courte demi-vie. Ils peuvent réprimer activement la transcription en formant des dimères capable de s'associer avec des corépresseurs comme Groucho, entre autres, connu pour jouer un rôle répresseur important dans la voie de signalisation Wnt. Ils peuvent également réprimer la transcription de façon passive en séquestrant divers facteurs de transcription comme E47 et Mash1. (Kageyama *et al.*, 2007) Par ailleurs, Hes et Hey sont des oscillateurs moléculaires, c'est-à-dire que leur expression est de courte durée et revient

périodiquement dans un court laps de temps. En fait, les protéines Hes et Hey peuvent lier directement leur promoteur et réprimer l'expression de leur propre gène. Cet effet est de courte durée, car les protéines Hes et Hey sont rapidement ubiquitinylées et dégradées par le protéasome. Une fois dégradées, le cycle d'expression peut reprendre (Kageyama *et al.*, 2007). Il a été montré que les gènes cibles induits par l'activation de la signalisation Notch régulent la progression du cycle cellulaire. Par exemple, Hes1 favorise la progression du cycle cellulaire en inhibant l'expression d'inhibiteurs d'enzyme CDK, dont p27 et p57 (Murata *et al.*, 2005; Georgia *et al.*, 2006). Il a également été montré que l'induction de l'expression des gènes cibles de Notch permet de maintenir le caractère de certaines cellules souches. Par exemple, la signalisation Notch participe au maintien des cellules progénitrices pancréatiques via l'inhibition des gènes *Ptfla* et *Ngn3* par Hes1 (Kageyama *et al.*, 2007). Enfin, il semble que les gènes *HES* et *HEY* jouent un rôle indispensable dans différents contextes développementaux en régulant la prolifération et la différenciation cellulaire.

Le gène *c-MYC* est également connu pour être une cible directe de NOTCH1 (Weng *et al.*, 2006). Il a été montré que NOTCH1 est un régulateur de la prolifération cellulaire en activant directement l'expression du gène *c-MYC* dans les cellules T de la leucémie lymphoblastique aiguë (T-ALL) (Palomero *et al.*, 2006). Ainsi, l'effet oncogénique de NOTCH1 dans le T-ALL est intimement lié à l'activation de l'oncogène *c-MYC*. De plus, une étude récente a démontré l'importance des régions régulatrices contrôlées par NOTCH1 sur la région promotrice du gène *c-MYC* dans le développement des cellules T et dans la transformation ainsi que le maintien de la pathologie T-ALL (Herranz *et al.*, 2014). Le gène *CYCLINE D1* est aussi une cible directe de NOTCH1. En effet, il a été montré que l'inhibition de la voie Notch dans les cellules pancréatiques tumorales humaines induit la diminution de la Cycline D1, ce qui corrèle avec une réduction de la croissance cellulaire (Kimura *et al.*, 2007). Un autre exemple de cible directe de NOTCH1 est *SKP2* qui encode une E3 ubiquitine ligase qui cible p27. En fait, il a été suggéré qu'une signalisation aberrante de NOTCH1 dans un modèle cellulaire de T-ALL mène à une augmentation des niveaux d'expression de *SKP2* réduisant les niveaux protéiques de p27, ce qui favorise la progression du cycle cellulaire (Dohda *et al.*, 2007). Enfin, il y a des évidences que

l'activation de NOTCH1 dans les cellules de cancer du sein induit la transition épithélio-mésenchymateuse (MET) assurée par Snail/Slug favorisant l'invasion et la formation de métastases (Cao *et al.*, 2015). Somme toute, il devient clair que les gènes cibles de NOTCH1 peuvent jouer un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et la transformation cellulaire.

1.1.6 Rôles cellulaires de Notch et pathologies associées

La voie de signalisation Notch régule plusieurs aspects du développement et du renouvellement tissulaire. Cette voie de signalisation cellulaire joue un rôle dans la communication cellulaire à courte portée. Ainsi, la voie Notch peut jouer un rôle dans différents processus cellulaires, dont la prolifération, la mort cellulaire et la différenciation cellulaire. En conséquence, une mauvaise régulation ou une perte d'activité de cette voie de signalisation mène à des maladies humaines telles que des pathologies du développement et le cancer (Kopan et Ilagan, 2009).

Premièrement, la voie Notch participe au maintien de l'état indifférencié de certaines cellules souches. En fait, Notch favorise la prolifération, ce qui prévient la différenciation des cellules progénitrices l'exprimant. Par exemple, on retrouve ce mécanisme dans les cellules neuronales, les cellules hématopoïétiques et les cellules pancréatiques (Radkte et Raj, 2003). Deuxièmement, la voie Notch peut participer à la différenciation cellulaire via deux processus différents, l'inhibition latérale ou par signal inductif (Fiùza et Arias, 2006). Dans le cas de l'inhibition latérale, les cellules précurseuses expriment initialement des niveaux équivalents du ligand et du récepteur Notch. Graduellement, les différentes cellules vont exprimer préférentiellement le ligand ou le récepteur Notch. Ainsi, suite à la liaison ligand-récepteur, il pourra y avoir formation d'un complexe transcriptionnel NIC/CSL/MAML1 dans les cellules exprimant le récepteur Notch menant ainsi à l'expression d'un programme génique différent de celui exprimé chez la cellule n'exprimant que le ligand. Il en résulte la différenciation de deux types cellulaires ayant des fonctions divergentes (Radkte et Raj, 2003; Borggreffe et Oswald, 2009). Par

exemple, on retrouve ce mécanisme de différenciation chez la *Drosophile*, où les cellules neuronales et épidermales ont un précurseur commun. Un autre exemple important est celui du programme de différenciation des cellules pancréatiques, plus particulièrement la spécification des cellules endocrines. Dans ce cas, les cellules progénitrices pancréatiques expriment le récepteur Notch ou le ligand. Les cellules progénitrices pancréatiques qui expriment Notch vont aussi exprimer *Hes1*, suite à l'activation de la voie Notch (Edlund, 2001). *Hes1* va inhiber la transcription du gène *Ngn3* permettant à ces cellules de proliférer et, via d'autres signaux, elles se différencieront en cellules exocrines. Les cellules progénitrices pancréatiques qui expriment le ligand, n'expriment pas *Hes1* et ainsi, il y a expression du gène *Ngn3*, ce qui mène subséquemment à la différenciation en cellules endocrines (Edlund, 2001). Dans le cas du signal inductif, le ligand et le récepteur Notch sont exprimés exclusivement sur deux différents types cellulaires. Par exemple, les cellules épithéliales du thymus chez la souris expriment le ligand et vont induire les lymphocytes précurseurs exprimant le récepteur Notch à se différencier en lymphocyte T alors que si les lymphocytes précurseurs n'expriment pas le récepteur Notch, ils vont plutôt se différencier en lymphocytes B (Radkte et Raj, 2003). Troisièmement, la signalisation Notch peut participer à la différenciation terminale en induisant l'arrêt du cycle cellulaire. Ce processus est particulièrement observé au niveau des cellules épidermiques (Radkte et Raj, 2003).

Comme mentionné précédemment, une mauvaise régulation de la voie Notch peut mener au cancer. En effet, la voie de signalisation Notch est associée à la carcinogénèse, incluant le cancer pancréatique. En fait, certaines études suggèrent que le cancer est une maladie qui est provoquée par la réactivation de voies de signalisation impliquées dans le développement et qui sont normalement inhibées une fois le développement embryonnaire achevé. Par exemple, il a été montré que l'activité de Notch est importante dans le développement embryonnaire du pancréas, mais qu'elle est plutôt négligeable dans l'homéostasie du pancréas adulte (Jensen *et al.*, 2000; Fujikura *et al.*, 2007). Toutefois, plusieurs observations indiquent que la voie de signalisation Notch est réactivée dans l'adénocarcinome ductal pancréatique (PDA) (Mysliwiec et Boucher, 2009; Jones *et al.*, 2008; Witkiewicz *et al.*, 2015). D'autre part, Notch, comme la plupart des oncoprotéines impliquées dans la tumorigénèse, a besoin de partenaire oncogénique pour initier le cancer

(Radtke et Raj, 2003). Par exemple, il a été montré que la surexpression de NIC1 dans les cellules épithéliales pancréatiques accélère la formation de néoplasies pancréatiques intra-épithéliales (PanIN) induite par l'oncogène *KRas*^{G12V} (Mysliwiec et Boucher, 2009; De La O *et al.*, 2008).

Il est également connu que la voie Notch est dérégulée dans la leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T (T-ALL). En effet, au niveau cellulaire, cette voie de signalisation favorise la prolifération et inhibe l'apoptose des lymphocytes T (Chadwick *et al.*, 2009). Ce cancer est associé à de fort niveau de mutations dans le gène *NOTCH1*. Par exemple, chez les patients atteints de T-ALL, le chromosome contenant le gène *NOTCH1* est sujet à des translocations chromosomiques. Ainsi, les cellules leucémiques peuvent exprimer un allèle tronqué de *NOTCH1* (Borggreffe et Oswald, 2009). En effet, NIC1 est souvent tronqué, c'est-à-dire qu'il y a perte du domaine PEST affectant ainsi le taux standard de dégradation de NIC1 et augmente sa stabilité. D'autres mutations de *NOTCH1* ont été identifiées dans la pathologie T-ALL. Par exemple, des mutations dans le domaine d'hétérodimérisation favorisent le clivage de *NOTCH1* en S3 indépendamment de la liaison ligand-récepteur, ce qui cause une augmentation de la libération de NIC1 menant à une augmentation de la signalisation Notch (Borggreffe et Oswald, 2009). En résumé, ces mutations mènent à des niveaux d'expression élevés de NIC1, acteur important dans la pathogenèse du T-ALL.

Globalement, il vient intéressant de cibler la voie de signalisation Notch comme cible thérapeutique. De manière intéressante, il a été montré que bloquer la signalisation Notch avec un inhibiteur de gamma-sécrétase prévient la progression des PanIN en PDA dans un model murin de cancer pancréatique (Plentz *et al.*, 2009). De plus, il a été observé qu'une réduction de la signalisation Notch dans des cellules pancréatiques tumorales humaines corrèle avec une diminution du taux de prolifération, une augmentation de l'apoptose, une diminution de la capacité de croître en indépendance d'ancrage et une diminution des propriétés invasives (Mullendore *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2006). Ainsi, il devient intéressant de cibler la voie Notch comme cible thérapeutique, plus particulièrement dans le cancer pancréatique. La problématique est que les inhibiteurs de

gamma-sécrétase ne sont pas spécifiques à la voie Notch et ils sont associés à une toxicité gastro-intestinale (McCarthy *et al.*, 2009; van ES *et al.*, 2005). C'est pourquoi, une meilleure compréhension de cette voie complexe est une étape critique dans le développement de futurs inhibiteurs de la voie Notch.

1.2 Régulation de l'activité transcriptionnelle de NIC

1.2.1 Généralité sur la transcription

La transcription est un processus fondamental responsable de l'expression des gènes. La transcription par l'ARN polymérase II se déroule en trois étapes, l'initiation, l'élongation et la terminaison. Les études *in vitro* mènent à un modèle simple, où l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II nécessite minimalement les facteurs généraux de transcription, TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH (Sikorski et Buratowski, 2009). Les facteurs généraux de transcription aident l'ARN polymérase II à se fixer au promoteur et ensemble, ils forment le complexe de pré-initiation (PIC) (Sikorski et Buratowski, 2009). À la base, il est proposé que la boîte TATA du promoteur soit reconnue par TFIID via sa sous-unité TBP (TATA-binding protein), ce qui mène au recrutement des autres facteurs de transcription généraux (Deng et Roberts, 2006). Les autres facteurs généraux de transcription ont aussi des rôles spécifiques dans l'initiation de la transcription (Tableau 1), mais ils ne sont pas connus en détail (Sikorski et Buratowski, 2009). *In vivo*, la transcription requiert des protéines régulatrices supplémentaires. En effet, en plus des facteurs généraux de transcription, des activateurs liés sur des séquences régulatrices situés dans la région promotrice du gène recrutent des complexes de modification de la chromatine et le complexe médiateur qui ensemble, vont favoriser l'initiation de la transcription (Orphanides et Reinberg, 2002). En fait, le complexe médiateur fait le pont entre les activateurs et les facteurs généraux de transcription. Le complexe médiateur facilite également la transcription en régulant l'activité kinasique de TFIIH (Larivière *et al.*, 2012). Une fois la transcription initiée, l'ARN polymérase II passe en phase d'élongation

nécessitant le recrutement des facteurs d'élongation (Orphanides et Reinberg, 2002). Ainsi, il y a échange entre les facteurs d'initiation et les facteurs d'élongation. Il y a aussi des interactions entre les facteurs d'élongation et des facteurs impliqués dans la maturation de l'ARN (Orphanides et Reinberg, 2002). Enfin, la terminaison de la transcription est liée à la polyadénylation en 3' de l'ARN, mais la nature de cette relation est peu connue (Orphanides et Reinberg, 2002).

Tableau 1. Complexes impliqués dans l'assemblage du PIC de l'ARN polymérase II.

Complexes protéiques	Nombre de sous-unités et Fonctions
ARN polymérase II	(12 sous-unités) catalyse la transcription des ARNm et de quelques petits ARN non-codants incluant les snoARN et les miARN
TFIIA	(2 à 3 sous-unités) agit en tant que co-activateur en interagissant avec les composantes de la machinerie transcriptionnelle de base et les activateurs
TFIIB	stabilise la liaison de TBP au promoteur; favorise le recrutement de TFIIF/ARN Pol II au promoteur
TFIID	(14 sous-unités incluant TBP et les TAFs (TBP Associated Factors)) forme le noyau nécessaire à l'assemblage du PIC
TFIIE	(2 sous-unités) aide au recrutement de TFIIH et stimule son activité hélicase et Kinase
TFIIF	(2 à 3 sous-unités) est associé à l'ARN Pol II; augmente l'affinité de l'ARN Pol II pour le complexe TBP-TFIIB-promoteur; recrute TFIIE et TFIIH au PIC
TFIIH	(10 sous-unités) activité ATPase/hélicase; phosphoryle la sous-unité RPB1 CTD de l'ARN Pol II; facilite la transcription de l'initiation à l'élongation
Complexe médiateur	(20 sous-unités) forme un pont entre les activateurs et les facteurs généraux de transcription
SAGA	(20 sous-unités) (exemple de complexe de modification de la chromatine) activité histone acétyltransférase; interagit avec les activateurs, histone H3 et TBP

1.2.2 Répression des gènes cibles de Notch en absence de NIC

Un des modèles proposés suggère qu'en absence de NIC, CSL est maintenu sur les éléments de régulation des gènes cibles de NIC et agit en tant que répresseur transcriptionnel via le recrutement de différents corépresseurs (Figure 5). CSL recrute la protéine SHARP (SMRT and HDAC associated repressor protein) qui sert de plateforme de recrutement pour d'autres corépresseurs et des enzymes modifiant les histones (Fiùza et Arias, 2007). Ensuite, il y a recrutement de SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptors) et de N-coR (Nuclear receptor co-repressor), ce qui va permettre le recrutement d'histones déacétylases (HDAC) (Kao *et al.*, 1998). Il y a également recrutement de l'hétérodimère CtBP/CtIP (C-terminal binding protein/CtBP interacting protein) permettant le recrutement d'histones déméthylases, comme LSD1 (Oswald *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2003; Borggreffe et Oswald, 2009). Tous ces cofacteurs vont favoriser l'empaquetage de la chromatine et le maintien de l'inhibition de l'expression des gènes cibles de NIC. Cette répression transcriptionnelle sera maintenue jusqu'à ce que les niveaux protéiques de NIC augmentent et permettent d'initier la transcription (voir section 1.2.3).

1.2.3 Co-activateurs de NIC et régulateurs épigénétiques

Lorsque la voie Notch est activée, NIC déplace les corépresseurs, s'associe avec CSL et recrute son co-activateur MAML1, permettant la formation du complexe tertiaire NIC/CSL/MAML1 (Figure 5). Au même moment, il y a recrutement de SKIP, un co-régulateur transcriptionnel (Fiùza et Arias, 2007). Ensuite, MAML1 recrute les histones acétyltransférases (HAT) p300 et PCAF/GCN5 (Kurooka et Honjo, 2000; Wallberg *et al.*, 2002). Il y a également le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine BRM (SWI/SNF chromatin-remodelling enzyme Brahma) (Kadam et Emerson, 2003). Le recrutement de ces protéines contribue à l'initiation de la transcription et à l'élongation des ARNm cibles de NIC. Par exemple, les histones acétyltransférases catalysent l'acétylation des résidus lysines en N-terminal des histones favorisant le remodelage de la chromatine, ce qui permet d'exposer des sites de liaison pour l'ARN polymérase II et les facteurs de

transcription (Kurooka et Honjo, 2000; Wallberg *et al.*, 2002). Pour sa part, l'enzyme BRM va plutôt favoriser le remodelage de la chromatine via son activité ATPase (Kadam et Emerson, 2003). En somme, la signalisation Notch requiert le recrutement de complexes d'histones acétyltransférases et des complexes de remodelage de la chromatine pour initier la transcription (Figure 5) (Bray, 2006). L'assemblage d'un complexe de co-activateurs ne fait pas qu'initier la transcription, mais mène ultimement à la dégradation de NIC (Bray, 2006). En effet, la phosphorylation de NIC dans son domaine PEST par le complexe Cycline C/CDK8, membre du complexe médiateur, transforme NIC en substrat pour l'E3-ubiquitine ligase FBW7 (Fryer *et al.*, 2004). Une fois le domaine PEST ubiquitinylé, NIC est envoyé au protéasome pour se faire dégrader, conduisant au désassemblage du complexe transcriptionnel et à l'arrêt de la transcription des gènes cibles de Notch (Figure 5) (Freidmann *et al.*, 2008).

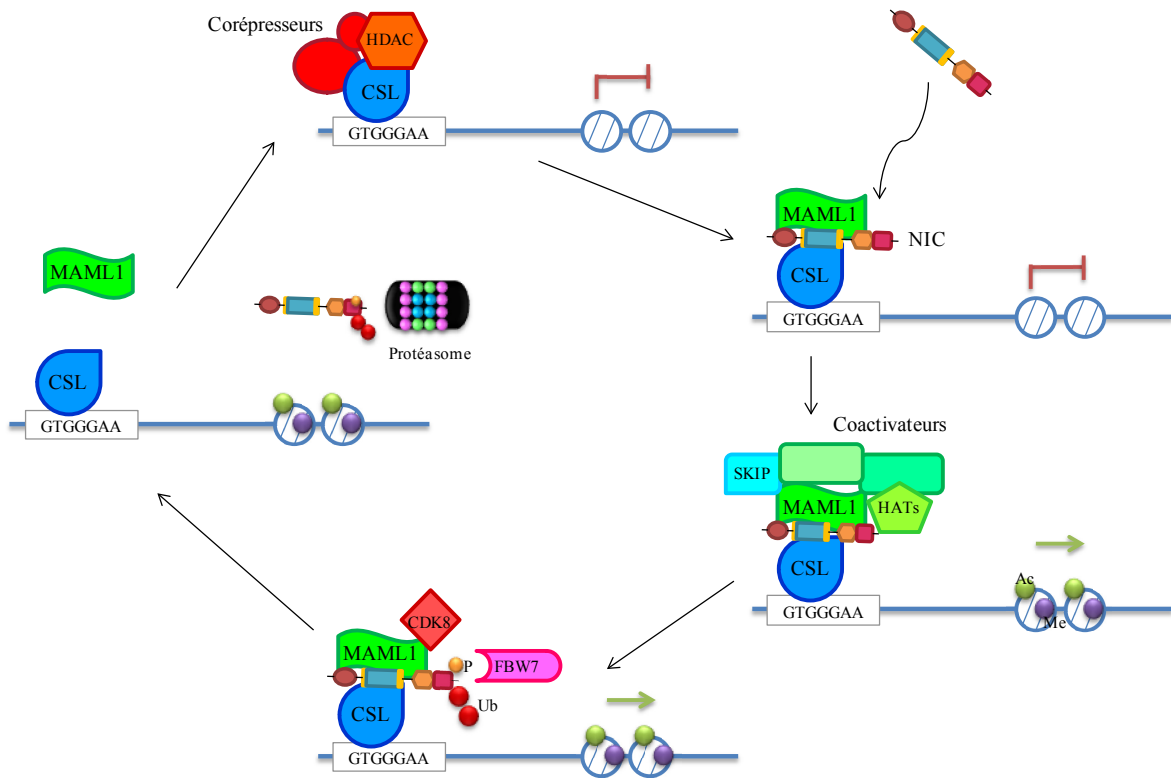


Figure 5. Régulation de l'activité transcriptionnelle de NIC

En absence de NIC, CSL forme un complexe répresseur via le recrutement de corépresseurs tels que des histones déacétylases (HDAC). La transcription des gènes cibles de NIC est inhibée. Lorsque la signalisation Notch est activée, NIC transloque au noyau et s'associe avec ses cofacteurs transcriptionnels CSL et MAML1. Ensuite, SKIP, un autre cofacteur, est recruté au complexe tertiaire. Il va s'en suivre le recrutement de co-activateurs et d'histones acétyltransférases (HAT), favorisant l'initiation de la transcription des gènes cibles de NIC. La signalisation est interrompue via le recrutement de Cycline C/CDK8 qui phosphoryle NIC, qui est ensuite ubiquitinylé par FBW7. Enfin, NIC est dégradé par le protéasome, conduisant au désassemblage du complexe transcriptionnel et à l'arrêt de la transcription. (Ac : acétylation; Me : Méthylation; P : Phosphorylation; Ub : Ubiquitination)

1.3 Régulation de la stabilité de NIC

La transduction de signal est souvent régulée par des modifications post-traductionnelles. Dans certains cas, le mécanisme de régulation est irréversible, car certaines modifications post-traductionnelles, comme l'ubiquitination, mènent à la dégradation de l'effecteur. Dans d'autres cas, le mécanisme de régulation est réversible, comme la phosphorylation ou l'acétylation. Les modifications post-traductionnelles sont des processus clés dans la régulation des fonctions de la protéine Notch et plus particulièrement de son fragment intracellulaire NIC (Palermo *et al.*, 2014).

1.3.1 Phosphorylation de NIC

Il est connu que NIC1 est phosphorylé à plusieurs résidus et par plusieurs kinases. Par exemple, il a été suggéré que la phosphorylation de NIC1 par la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) se produit au niveau du domaine ANK et stabilise NIC1 (Andersson *et al.*, 2011). En effet, il a été montré que NIC1 possède deux domaines S/T-P-S/T (2122-2124, 2126-2128) qui sont phosphorylés par GSK3 β , ce qui induit la localisation nucléaire de NIC1 favorisant son activité transcriptionnelle (Han *et al.*, 2012). Il existe d'autres kinases qui favorisent la stabilité de NIC1. Par exemple, il a été montré que la CaMKIV (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV) phosphoryle NIC1 sur le résidu sérine 2173 et prévient l'ubiquitination de NIC1 ainsi que sa dégradation (Choi *et al.*, 2013). Comme mentionné précédemment, Cycline C/CDK8 phosphoryle NIC1, plus précisément, sur ses résidus sérines 2481-2484-2506. En effet, Cycline C/CDK8 lie directement MAML1 et phosphoryle NIC1 dans son domaine PEST favorisant sa dégradation via FBW7 et le protéasome (Fryer *et al.*, 2004).

1.3.2 Ubiquitination de NIC

Les signaux de poly-ubiquitination servent de signal pour la dégradation protéique par le protéasome. Par exemple, l'E3 ubiquitine ligase FBW7 régule la demi-vie de NIC1. En effet, l'ubiquitination de NIC1 dans son domaine PEST par FBW7 cible NIC1 pour la dégradation par le protéasome (Fryer *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2011; Palermo *et al.*, 2014). Ces modifications faites par FBW7 sont importantes, car il est possible de retrouver des mutations de NOTCH1 et de FBW7 chez les patients atteints de T-ALL, où la stabilité de NIC1 est augmentée (Andersson *et al.*, 2011).

1.3.3 Acétylation de NIC

Bien que l'ubiquitination soit une modification importante dans la régulation des niveaux protéiques de NIC1, l'acétylation s'est révélée tout aussi importante. Il a été montré que l'acétylation de NIC1 se produit au niveau des résidus lysines et plus particulièrement dans les domaines RAM et ANK (Palermo *et al.*, 2014). Il a été montré que l'acétylation des lysines dans ces domaines peut inhiber la dégradation de NIC1 assurée par l'ubiquitination. Par exemple, une déplétion des niveaux d'expression de la déacétylase SIRT1 augmente les niveaux protéiques de NIC1. Dans le même ordre d'idée, une surexpression de SIRT1 amène une diminution des niveaux protéiques de NIC1 (Guarani *et al.*, 2011). De plus, il a été montré que p300 acétyle NIC1 et qu'il en résulte une diminution de l'ubiquitination de NIC1. L'acétylation de NIC1 par p300 augmente également l'activité transcriptionnelle de NIC1, ce qui en fait un régulateur positif (Popko-Scibor *et al.*, 2011). En somme, il est proposé que la déacétylation de NIC1 favorise sa dégradation via la phosphorylation par Cycline C/CDK8 alors que l'acétylation de NIC1 stabilise la protéine (Popko-Scibor *et al.*, 2011; Guarani *et al.*, 2011). D'autre part, une autre histone acétyltransférase est connue pour interagir avec NIC1, Tip60. Il a été montré que Tip60 acétyle NIC1 au niveau des résidus lysines 2019/2039/2044/2068, et que l'acétylation de NIC1 sur ces résidus perturbe les interactions avec CSL inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle de NIC1 (Kim *et al.*, 2007). En résumé, ces découvertes

indiquent que l'acétylation/déacétylation de NIC1 joue un rôle important dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de NIC1 et que ce rôle est activateur ou inhibiteur selon le contexte cellulaire (Palermo *et al.*, 2014).

1.3.4 Hydroxylation de NIC

L'hydroxylation est une modification post-traductionnelle de NIC1 récemment découverte. L'asparagine hydroxylase inhibitrice du facteur HIF1 α (FIH1) pourrait hydroxyler NIC1 au niveau de deux résidus asparagines (N1945 et N2012). Des résultats *in vitro* suggèrent que FIH1 régulent négativement le signal de Notch. (Andersson *et al.*, 2011) Cependant, il s'agit de découvertes très récentes qui nécessitent d'être approfondies.

Finalement, malgré que certaines modifications post-traductionnelles de NIC1 aient été répertoriées, très peu de choses sont connues quant à leur impact sur l'activité transcriptionnelle de NIC1. Il devient donc important de s'intéresser à ces modifications post-traductionnelles sur NIC1 et d'en caractériser le rôle dans la signalisation Notch, plus particulièrement au niveau de la formation du complexe tertiaire NIC1/CSL/MAML1 et de son activité transcriptionnelle.

1.4 Interactions potentielles entre la signalisation Notch et d'autres voies de signalisation

Bien que chaque voie de signalisation soit régulée étroitement par différents mécanismes, il vient important de considérer qu'elle n'opère pas seule, mais dans un réseau intégrant chaque signal. En effet, les voies de signalisation cellulaire interagissent entre elles à différents niveaux. Certaines voies vont contrôler l'expression d'effecteur d'une autre voie. Certaines voies vont directement interagir via leurs effecteurs respectifs. Il en va

de même pour la voie Notch qui peut interagir avec la voie Wnt, la voie TGF β et la réponse hypoxique (Andersson *et al.*, 2011).

Les interactions entre la voie Notch et la voie Wnt seraient plutôt circonstanciées. Par exemple, la β -caténine peut lier NIC dans les cellules neuronales précurseuses et cette protéine peut aussi former un complexe avec NIC et CSL dans les cellules endothéliales artérielles, mais pas dans les cellules endothéliales des veines (Andersson *et al.*, 2011). MAML1 est également impliqué dans des interactions entre la voie Wnt et la voie Notch. En fait, MAML1 pourrait lier la β -caténine et agir en tant que co-activateur transcriptionnel en augmentant l'expression de gènes cibles comme la *CYCLINE D1* et *c-MYC* (Andersson *et al.*, 2011).

La voie Notch et la voie TGF β convergent directement via des interactions entre NIC et les protéines SMAD. Ces interactions semblent être spécifiques selon le récepteur Notch impliqué. Par exemple, seul NIC4, et non NIC1 et NIC2, interagit avec SMAD2 et SMAD3 phosphorylés. De plus, CSL co-immunoprécipite avec certaines SMAD phosphorylés, suggérant que les protéines SMAD peuvent être recrutées au complexe transcriptionnel de NIC (Andersson, E.R. *et al.*, 2011).

Une diminution dans les niveaux d'oxygène active la réponse cellulaire hypoxique. En fait, il y a des évidences que certains gènes peuvent être régulés par la voie Notch et la réponse cellulaire hypoxique, puisque leur promoteur contiennent à la fois des sites de liaison pour NIC et pour HIF1 α tels que les gènes *HEY1* et *HEY2* (Diez *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que NIC interagit directement avec deux composantes clé de la réponse hypoxique, HIF1 α et FIH. Comme mentionné précédemment, ces protéines peuvent influencer l'hydroxylation de NIC (Andersson *et al.*, 2011).

Enfin, ces exemples de coopération entre ces voies de signalisation et NIC sont complexes. Les interactions de NIC avec des partenaires impliqués dans d'autres voies de signalisation permettent de souligner que NIC pourrait avoir plusieurs partenaires d'interaction et que ces interactions pourraient avoir différents impacts sur le programme

génique des cellules, et ainsi influencer leur comportement. De ce fait, il vient nécessaire d'identifier les partenaires de NIC, ce qui aidera à mieux comprendre la signalisation Notch, ainsi que son influence sur d'autres voies de signalisation.

1.5 Problématique de recherche et hypothèse

NOTCH1 est un récepteur transmembranaire qui, suite à la liaison de son ligand, subit une série de clivages protéolytiques libérant un fragment intracellulaire actif NIC1. Une fois libéré, NIC1 transloque au noyau où il s'associe à des cofacteurs transcriptionnels tels CSL et MAML1 afin d'initier la transcription de gènes cibles dont *HES1* (Andersson *et al.*, 2011). Très peu de choses sont connues quant aux modifications post-traductionnelles pouvant moduler l'activité du complexe transcriptionnel formé par NIC1 e.g. NIC1/CSL/MAML1. De plus, les études jusqu'à présent n'ont pas permis d'identifier tous les partenaires d'interaction se retrouvant dans le complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1 et pouvant moduler son activité. Il s'avère donc pertinent d'étudier plus en profondeur les mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation de la signalisation de NOTCH1. Pour étudier les mécanismes de façon temporelle, il est possible d'activer de façon synchronisée la voie Notch via un traitement à l'EGTA. Ce dernier déstabilise le récepteur et mène à son activation par clivage protéolytique indépendamment de la liaison au ligand (Rand *et al.*, 2000). Dans le laboratoire, il a été montré que l'EGTA, voire activation de NOTCH1, mène à une augmentation de l'expression d'Hes1 et c-Myc, des gènes cibles du complexe NIC1/CSL/MAML1 (Tremblay *et al.*, 2013). Le traitement avec un inhibiteur de la transcription, l'actinomycine D1, prévenant l'augmentation d'expression d'Hes1 induite par le traitement à l'EGTA, ces résultats suggèrent que suivant le clivage de NOTCH1, NIC1 transloque au noyau, forme un complexe transcriptionnel et promeut l'expression génique. D'autant plus intéressant, suite au clivage de NOTCH1, le fragment NIC1 se retrouve sous différents poids moléculaires suggérant des modifications post-traductionnelles s'effectuant sur NIC1 suite à sa libération (Tremblay *et al.*, 2013).

L'hypothèse de mon projet est que suite au clivage du récepteur NOTCH1, le fragment intracellulaire libéré (NIC1) subit des modifications post-traductionnelles favorisant le recrutement coordonné de partenaires, ce qui assure l'assemblage d'un complexe transcriptionnel fonctionnel.

Afin de pouvoir vérifier cette hypothèse, l'objectif principal de ce projet de recherche était d'établir un système permettant l'identification de nouveaux partenaires transcriptionnels de NIC1 capable de moduler l'activité du complexe tertiaire NIC1/CSL/MAML1. En second lieu, ce système devait permettre l'identification de sites et types de modifications sur NIC1 qui servirait par la suite à clarifier l'impact des modifications post-traductionnelles que subit NIC1.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Les modèles cellulaires

Les expériences ont été réalisées avec trois modèles de cellules différents provenant d'ATCC (American Type Culture Collection). Un modèle de cellules pancréatiques tumorales humaines, MIA PaCa-2, qui possèdent des niveaux élevés d'activation de la voie de signalisation Notch (Büchler *et al.*, 2005). Un modèle de cellules embryonnaires humaines de reins, HEK293T, a été utilisé pour les études de surexpression alors que des cellules d'ostéosarcome, U2OS Flp-InTM T-REXTM, ont été utilisées pour générer des lignées cellulaires stables. Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (Wisent Inc., Canada), du GlutaMAX 2mM (Invitrogen, Carlsbad, CA), de l'Hepes 0,01M (Wisent Inc., Canada) et du sodium pyruvate 1mM (Wisent Inc., Canada). Il est à noter que les U2OS Flp-InTM T-REXTM ont été cultivées en présence d'hygromycin B 0,15mg/mL (Wisent Inc., Canada) et de zeocine 0,10mg/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA). La culture cellulaire a été faite dans un environnement humide à 37°C, en présence de 5% CO₂ et 95% air.

2.2 Modulation de la voie de signalisation Notch

Afin de favoriser le clivage des récepteurs Notch, dont NOTCH1, les cellules ont été traitées avec de l'éthylène glycol-bis(2-aminoéthylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA, Sigma Aldrich, St-Louis, MO) ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 4mM pendant 15 minutes (Rand *et al.*, 2000; Tremblay *et al.*, 2013). Le milieu contenant l'EGTA a ensuite été aspiré pour être remplacé par du milieu de culture frais pendant différentes périodes de temps. Afin d'inhiber la voie de signalisation Notch, l'inhibiteur de gamma-sécrétase DAPT (Calbiochem, San Diego, CA) a été ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 25µM (Li *et al.*, 2012 et Tremblay *et al.*,

2013). Afin d'étudier la stabilité de NIC1, les cellules ont été traitées au cycloheximide 25µg/mL (CHX, Sigma Aldrich, St-Louis, MO), un inhibiteur de la synthèse protéique. Plus précisément, il inhibe l'élongation traductionnelle en liant la sous-unité 60S des ribosomes et en interférant avec les ARN de transfert (ARNt) (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010 et, Pestova et Hellen, 2003). Enfin, le MG132 (EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) a été utilisé à une concentration de 10µM pour inhiber la dégradation protéasomale de NIC1.

2.3 Vecteurs d'expression

Afin de surexprimer le récepteur Notch1, la construction pCS2-Notch1ΔE (obtenue d'Urban Lendahl, Karolinska Institute, Suède), codant pour un récepteur Notch1 murin, dont la région extracellulaire a été tronquée (résidus Δ21-1703), a été utilisée. Cette construction d'ADN comprend une étiquette myc. Des constructions codantes pour NIC1-GFP ont été utilisées notamment pour les transfections transitoires et les transfections stables, et sont énumérées dans le tableau 2. Plus précisément, la séquence humaine codante pour NIC1 a été amplifiée par PCR à partir d'un vecteur d'expression codant pour NOTCH1 (pcDNA3-NOTCH1; résidus 1 à 2556; Sanchez-Irizarry *et al.*, 2004) et clonée dans le vecteur donneur pDONR221 à l'aide de la BP Clonase™ Enzyme Mix (Gateway® Technology, Invitrogen, Carlsbad, CA). L'insert codant pour NIC1 (résidus 1753 à 2556) a ensuite été cloné dans les différents vecteurs de destination (pDEST47 et 53, pgLAP1 et pgLAP5) à l'aide de la LR Clonase™ Enzyme Mix (Gateway® Technology, Invitrogen, Carlsbad, CA). Les constructions codantes pour NIC1-V5, CSL-Flag, MAML1-V5 utilisées pour les transfections transitoires sont aussi énumérées dans le tableau 2. Enfin, les mutants ponctuels de NIC1 S2521A-S2522A-S2523A-S2524A (NIC1 S2521-24A) et S2524D, encodés dans le vecteur donneur pDONR221, ont été générés via le service de mutagenèse de GenScript (Piscataway, NJ). Ils ont ensuite été clonés dans le vecteur de destination pDEST47 à l'aide de la LR Clonase™ Enzyme Mix (Gateway® Technology, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Tableau 2. Liste des vecteurs d'ADN utilisés

Vecteur	Insert	Étiquette	Position de l'étiquette	Fournisseur	Transfection
pCS2	Notch1ΔE	myc	C-terminal	U. Lendahl	Transitoire
pDONR221	NIC1	Aucun	Aucun	Construction maison	Aucune
pcDNA3	NOTCH1	Aucun	Aucun	S. C. Blacklow	Aucune
pDEST47	NIC1	GFP	C-terminal	Construction maison	transitoire
pDEST47	NIC1 S2521-24A	GFP	C-terminal	GenScript	transitoire
pDEST47	NIC1 S2524D	GFP	C-terminal	GenScript	transitoire
pDEST53	NIC1	GFP	N-terminal	Construction maison	transitoire
pLX302	NIC1	V5	C-terminal	Construction maison	transitoire
pSG5	CSL	Flag	C-terminal	S.D. Hayward	transitoire
pHAGE	MAML1	V5	N-terminal	Addgene	transitoire
pgLAP1	NIC1	GFP	N-terminal	Construction maison	stable
pgLAP5	NIC1	GFP	C-terminal	Construction maison	stable
pOG44	Flp recombinase	Aucun	Aucun	Invitrogen	stable
pGL2	CSL-4X-Luc	Aucun	Aucun	S.D. Hayward	transitoire
pRL-CMV	<i>Renilla</i>	Aucun	Aucun	Promega	transitoire

2.4 Transfection transitoire

Les cellules MIA PaCa-2 ou HEK293T ont étéensemencées dans un pétri pour atteindre 70% de confluence le lendemain de l'ensemencement. Les transfusions transitoires ont été faites à l'aide de l'Effectene® Transfection Reagent (QIAGEN, Valencia, CA) en suivant les instructions de manufacturier. Brièvement, la journée avant la transfection, les cellules ont étéensemencées dans un pétri 100mm pour obtenir 40-80% de confluence le lendemain. Un microgramme d'ADN a été dilué dans 150µL de tampon EC et 8µL d'Enhancer ont été ajoutés. Après incubation de 5 minutes à température ambiante, 15µL d'Effectene® Transfection Reagent ont été ajoutés au mélange. Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, le milieu de culture cellulaire a été aspiré et remplacé par 7mL de milieu frais. Ensuite, 3mL de milieu a été ajouté aux tubes contenant les complexes de transfection. Enfin, le mélange a été ajouté immédiatement aux cellules. Les cellules ont été lysées le lendemain de la transfection. Il est à noter que la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) a été utilisée pour les transfusions transitoires lors des Essais luciférase (voir détails de la transfection section 2.11).

2.5 Transfection stable

Le système Flp-In™ T-REX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) permet de générer des lignées cellulaires stables dont l'expression d'un gène d'intérêt est inductible à la doxycycline et provient d'une location génomique spécifique permettant de mieux contrôler les niveaux d'expression du transgène. Ainsi, des cellules U2OS Flp-In™ T-REX™ ont étéensemencées dans un pétri 60mm pour atteindre 80% de confluence le lendemain de l'ensemencement. Les transfusions stables ont été faites à l'aide de Lipofectamine® LTX and PLUS™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) suivant les instructions du manufacturier. Brièvement, pour un pétri 60mm, 5µg d'ADN et 5µL de PLUS™ Reagent ont été dilués dans 330µL d'Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) (mélange A). Le mélange A a été incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, 5µL de

Lipofectamine® LTX ont été dilués dans 330µL (mélange B) et le mélange B a été incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Les mélanges A et B ont été mélangés ensemble et incubés pendant 20 minutes à température ambiante. Ensuite, le mélange total a été ajouté aux cellules. En fait, les cellules U2OS Flp-In™ T-REX™ ont été co-transfectées avec 500ng du vecteur pgLAP1 NIC1-GFP ou pgLAP5 NIC1-GFP et, avec 4,5µg du vecteur pOG44 codant pour la Flp recombinase (Buchholz *et al.*, 1996), respectant un ratio 1/9 (gène d'intérêt/recombinase). Le lendemain, les cellules transfectées ont été trypsinisées et ensemencées dans un pétri 100mm. Le jour suivant, la lignée cellulaire stable U2OS Flp-In™ T-REX™ NIC1-GFP a été générée suite à une sélection à l'hygromycine B 0,15mg/mL (Wisent Inc., Canada) pendant 10 jours.

2.6 Extraction des protéines

2.6.1 Lyse Triton

Les cellules MIA PaCa-2 ont été lysées sur glace, pour une période de 10 minutes, dans un tampon Triton X-100 1%, Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, EDTA 5mM, β-glycérophosphate 40mM, NaF 50mM et glycérol 10% auquel des inhibiteurs de protéases et phosphatases ont été ajoutés, soit le PMSF 1mM, l'Aprotinine 0,5µg/mL, la Leupeptine 0,5µg/mL, la Pepstatine 0,7µg/mL et l'Orthovanadate 0,2mM. Ensuite, les débris cellulaires insolubles ont été éliminés par centrifugation à 10 000 RPM pendant 10 minutes à 4°C (accuSpin Micro 17, Fisher Scientific). Suivant la centrifugation, les protéines contenues dans le surnageant ont été récupérées et dosées en duplicata à l'aide de la trousse Pierce™ BCA Protein Assay Kit (THERMO Scientific, Waltham, MA) suivant les instructions du manufacturier. Une courbe standard a été établie avec l'albumine de sérum bovin (BSA) provenant de la trousse.

2.6.2 Lyse avec forte concentration en sels

Cette méthode d'extraction des protéines permet d'extraire davantage les protéines nucléaires risquant d'être associées à la chromatine et qui sont peu solubilisées à l'aide du tampon triton (section 2.6.1). Les cellules HEK293T et U2OS Flp-InTM T-REXTM NIC1-GFP ont été lysées 10 minutes sur glace avec un tampon NP-40 1%, Tris 50mM, NaCl 300mM, KCl 150mM, EDTA 5mM, NaF 10mM et glycérol 10% auquel des inhibiteurs de protéases et phosphatases ont été ajoutés, soit le PMSF 1mM, l'Aprotinine 0,5µg/mL, la Leupeptine 0,5µg/mL, la Pepstatine 0,7µg/mL et l'Orthovanadate 0,2mM. Ensuite, les lysats cellulaires ont été soniqués 10 secondes et les protéines solubles ont été séparées des débris cellulaires insolubles par centrifugation à 10 000 RPM pendant 10 minutes à 4 °C (accuSpin Micro 17, Fisher Scientific). Suivant la centrifugation, les protéines contenues dans le surnageant ont été récupérées et dosées à l'aide de la méthode BCA, telle que décrite dans la section 2.6.1.

2.6.3 Fractionnement cellulaire à l'aide de la nucléase micrococcalle

À partir d'un pétri 100mm confluent, les cellules ont été récupérées dans 1mL de PBS à 4°C (Coschi *et al.*, 2010; Mendez et Stillman, 2000). Le PBS a été éliminé par centrifugation 4000 RPM pendant 2 minutes à 4°C (accuSpin Micro 17, Fisher Scientific). Les culots ont ensuite été resuspendus dans 400µL de tampon A (Hepes 10mM, KCl 10mM, MgCl 1,5mM, Sucrose 0,34M, 10% glycérol et DTT 1mM auquel des inhibiteurs de protéases et phosphatases ont été ajoutés, soit le PMSF 1mM, l'Aprotinine 0,5µg/mL, la Leupeptine 0,5µg/mL, la Pepstatine 0,7µg/mL et l'Orthovanadate 0,2mM) et incubés sur glace 5 minutes. Par la suite, les échantillons ont été centrifugés à 1300g pendant 5 minutes à 4°C (accuSpin Micro 17, Fisher Scientific). Les culots (Fraction P1) ont été conservés, alors que les surnageants (Fractions S1) ont été centrifugés de nouveau à 15 000g pendant 15 minutes à 4°C (voir Tableau 3 pour une description des fractions). Cette étape permet d'éliminer les débris insolubles. Ensuite, les surnageants (Fraction S2) contenant les protéines cytosoliques ont été conservés. Les culots (Fraction P1) ont été lavés avec 400µL

de tampon A et centrifugés à 1300g pendant 5 minutes avant d'être resuspendus dans 200µL de tampon A. Puis, 1 unité (5µL) de nucléase micrococcale (provenant de *Staphylococcus aureus*, Sigma, St-Louis, MO) a été ajoutée et son activité a été initiée par l'ajout de 5µL de CaCl₂ 0,1M. Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 2 minutes avant de procéder à l'arrêt de la réaction via l'ajout de 10µL d'EGTA 0,1M. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 1300g pendant 5 minutes à 4°C (accuSpin Micro 17, Fisher Scientific). Les culots (Fraction P2) ont été conservés et resuspendus dans 100µL de tampon B (EDTA 3mM, EGTA 0,2mM et DTT 1mM auquel des inhibiteurs de protéases et phosphatases ont été ajoutés, soit le PMSF 1mM, l'Aprotinine 0,5µg/mL, la Leupeptine 0,5µg/mL, la Pepstatine 0,7µg/mL et l'Orthovanadate 0,2mM). Les fractions P2 resuspendues ont été incubées sur glace pendant 30 minutes. Par la suite, les échantillons ont été centrifugés à 1700g pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants ont été conservés (Fraction S3) et contenaient les protéines nucléaires solubilisées. Enfin, les culots ont été également conservés (Fraction P3) et laver avec 100µL de tampon B. Les fractions S2 et S3 ont été dosées comme décrit dans la section 2.6.1.

Tableau 3. Description des fractions du fractionnement cellulaire à l'aide de la nucléase micrococcale

Fractions	Description
S1	Contient les protéines du cytoplasme avec débris insolubles
P1	Contient les protéines nucléaires avec débris insolubles
S2	Contient les protéines cytoplasmiques
P2	Contient les protéines nucléaires avant l'action de la nucléase
S3	Contient les protéines nucléaires et potentiellement associées à la chromatine
P3	Contient les protéines nucléaires insolubles suite à l'action de la nucléase

2.6.4 Fractionnement cellulaire

À partir d'un pétri 100mm confluent, les cellules ont été récupérées dans 1mL de PBS à 4°C. Le PBS a été éliminé par centrifugation à 4000 RPM pendant 2 minutes à 4°C (accuSpin Micro 17, Fisher Scientific). Les culots ont été resuspendus dans 400µL de tampon A (Hepes 10mM, KCl 10mM, EDTA 0,1mM, EGTA, 0,1mM, NaF 10mM, βglycérophosphate 10mM et DTT 1mM auquel des inhibiteurs de protéases et phosphatases ont été ajoutés, soit le PMSF 1mM, l'Aprotinine 0,5µg/mL, la Leupeptine 0,5µg/mL, la Pepstatine 0,7µg/mL et l'Orthovanadate 0,2mM) et incubés sur glace pendant 15 minutes. Vingt-cinq microlitres de Nonidet P-40 10% ont été ajoutés aux échantillons vortexés 15 secondes et centrifugés à 12 000g pendant 30 secondes à 4°C (accuSpin Micro 17, Fisher Scientific). Les surnageants ont été conservés (Cytosol) et contenaient les protéines cytosoliques. Les culots ont été resuspendus dans 75µL de tampon B (Hepes 20mM, NaCl 0,4M, EDTA 1mM, EGTA 1mM, DTT 1mM, NaF 10mM, β-glycérophosphate 10mM et 5% glycérol auquel des inhibiteurs de protéases et phosphatases ont été ajoutés, soit le PMSF 1mM, l'Aprotinine 0,5µg/mL, la Leupeptine 0,5µg/mL, la Pepstatine 0,7µg/mL et l'Orthovanadate 0,2mM). Par la suite, les échantillons ont été centrifugés 10 000 RPM pendant 10 minutes à 4°C (accuSpin Micro 17, Fisher Scientific). Les surnageants ont été conservés (Noyau) et contenaient les protéines nucléaires. Les culots ont été également conservés (Chromatine) et ont été resuspendus dans du Laemmli 1X. Les culots contiennent les protéines insolubles et potentiellement associées à la chromatine. Les fractions cytosoliques et nucléaires ont été dosées tel que décrit dans la section 2.6.1.

2.7 Immunobuvardage

Suite au dosage protéique, des quantités équivalentes de protéines ont été préparées en y ajoutant un tampon dénaturant, le Laemmli 4X. Le volume a ensuite été ajusté pour obtenir une concentration finale de Laemmli 1X (Tris-HCl 62.5mM pH6,8, SDS 2,3%, glycérol 10%, PMSF 1mM, bleu de bromophénol 0,005% et β-mercaptoéthanol 5%). Pour compléter la dénaturation des protéines, les échantillons préparés ont été incubés 5 minutes

à 95°C. Les échantillons protéiques ont ensuite été séparés sur gel SDS-PAGE (gel concentrateur 4% et gel séparateur 7,5%). L'électrophorèse a été faite dans un tampon de migration (Tris 0,025M, Glycine 0,192M et SDS 0,1%) pendant 16 heures soumis à 8mA/gel à 4°C. Suivant l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,45µM (GE Healthcare, Life Sciences, Mississauga, Canada) dans un tampon de transfert (Tris 25mM, Glycine 192mM et Éthanol 10%) pendant 4 heures soumis à 250mA à 4°C. Pour visualiser la qualité du transfert, la membrane de nitrocellulose a été colorée avec une solution de Rouge de Ponceau (Ponceau S 0,02% et Acide trichloroacétique 3%) puis rincée abondamment avec de l'eau distillée. Par la suite, les sites non-spécifiques de la membrane ont été bloqués avec une solution de protéine de lait 5% (Carnation, Nestle) dans du PBS 1X, Tween-20 0,05% pendant 16 heures sous agitation à 4°C. L'anticorps primaire a été dilué dans la solution de blocage selon les conditions présentées dans le tableau 4. La membrane a été incubée avec la dilution d'anticorps primaire sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. Avant de poursuivre, la membrane a été lavée 3 fois 10 minutes sous agitation dans la solution de PBS 1X, Tween-20 0,05%. La membrane a ensuite été incubée dans la dilution d'anticorps secondaire (Tableau 5) sous-agitation pendant 1 heure à température ambiante. La membrane a de nouveau été lavée 3 fois 10 minutes sous agitation dans la solution de PBS 1X, Tween-20 0,05%. Un dernier lavage a été fait dans une solution de PBS 1X pendant 10 minutes sous agitation. Finalement, la révélation des protéines a été faite à l'aide d'une solution de révélation (Solution A : 10mL de Tris 0,1M pH 8,5, 50µL d'Acide coumarique 90mM et 100µL de Luminol 250mM mélangée à la Solution B : 10mL de Tris 0,1M pH 8,5, et 6µL de H₂O₂ 30%) où la membrane y a été incubée pendant 1 minute. L'excès de solution de révélation a été retiré et la membrane a été enveloppée dans une pellicule de plastique et placée à la noirceur. La membrane a été exposée sur un film photographique HyBlot CL[®] Autoradiography Film (Denville Scientific, Inc.) pour une durée variable. Pour les analyses d'expression relative, la densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ.

Tableau 4. Liste et dilution des anticorps primaires utilisés en immunobuvardage

Anticorps	Dilution	Origine	Fournisseur	Référence
Actine, Clone C4	1/10 000	Souris	Millipore	MAB1501R
c-Myc (9E10)	1/1000	Souris	Santa Cruz	sc-40
CSL: RBPSUH (D10A4)	1/3000	Lapin	Cell Signaling	5313
Cycline D1 (H-295)	1/500	Lapin	Santa Cruz	sc-753
Flag M2	1/1000	Souris	Sigma	SL05105
GAPDH (14C10)	1/50 000	Lapin	Cell Signaling	2118
GFP (B-2)	1/1000	Souris	Santa Cruz	sc-9996
HES1 (D6P24)	1/1000	Lapin	Cell Signaling	11988
MAML1	1/1000	Lapin	Cell Signaling	4608
NOTCH1 (C-20)-R	1/1000	Lapin	Santa Cruz	sc-6014-R
NIC1: cleaved Notch1 (Val1744) (D3B8)	1/750	Lapin	Cell Signaling	4147
Rpb1 CTD (4H8)	1/5000	Souris	Cell Signaling	2629

Tableau 5. Liste et dilution des anticorps secondaires utilisés en immunobuvardage

Anticorps	Dilution	Origine	Fournisseur
Peroxidase-conjugated AffiniPure Anti-Rabbit IgG (H+L)	1/2500	Chèvre	Jackson Immuno Research
Peroxidase-conjugated AffiniPure Anti-Mouse IgG (H+L)	1/2500	Chèvre	Jackson Immuno Research

2.8 Immunoprécipitation

Le NIC1 endogène a été immunoprécipité avec un anticorps spécifique dirigé contre NIC1 (voir tableau 3). Pour ce faire, 40µL de billes de Protein G sepharoseTM (GE Healthcare, Mississauga, Canada) ont été pré-lavées avec 1mL de tampon de lyse. Les billes de Protein G sepharoseTM ont ensuite été incubées 30 minutes à 4°C avec les extraits protéiques afin d'éliminer les interactions non-spécifiques. Par la suite, les billes ont été retirées par centrifugation à 2000 RPM pendant 30 secondes. À partir de ces extraits protéiques contenant 1mg de protéines, 5µl d'anticorps (anti-NIC1) y ont été ajoutés et incubés pendant 2 heures à 4°C sous agitation. Suivant cette incubation, 40µl de nouvelles billes de Protein G sepharoseTM pré-lavées avec le tampon de lyse ont été ajoutées aux immunocomplexes et incubées 2 heures à 4 °C sous agitation. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 2000 RPM pendant 1 minute à 4°C. Le surnageant a été conservé pour l'immunobuvardage et les immunoprécipitats ont été lavés 3 fois avec 1mL de tampon de lyse et 1 fois avec 1mL de PBS 1X.

Le Notch1ΔE-myc et le NIC1-GFP ont été immunoprécipités à l'aide d'anticorps pré-couplés aux billes d'agarose, soit l'anticorps c-Myc (9E10) AC (Santa Cruz Biotechnologie, sc-40 AC, Dallas, TX) et l'anticorps GFP_TRAP[®]_A (Chromotek, gta-20, Planegg, Allemagne). Pour ce faire, 15µl d'anticorps pré-couplés aux billes pré-lavées avec le tampon de lyse ont été ajoutés à 1mg d'extraits protéiques. Le tout a ensuite été incubé 2 heures à 4°C sous agitation. Comme décrit précédemment, les échantillons ont été centrifugés à 2000 RPM pendant 1 minute à 4°C. Le surnageant a été conservé pour immunobuvardage et les immunoprécipitats ont été lavés 3 fois avec 1mL de tampon de lyse et 1 fois avec 1mL de PBS 1X. Pour chaque type d'immunoprécipitation, les immunoprécipitats ont été resuspendus dans du Laemmli 2X (volume correspondant au volume de billes) et incubés à 95°C pendant 5 minutes. Enfin, les immunoprécipitats, 25µg d'extraits protéiques et 25µg de surnageants ont été déposés sur gel SDS-PAGE.

2.9 Essai phosphatase *in vitro*

NIC1, Notch1 Δ E et NIC1-GFP ont été immunoprécipités tel que décrit dans la section 2.8. Suivant les 3 lavages au tampon de lyse (sans inhibiteurs de phosphatases), les immunocomplexes ont été lavés une fois avec du tampon phosphatase (NEBuffer 1X for Protein MetalloPhosphatase supplémenté avec 1mM MnCl₂ (New England Biolabs Inc., Danvers, MA)). Les billes ont ensuite été séparées également dans deux microtubes. Quatre cents unités de Lambda Protein Phosphatase (λ PPase) (New England Biolabs Inc., Danvers, MA) ont été ajoutées à un seul des microtubes et les deux microtubes ont été incubés 30 minutes à 30°C. La réaction a été arrêtée en y ajoutant du Laemmli 2X. Les échantillons ont été incubés 5 minutes à 95°C et déposés sur gel SDS-PAGE.

2.10 Microscopie à fluorescence

Les cellules ont été ensemencées à 40% de confluence sur lamelle de verre. Le tout a été placé dans des plaques de culture 6 puits et incubé pour 24 heures. Les cellules ont ensuite été transfectées tel que décrit dans la section 2.4. Vingt-quatre heures suivant la transfection, les cellules ont été rincées au PBS 1X et fixées avec 2% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 20 minutes sous agitation. Le PFA a été récupéré et les cellules ont été lavées 3 fois 5 minutes avec une solution de TBS 1X, 0,1% Tween-20. Ensuite, les cellules ont été perméabilisées avec une solution de Triton X-100 0,1% pendant 10 minutes et les cellules ont été de nouveau lavées 3 fois 5 minutes avec le TBS 1X, Tween-20 0,1%. Afin de mettre en évidence les noyaux, les cellules ont été colorées au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, St-Louis, MO) pendant 1 minute et lavées 2 fois 5 minutes au TBS 1X, Tween-20 0,1%. Enfin, les lamelles ont été montées sur lames avec 8 μ L de milieu de montage (Immuno-Mount, Thermo Scientific, Waltham, MA). Les cellules ont été visualisées par microscopie à fluorescence avec l'appareil DM2500/Optigrad (Leica Biosystems, Heidelberg, Germany).

2.11 Essai luciférase

Les cellules HEK293T ont étéensemencées dans une plaque de culture 24 puits afin que les cellules soient en phase de croissance au moment de la transfection (70% de confluence). Le lendemain, le milieu de culture a été changé pour l'Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) environ une heure avant la transfection. Les mélanges d'ADN ont été préparés en triplicata à raison de 200ng/puits de pGL2 CSL-4X-Luc (Tableau 2) (Hayward *et al.*, 2009), 200ng/puits de vecteur d'expression NIC1 WT-GFP, NIC1 S2521-24A-GFP ou NIC1 S2524D-GFP et de 0,5ng/puits de pRL-CMV *Renilla* (Tableau 2) (Promega, Madison, MIS). Un mélange de Lipofectamine 2000 (1,6µL/puits) (Invitrogen, Carlsbad, CA) et d'Opti-MEM (50µL/puits) (Invitrogen, Carlsbad, CA) a été préparé et incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, 150µL d'Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) a été ajouté à chaque mélange d'ADN qui a été préparé en triplicata. Par la suite, 150µL du mélange Lipofectamine 2000/Opti-MEM a été ajouté à chaque tube d'ADN à transfecter. Le tout a été incubé 15 minutes à température ambiante. Ensuite, 100µL du mélange contenant les ADN et la Lipofectamine 2000 a été ajouté à chaque puits. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% CO₂, pendant 4 heures. L'Opti-MEM a ensuite été aspiré et remplacé par du milieu de culture standard, et les cellules ont été incubées pour un total de 48h post-transfection. La quantification de l'activité luciférase de la mouche à feu et de la *Renilla* a été faite à l'aide de la trousse Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, Madison, WIS). Brièvement, le milieu de culture a été aspiré et 100µL de Passive Lysis Buffer 1X (Promega, Madison, WIS) a été ajouté à chaque puits. Ensuite, la plaque de 24 puits a été placée sur une plaque agitatrice pendant 30 minutes à température ambiante et les lysats ont été récoltés dans un microtube. Pour procéder à l'essai luciférase, 20µl de chaque lysat à tester ont été ajoutés dans une plaque 96 puits. À l'aide du luminomètre (Berthold Detection Système, Calmbacher Strasse, Germany), 50µL de LAR II (Promega, Madison, WIS) ont été ajoutés à chaque puits et l'activité luciférase de la mouche à feu a été mesurée. Enfin, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 50µl/puits de Stop&Glo[®] Reagent (Promega, Madison, WIS) et l'activité luciférase de la *Renilla* a été mesurée.

2.12 Méthode SILAC et digestion à la trypsine

Les cellules U2OS Flp-InTM T-REXTM NIC1-GFP ont été cultivées au moins 5 passages dans du milieu DMEM déplété en arginine et lysine supplémenté avec 10% FBS dialysé (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100U/mL pénicilline/streptomycine et 2mM GlutaMAX. L'arginine et la lysine ont été ajoutées au milieu léger (Arg0, Lys0; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) ou au milieu moyen (Arg6, Lys4; Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA) à une concentration finale de 28µg/mL pour l'arginine et 49µg/mL pour la lysine.

Après avoir amplifié les cellules dans 3 pétris de 15 cm pour chaque condition SILAC (léger et moyen), les cellules ont été lysées tel que décrit à la section 2.6.2 et Notch1ΔE a été immunoprécipité à l'aide des billes d'agarose c-Myc (9E10) AC (Santa Cruz Biotechnology, sc-40 AC, Dallas, TX) et NIC1-GFP a été immunoprécipité à l'aide des billes d'agarose GFP_TRAP[®]_A (Chromotek, gta-20/500µl, Atlanta, GA) tel que décrit dans la section 2.8.

Suivant l'immunoprécipitation, les protéines ont été réduites en ajoutant du DTT à une concentration finale de 10mM et chauffées à 95°C pendant 2 minutes pour ensuite être alkylées en ajoutant de l'iodoacetamine à une concentration finale de 50mM. Par la suite, les protéines ont été migrées sur gel SDS-PAGE (4-12% Bis-Tris Novex mini-gel, Life technology, Carlsbad, CA). Le gel a ensuite été lavé 5 fois avec de l'eau distillé et coloré pour 1 heure au bleu de coomassie (Simply Blue Safe Stain, Life Technologie, Carlsbad, CA). Suivant la coloration, la ligne de gel contenant les protéines a été excisée et tranchées en 8 bandes de gel placées dans des tubes LoBind (Eppendorf, Hauppauge, NY). Les 8 bandes de gels ont ensuite été décolorées via une série de lavages avec l'Acétonitrile (CH₃CN, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO), une solution de NH₄HCO₃ 20mM et une solution de NH₄HCO₃ 20mM/ CH₃CN (50:50 v/v). Chaque bande de gel décolorée a été digérée en ajoutant la trypsine (Trypsin Gold, Promega, Madison, WIS) à une concentration de 12,5ng/mL diluée dans une solution de NH₄HCO₃ 20mM pendant 16 heures à 30°C. Par la suite, les peptides obtenus suite à la digestion à la trypsine ont été extraits via une série de

lavages. Premièrement, un volume égal de CH₃CN (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) a été ajouté à la digestion et incubé pendant 30 minutes à 30°C. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube LoBind (Eppendorf, Hauppauge, NY). Deuxièmement, les bandes de gel ont été réhydratées avec une solution d'acide formique 1% (Fisher Scientific, Waltham, MA) et incubées pendant 20 minutes à température ambiante. Le surnageant a été transféré dans le nouveau tube LoBind (Eppendorf, Hauppauge, NY) et cette étape a été répétée de nouveau. Troisièmement, les bandes de gel ont été déshydratées avec 150µL de CH₃CN (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) et le surnageant a été ajouté aux peptides qui ont ensuite été lyophilisés au speedvac. Une fois les peptides lyophilisés, ils ont été resuspendus dans 25µL de TFA 0,1% (Trifluoroacetic acid, Sigma-Adrich, St-Loui, MO). Enfin, les échantillons ont été passés sur colonne ZipTips (Millipore, ZTC18S096) pour enlever toutes traces de détergents et de sels. Brièvement, le ZipTip a été placé au bout d'une pipette P10. Le ZipTip a été trempé en aspirant 10µL de CH₃CN (Sigma-Adrich, St-Loui, MO). L'acétonitrile a été jetée et cette étape a été répétée deux fois. Le ZipTip a été équilibré en aspirant 10µL de TFA 0,1% (Sigma-Adrich, St-Loui, MO). Le TFA 0,1% a été jeté et l'étape a été répétée deux fois. Ensuite, le ZipTip a été placé dans l'échantillon peptidique et 7 à 10 cycles de «up and down» ont été faits. Le ZipTip a ensuite été lavé en aspirant 10µL de TFA 0,1%. Le TFA 0,1% a été jeté et l'étape a été répétée deux fois. Enfin, l'échantillon peptidique a été élué avec une solution d'acide formique 1% et de CH₃CN 50%. Enfin, les échantillons peptidiques ont été lyophilisés au speedvac. Après cette étape de purification, les peptides ont été resuspendus dans 25µL d'acide formique 1% (Fisher Scientific, Waltham, MA).

2.13 LC-MS/MS

Les peptides digérés ont été séparés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) à l'aide du système Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). En fait, 12µL d'échantillon (environ 2µg de peptides) dans l'acide formique 1% ont été injectés sur une colonne Acclaim PepMap C18 (0,3mm X 5mm, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA). Après l'enrichissement, les peptides ont été élués sur

une colonne PepMap C18 (75 μ m X 50cm, Dionex Corporation) avec un gradient linéaire de 5 à 35% de solvant B (CH₃CN 90%, acide formique 0,1%) sur 240 minutes avec un flux constant de 200nL/min. Le système HPLC est couplé à un spectromètre de masse Orbitrap QExactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) via une source Easy Spray. Le voltage du vaporisateur a été ajusté à 2,0kV et la température de la colonne a été ajustée à 40°C. L'acquisition des spectres en mode de balayage complet (ratio masse/charge (m/z) 350-1600) a été enregistrée par l'Orbitrap avec une résolution de 70 000, après l'accumulation d'un milliard d'ions. Les 10 ions peptidiques les plus intenses ont été séquencés par l'énergie de dissociation induite par collision dans l'Orbitrap (énergie de collision normalisée à 35%, résolution de 17 500). Le temps de remplissage a été de 250ms pour l'analyse complète et de 60ms pour l'analyse MS/MS. Les charges des ions précurseurs ont été évaluées, et tous les ions non-assignés ou les ions ayant une charge de +1, +7 ou +8 ont été rejetés. La liste d'exclusion a été restreinte à un maximum de 500 entrées avec une période de rétention maximale de 40 secondes et une fenêtre de masse relative de 10ppm. L'option de verrouillage de masse a été activé pour l'analyse afin d'améliorer la précision de la masse. Enfin, les données ont été obtenues à l'aide du logiciel Xcalibur (version 2.1). (Boisvert *et al.*, 2010; Marchand *et al.*, 2015; Drissi *et al.*, 2015)

2.14 Analyses bioinformatiques

La quantification des données a été faite à l'aide du logiciel MaxQuant version 1.4.1.2 et les données ont été recherchées à l'aide de la banque de données de protéines humaines Uniprot (16/07/2013; 88 354 entrées). Les paramètres utilisés pour les analyses dans MaxQuant sont les suivants : 2 mauvais clivages ont été acceptés; la modification non-variable est la carboamidométhylation des cystéines; digestion faite avec la Trypsine (K/R sauf lors avant une proline); les modifications variables sont l'oxydation des méthionines et l'acétylation des protéines en N-terminal. La masse tolérée pour les ions précurseurs était de 7ppm et de 20ppm pour les fragments d'ions. L'option de requantification (re-quantify) a été sélectionnée pour calculer le ratio des motifs isotopiques non-assemblés en paires SILAC, ce qui a souvent été observé pour les expériences

d'immunoprécipitation dû à l'absence de la protéine d'intérêt dans le contrôle. Pour une identification fiable, toutes les protéines ont été acceptées basé sur le critère que le nombre de protéines identifiées dans la base de données est au moins 100 fois plus grand que le nombre de protéines dans une base de données dont les séquences sont inversées, résultant à un taux de faux positifs de moins de 1%. Un minimum de 2 peptides a été quantifié pour chaque protéine. Les isoformes provenant d'épissage alternatif, ainsi que les protéines qui ne peuvent pas être distinguées basé sur les peptides identifiés ont été regroupées et affichées sur une seule ligne avec plusieurs numéros d'accès. (Drissi *et al.*, 2015; Cox et Mann, 2008; Cox *et al.*, 2009)

III. RÉSULTATS

3.1 La forme clivée du récepteur NOTCH1, NIC1, subit des modifications post-traductionnelles.

Pour étudier les mécanismes de façon temporelle dans les cellules pancréatiques tumorales humaines, il est possible d'activer de façon synchronisée la voie NOTCH via un traitement à l'EGTA. Étant donné que le récepteur NOTCH1 est composé de deux sous-unités retenues ensemble par des interactions non-covalentes calcium-dépendantes, la déplétion en calcium déstabilise le récepteur et mène à son activation par clivage protéolytique (Rand *et al.*, 2000). Dans le laboratoire, il a été observé que l'EGTA/activation de NOTCH1 amène une augmentation de l'expression de ses gènes cibles tels qu'Hes1, c-Myc et Cycline D1 (Figure 6) (Tremblay *et al.*, 2013). D'autant plus intéressant, nous avons remarqué, suite au clivage de NOTCH1, que le fragment NIC1 se retrouvait sous différents poids moléculaires suggérant des modifications post-traductionnelles s'effectuant sur NIC1 suite à sa libération (Figure 6). Des essais phosphatases *in vitro* ont permis de postuler qu'il s'agissait de différentes formes phosphorylées de NIC1 (Figure 8).

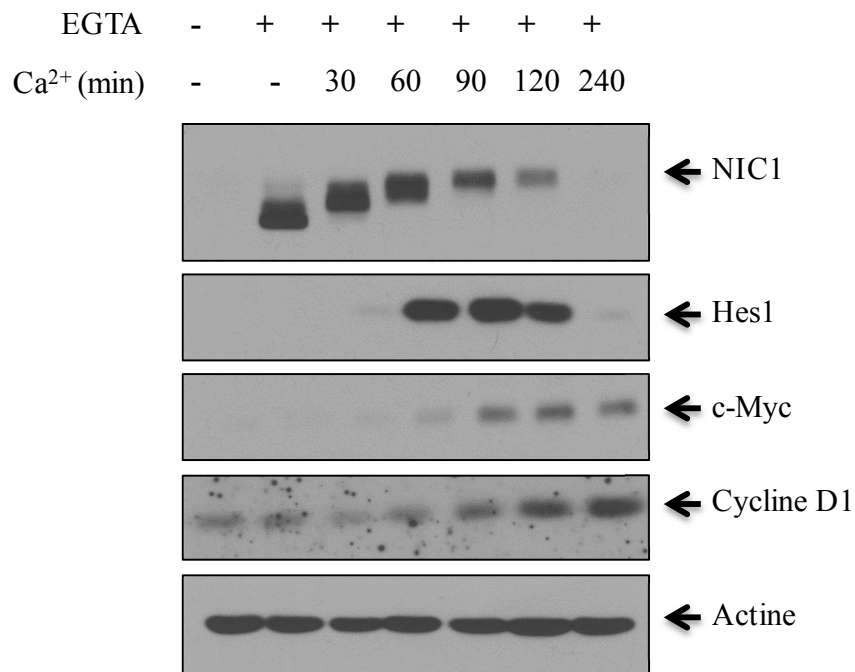


Figure 6. L'EGTA mène à l'activation massive et synchronisée du récepteur NOTCH1 dans les cellules pancréatiques tumorales humaines.

Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées (+) ou non (-) à l'EGTA pendant 15min avant d'être remis dans du milieu DMEM contenant du calcium pour la période de temps indiquée. L'activation du récepteur NOTCH1 a été évaluée via l'expression de la forme clivée, NIC1, par immunobuvardage (IB) en utilisant un anticorps dirigé contre NIC1. L'expression des gènes cibles de NIC1 a été sondée par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques. L'actine a servi de protéine référence. (n=3)

3.2 Notch1ΔE est une forme tronquée de Notch1, constitutivement activée par clivage via le complexe gamma-sécrétase, et mène à l'expression de NIC1.

Afin de surexprimer le récepteur Notch1 dans les cellules MIA PaCa-2, nous avons utilisé la construction Notch1ΔE-myc codant pour une forme tronquée du récepteur Notch1 murin et constitutivement activée. L'expression du Notch1ΔE dans les MIA PaCa-2 mène à l'expression de la forme tronquée et active de Notch1 soit NIC1 (Figure 7). Pour s'assurer que Notch1ΔE était clivé par le complexe gamma-sécrétase, les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées au DAPT, un inhibiteur de gamma-sécrétase (Li *et al.*, 2012). Suite au traitement avec l'inhibiteur de gamma-sécrétase, il y a une perte de l'expression de NIC1,

suggérant que le DAPT prévient le clivage et l'activation du Notch1 Δ E dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. Par contre, le traitement au DAPT ne semble pas affecter de façon marquée les niveaux d'expression du Notch1 Δ E-myc (Figure 7).

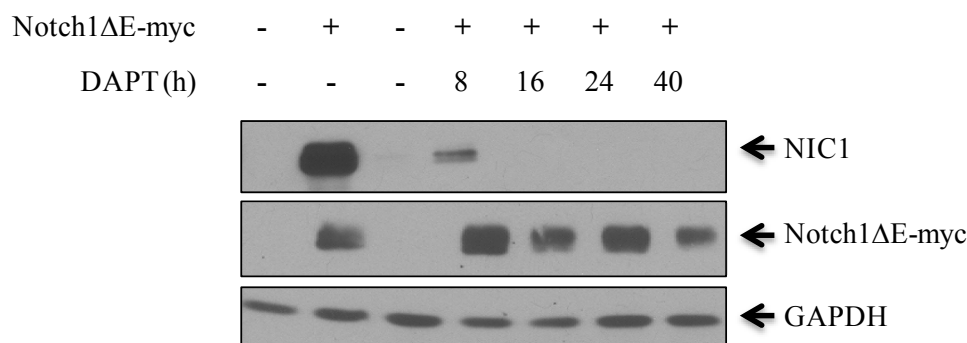


Figure 7. Le traitement avec l'inhibiteur du complexe γ -sécrétase DAPT prévient le clivage et l'activation du récepteur Notch1 Δ E dans les cellules pancréatiques tumorales humaines.

Les cellules MIA PaCa-2 ont été transfectées avec une construction Notch1 Δ E étiquetée myc. Le lendemain, les cellules ont été traitées ou non avec l'inhibiteur de γ -sécrétase (DAPT, 25 μ M) pendant la période de temps indiquée. L'expression de NIC1 a été sondée par immunobuvardage (IB) à l'aide de l'anticorps dirigé contre NIC1 et l'expression de Notch1 Δ E a été sondée par IB à l'aide de l'anticorps dirigé contre myc. La GAPDH a servi de protéine référence. (n=3)

3.3 NIC1 subit des modifications post-traductionnelles incluant la phosphorylation et s'associe à son partenaire transcriptionnel MAML1 dans les cellules pancréatiques tumorales humaines.

Afin de déterminer si le NIC1 exogène subissait aussi des modifications post-traductionnelles, nous avons procédé à des essais phosphatases *in vitro*. On observe que la forme immunoprécipitée du NIC1 exogène ainsi que du NIC1 endogène traitée à la lambda phosphatase migre plus rapidement sur gel SDS-PAGE que celle non-traitée (Figure 8). Ces résultats suggèrent qu'au même titre que le NIC1 humain endogène, le NIC1 murin exogène est une protéine phosphorylée. Suivant les essais phosphatases *in vitro*, nous avons vérifié que le NIC1 murin exogène était capable de s'associer à des partenaires

d'interaction connus de NOTCH1. Ainsi, nous avons sondé la présence de MAML1 par immunobuvardage, ce qui nous a permis de confirmer l'association de NIC1 humain endogène et de NIC1 murin exogène avec son partenaire transcriptionnel MAML1 (Figure 8).

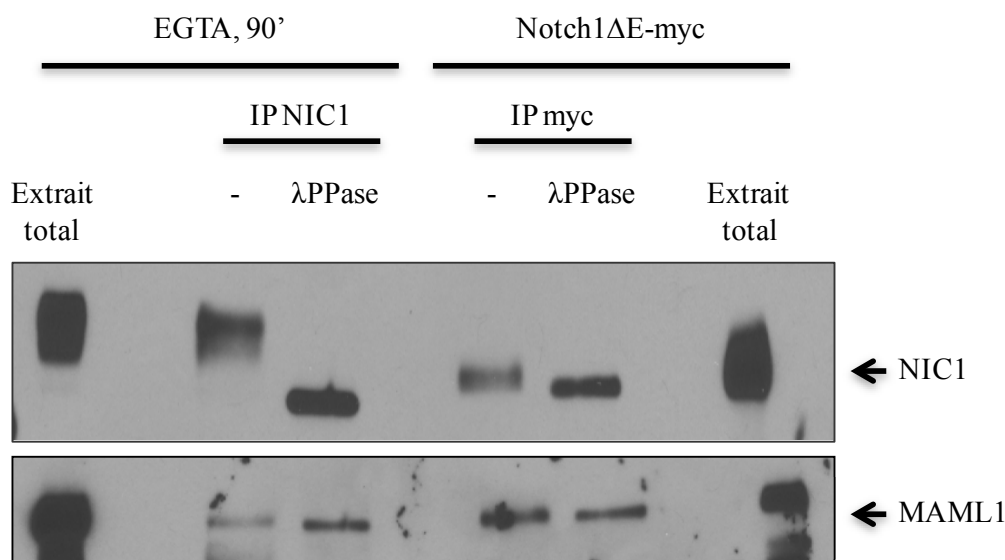


Figure 8. Des essais phosphatases *in vitro* démontrent que NIC1 est une protéine phosphorylée.

Les cellules MIA PaCa-2 ont été traitées à l'EGTA puis remis dans du milieu avec calcium pendant 90min (EGTA, 90'; gauche) ou transfectées avec Notch1ΔE-myc (droite). NIC1 a été immunoprécipité (IP) à l'aide d'un anticorps anti-NIC1 ou anti-myc. Les IP ont été séparés en deux et la lambda phosphatase (λ PPase) a été ajoutée à un seul des deux IP. Suivant l'essai phosphatase, l'expression de NIC1 et MAML1 a été sondée par IB. (n=3)

3.4 Les analyses par spectrométrie de masse suggèrent l'interaction du NIC1 murin avec des protéines du complexe médiateur.

Après avoir démontré que le NIC1 murin exogène est une protéine phosphorylée et qu'il s'associe à son partenaire d'interaction connu MAML1, nous avons procédé à des analyses par spectrométrie de masse dans le but d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction de NIC1. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche de protéomique quantitative, la méthode SILAC. Les cellules MIA PaCa-2 ont donc été cultivées en milieu

SILAC et transfectées avec la construction Notch1 Δ E-myc. Notch1 Δ E a été immunoprécipité à l'aide de l'anticorps dirigé contre myc. Nous avons ensuite comparé les immunoprécipitats non-transfectés (milieu léger) aux immunoprécipitats Notch1 Δ E (milieu moyen). Ce design expérimental nous permet de faire la discrimination entre les interactions spécifiques et les protéines contaminantes (Figure 9). D'abord, nous avons pu confirmer la présence de NOTCH1 dans les échantillons analysés, ainsi que la présence de partenaires d'interaction connus, p300 et MAML1. De façon plus novatrice, les analyses par spectrométrie de masse suggèrent l'interaction possible entre le NIC1 murin exogène et plusieurs membres du complexe médiateur. Nos analyses suggèrent également de possibles interactions avec des protéines ayant des fonctions de transcription et d'ubiquitination/sumoylation (Tableau 6).

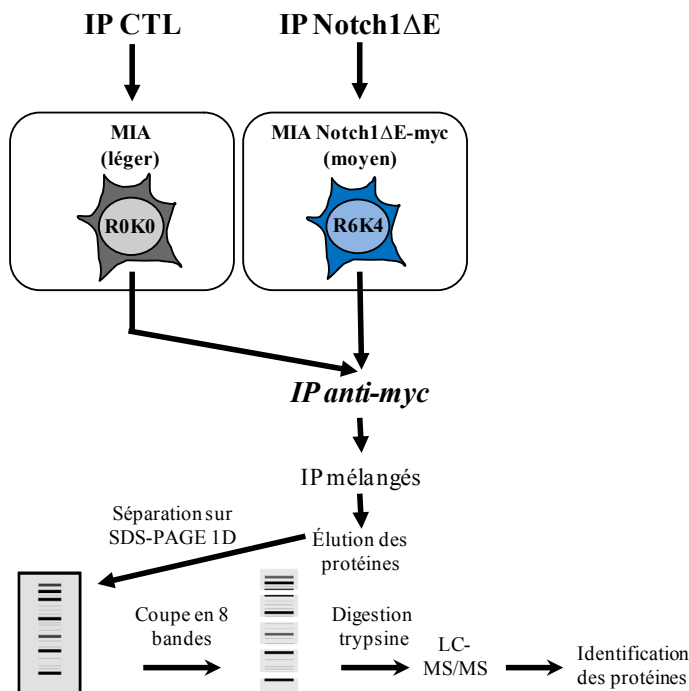


Figure 9. Design expérimental, double immunoprécipitation en milieu SILAC: Notch1ΔE.

À partir des cellules MIA PaCa-2 (MIA) cultivées en milieu SILAC et transfectées transitoirement ou non avec Notch1ΔE, les immunoprécipitats anti-myc des cellules non-transfectées (milieu léger) ont été comparés aux immunoprécipitats anti-myc des cellules transfectées Notch1ΔE (milieu moyen). (n=1)

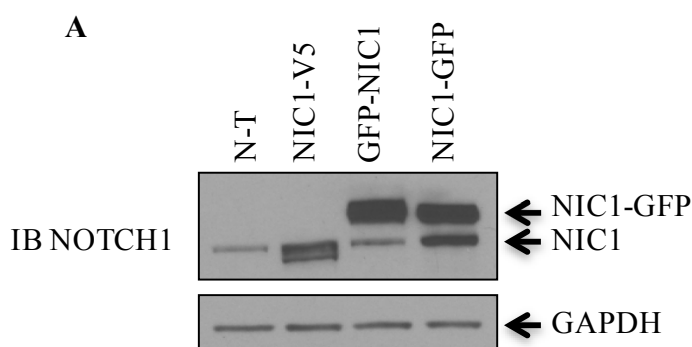
Partenaires d'interaction connus	<u>Nom des protéines</u>	<u>Nom des gènes</u>	<u>Peptides</u>
	Neurogenic locus notch homolog protein 1	<i>NOTCH1</i>	22
	Mastermind-like protein 1	<i>MAML1</i>	2
	Histone acetyltransferase p300	<i>P300</i>	35
	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A	<i>DYRK1A</i>	6
Nouveaux partenaires d'interaction	<u>Fonction</u>	<u>Protéines identifiées</u>	<u>Peptides</u>
	Transcription; Complexe médiateur	MED1, MED10, MED11, MED12, MED13, MED15, MED17, MED21, MED23, MED24	3, 5, 3, 19, 13, 10, 6, 3, 5, 5
	Transcription	CBP, TRAM1, TCF20, GCN1L1, ATRX, CAND1, CARM1	22, 3, 9, 5, 4, 6, 12
	Ubiquitination/Sumoylation	UBA1, HERC2, NICE4, USPL1, BAT2D1	7, 2, 17, 2, 30

Tableau 6. Partenaires d'interaction de Notch1ΔE identifiés par spectrométrie de masse.

Les cellules MIA PaCa-2 cultivées dans du milieu SILAC ont été transfectées ou non avec Notch1ΔE. Trente-six heures plus tard, les cellules ont été lysées et Notch1ΔE a été immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-myc. Les IP ont été séparés sur gel SDS-PAGE et les protéines ont été digérées à la trypsine avant d'être analysées par spectrométrie de masse.

3.5 NIC1-GFP est majoritairement localisé au noyau, où il peut s'associer à l'ARN polymérase II.

Dans le but d'améliorer notre modèle d'étude, nous avons généré les constructions codantes pour un NIC1 humain avec une étiquette GFP. Suite à des transfections transitoires dans les cellules HEK293T, nous avons validé l'expression de NIC1 étiqueté GFP par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps dirigé contre NOTCH1 (Figure 10A). À noter qu'il a été possible d'exprimer un NIC1 avec une étiquette GFP en C-terminal ou N-terminal de la protéine. Ensuite, pour vérifier que le NIC1-GFP se retrouvait bien exprimé au noyau, nous avons procédé à des analyses par microscopie à fluorescence. Nous avons observé que l'expression du GFP en vert, représentant NIC1-GFP, co-localisait avec les noyaux cellulaires colorés en bleu grâce au DAPI (Figure 10B). Nous avons également procédé à des fractionnements cellulaires, pour analyser la distribution de l'expression de NIC1-GFP dans les cellules HEK293T par immunobuvardage (Figure 10C). On observe que NIC1-GFP est davantage retrouvé dans les fractions nucléaires (S3, P3) que dans la fraction cytosolique (S2). Pour s'assurer que l'étiquette GFP n'interférerait pas avec les interactions protéiques, l'association de NIC1-GFP avec un partenaire connu de NIC1 a été testée par co-immunoprécipitation. Pour ce faire, NIC1-GFP a été immunoprécipité à l'aide des billes d'agarose GFP_TRAP[®]_A. L'expression de CSL a été analysée par immunobuvardage, ce qui nous a permis de montrer l'association de NIC1-GFP avec son partenaire transcriptionnel CSL particulièrement dans le compartiment nucléaire (Figure 10C).



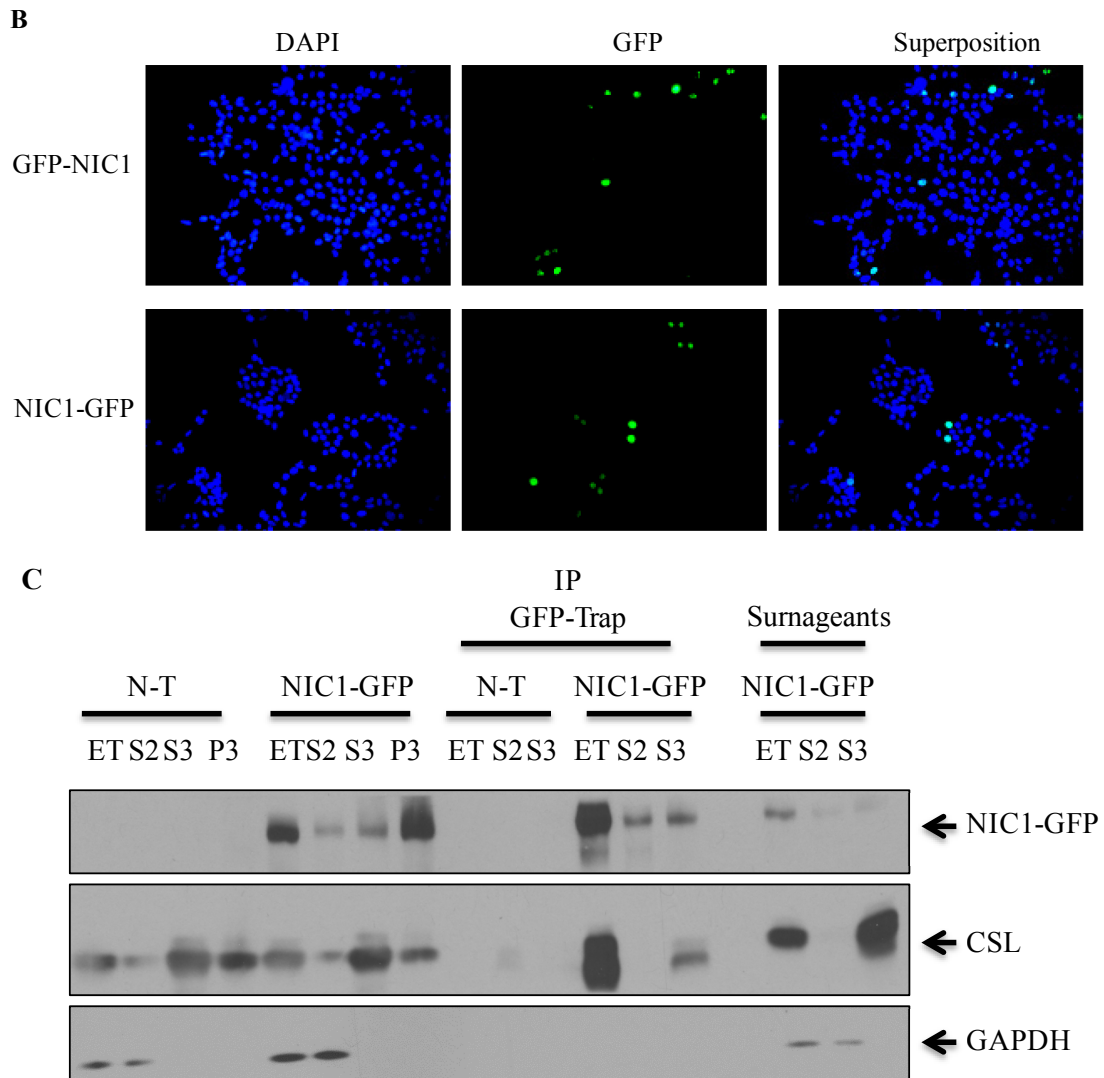


Figure 10. NIC1 nucléaire s'associe à son partenaire transcriptionnel CSL dans les cellules HEK293T.

(A) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec NIC1-V5, GFP-NIC1 ou NIC1-GFP. Les cellules ont été lysées 36h suivant la transfection. L'expression de NIC1 a été évaluée par immunobuvardage en utilisant un anticorps spécifique. (B) Les cellules HEK293T ont été ensemencées sur lamelle. Vingt-quatre heures suivant l'ensemencement, les cellules HEK293T ont été transfectées avec GFP-NIC1 ou NIC1-GFP. Vingt-quatre heures suivant la transfection, les cellules ont été fixées au PFA 2%. La localisation cellulaire du GFP-NIC1 et du NIC1-GFP a été analysée par microscopie à fluorescence. Les noyaux ont été colorés au DAPI. (C) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec NIC1-GFP. Vingt-quatre heures suivant la transfection, des extraits cytosoliques et nucléaires ont été préparés. NIC1 exogène a été immunoprécipité (IP) à l'aide du GFP-Trap. Suivant l'IP, l'expression de NIC1-GFP et de CSL a été évaluée par immunobuvardage. ET : Extrait total, S2 : fraction cytosolique, S3 : fraction nucléaire et P3 : fraction nucléaire insoluble (A, B, n=3, C n=4)

Par la suite, nous avons voulu vérifier que NIC1-GFP était capable de s'associer à la machinerie transcriptionnelle de base. Plus précisément, l'association de NIC1-GFP avec Rpb1 CTD, la plus grosse sous-unité de l'ARN polymérase II, a été testée par co-immunoprécipitation. Pour ce faire, NIC1-GFP a été immunoprécipité à partir de la fraction cytosolique ou nucléaire à l'aide des billes d'agarose GFP-Trap. L'expression de Rpb1 a été analysée par immunobuvardage, ce qui nous a permis de montrer l'association de NIC1-GFP avec Rpb1 dans la fraction nucléaire (Figure 11). En résumé, ces résultats nous ont permis de montrer que NIC1-GFP était principalement localisé au noyau où il s'associait avec son partenaire transcriptionnel CSL ainsi qu'avec l'ARN polymérase II.

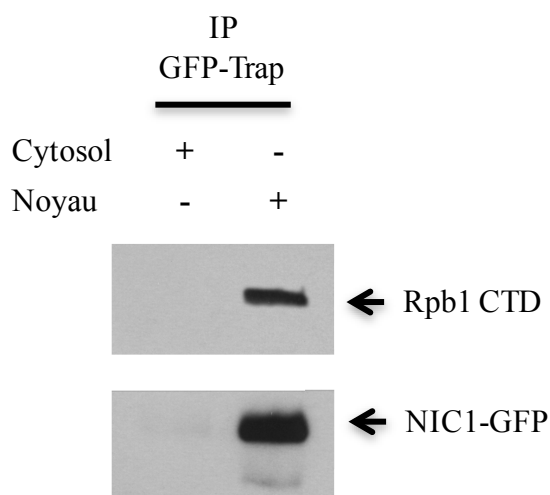


Figure 11. NIC1 nucléaire s'associe avec Rpb1 CTD, une sous-unité de l'ARN polymérase II.

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec NIC1-GFP. Vingt-quatre heures suivant la transfection, des extraits cytosoliques et nucléaires ont été préparés. NIC1 exogène a été immunoprécipité à l'aide du GFP-Trap. Suivant l'IP, l'expression de NIC1-GFP et Rpb1 CTD a été évaluée par IB. (n=3)

3.6 NIC1-GFP est une protéine de courte demi-vie et dégradée par le protéasome.

Il y a un concept vérifié et établi selon lequel NIC1 est une protéine de courte demi-vie. Plus précisément, l'expression d'un NIC1 nouvellement clivé est complètement disparue environ après 4h (Andersson *et al.*, 2011). De plus, il y a des évidences que NIC1

est régulé par l'ubiquitination, entre autres, assurée par FBW7, et dégradé par le protéasome (Fryer *et al.*, 2004). Pour vérifier que ces concepts s'appliquaient à notre modèle de NIC1-GFP, nous avons traité les cellules HEK293T transfectées NIC1-GFP au cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique. En parallèle, nous avons traité les cellules HEK293T transfectées NIC1-GFP avec le MG132, un inhibiteur du protéasome. Suivant le traitement au cycloheximide, nous avons observé une diminution de l'expression de NIC1-GFP après 4h de traitement, suggérant que le NIC1-GFP nouvellement synthétisé est disparu après 4h (Figure 12). Suivant le traitement au MG132, on observe une accumulation de NIC1-GFP dans le temps, suggérant que NIC1-GFP est dégradé par le protéasome (Figure 12). Au terme de ces expériences, nos résultats confirment que le NIC1-GFP est une protéine de courte demi-vie et dégradée par le protéasome.

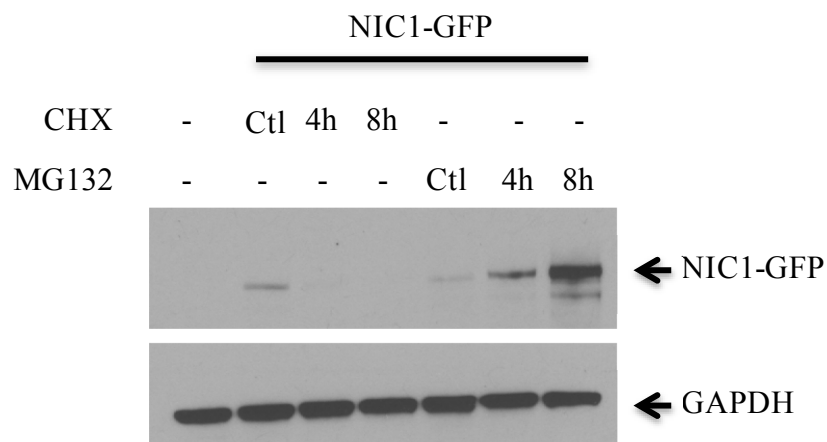


Figure 12. NIC1-GFP a une courte demi-vie et est dégradé par le protéasome dans les HEK293T.

Les cellules HEK293T ont été ensemencées dans un pétri 100mm et transfectées avec NIC1-GFP. Vingt-quatre heures suivant la transfection, les cellules ont été passées dans des pétris 35mm. Vingt-quatre heures suivant le passage, les cellules ont été traitées pendant 4 et 8 heures au cycloheximide (CHX) 25 μ g/ml ou au MG132 10 μ M. L'expression de NIC1-GFP a été sondée par immunobuvardage à l'aide de l'anticorps dirigé contre GFP. La GAPDH a servi de protéine référence. (n=3)

3.7 Les 4 résidus sérine ne semblent pas être des sites de phosphorylation essentiels à la localisation cellulaire de NIC1.

Il y a des évidences que la stabilité de NIC1 est régulée, entre autres, par la phosphorylation (Fryer *et al.*, 2004 et Choi *et al.*, 2013). Plus particulièrement, NIC1 possède une séquence PEST riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine. Cette séquence d'acides aminés sert de substrat pour la phosphorylation ce qui marque la protéine pour la dégradation (Palermo *et al.*, 2014). À l'aide du logiciel NetPhos 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/ et www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/), nous avons procédé à des analyses bioinformatiques visant à identifier des résidus hautement susceptibles d'être phosphorylés et nous avons choisi d'étudier quatre sites potentiels de phosphorylation de NIC1, soit les sites S2521, S2522, S2523 et S2524 (Blom *et al.*, 1999; Bloom *et al.*, 2004). Pour ce faire, nous avons travaillé avec les mutants ponctuels NIC1 S2521-24A-GFP et NIC1 S2524D-GFP, où les quatre sérines 2521-24 ont été mutées en alanine et, où la sérine 2524 a été mutée en acide aspartique (Figure 13).

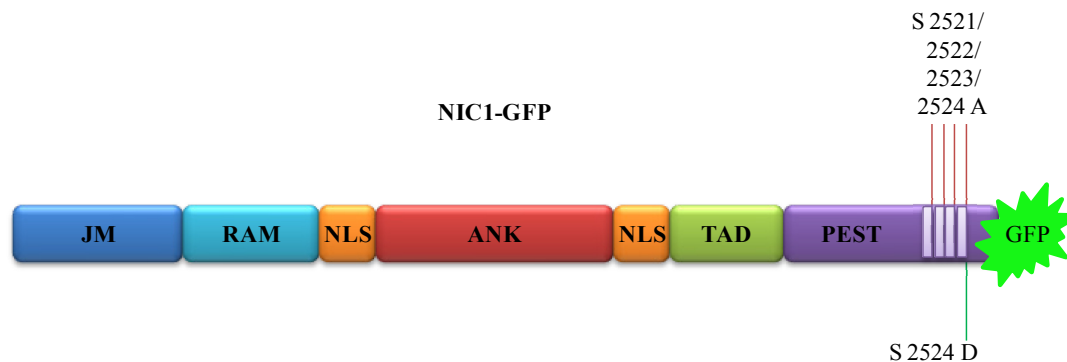


Figure 13. Représentation des mutants ponctuels de NIC1.

Représentation des domaines structuraux de NIC1 ainsi que la localisation des mutations ponctuelles et de l'étiquette GFP.

Tout d'abord, nous avons procédé à des fractionnements cellulaires pour pouvoir analyser la distribution cellulaire des mutants ponctuels de NIC1 dans les cellules HEK293T par immunobuvardage (Figure 14A). Notamment, on observe que NIC1 S2521-24A-GFP et NIC1 S2524D-GFP sont surtout localisés dans la fraction chromatine au même

titre que le NIC1 WT-GFP (Figure 14A). Nous avons aussi rapporté la distribution relative de NIC1-GFP en pourcentage dans un histogramme (Figure 14B). Bien que nous observons que le mutant NIC1 S2524D-GFP est distribué à 40% dans la fraction chromatine comparativement au NIC1 WT-GFP qui s'y retrouve à 62% (Figure 14B), il nous est impossible de conclure avec certitude qu'il y a là une différence marquée, puisqu'il s'agit de résultats préliminaires. Ainsi, en considérant que les mutants S2521-24A (52%) et S2524D (40%), ainsi que le NIC1 de type sauvage (62%) se retrouvent tous majoritairement dans la fraction chromatine, nous concluons que le statut de phosphorylation des résidus S2521-24 ne semblent pas influencer la localisation cellulaire de NIC1.

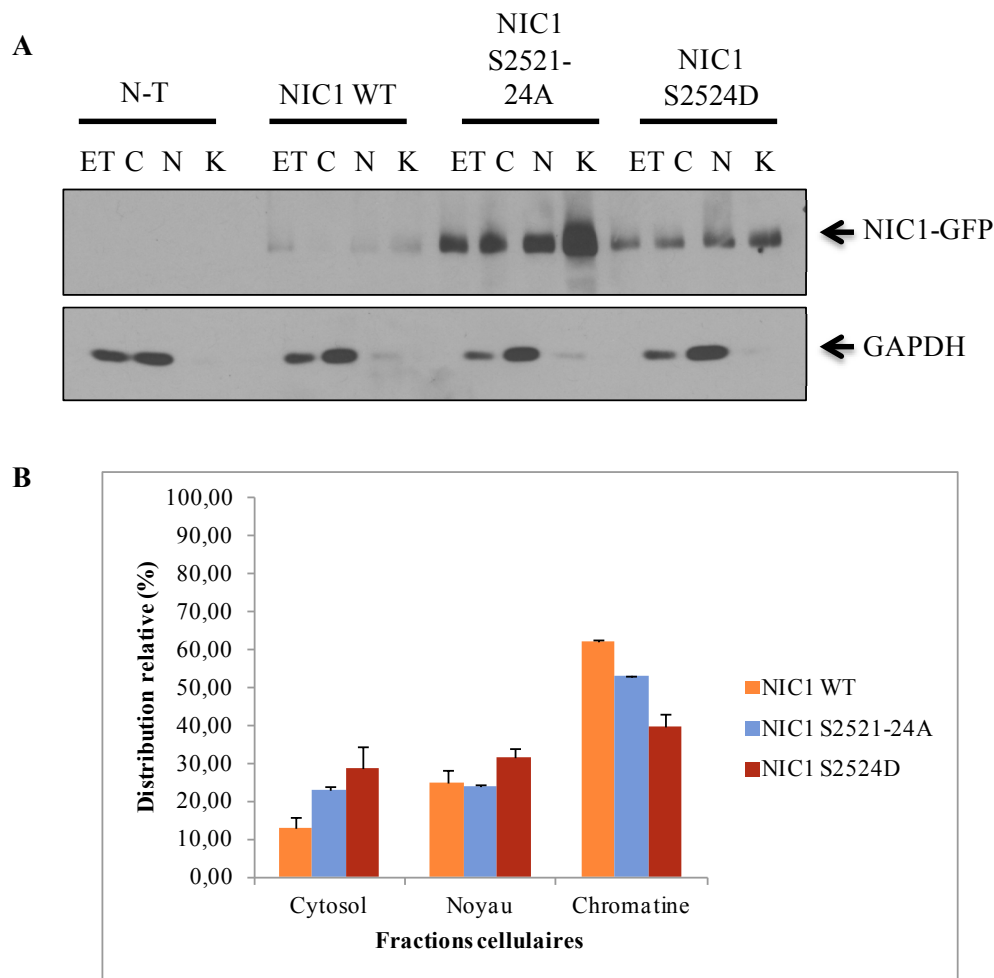


Figure 14. NIC1 WT, S2521-24A et S2524D sont localisés dans la fraction chromatine.
(A) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec NIC1 WT-GFP, NIC1 S2521-24A-GFP ou NIC1 S2524D-GFP. Vingt-quatre heures suivant la transfection, les cellules ont été fractionnées en 3 fractions: cytosol, noyau et chromatine. L'expression de NIC1-GFP a été évaluée par immunobuvardage. La GAPDH a servi de protéine cytosolique référence.
(B) Histogramme de la distribution relative de NIC1-GFP (%) dans les fractions cytosol, noyau et chromatine. La somme des niveaux d'expression de chacun des NIC1-GFP (WT et mutants) dans chaque fraction a été fixée à 100%. (n=2)

3.8 Les sérines 2521-24 de NIC1 ne semblent pas influencer la formation du complexe NIC1/CSL/MAML1.

Sachant que les mutants ponctuels de NIC1 se retrouvaient dans la même fraction cellulaire que le NIC1 de type sauvage (WT), nous avons étudié la capacité des mutants NIC1 à interagir avec CSL et MAML1 comparativement au NIC1 WT. Pour ce faire, nous avons co-transfectés CSL-Flag, MAML1-V5 et NIC1 WT-GFP, NIC1 S2521-24A-GFP ou NIC1 S2524D-GFP dans les cellules HEK293T. Par la suite, des niveaux comparables de CSL-Flag ont été immunoprécipités à l'aide de l'anticorps dirigé contre Flag afin de tester l'association avec MAML1-V5 et NIC1-GFP. On observe l'association NIC1/CSL/MAML1 que ce soit en présence du NIC1 de type sauvage et des mutants ponctuels de NIC1 (Figure 15). Néanmoins, on remarque une légère diminution de l'association entre CSL et le mutant NIC1-S2524D comparativement au NIC1 de type sauvage.

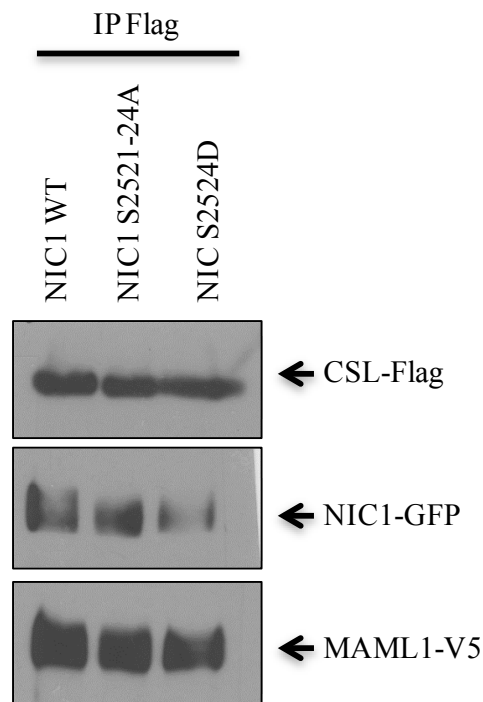


Figure 15. Association de NIC1 WT, S2521-24A et S2524D à CSL et MAML1 dans les HEK293T.

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec CSL-Flag, MAML1-V5 et NIC1 WT-GFP, NIC1 S2521-24A-GFP ou NIC1 S2524D-GFP. CSL a été immunoprécipité avec l'anticorps dirigé contre Flag. Suivant l'IP, l'expression de CSL, NIC1 et MAML1 a été analysée par IB en utilisant des anticorps spécifiques. (n=1, résultats préliminaires)

3.9 Les sérines 2521-24 ne semblent pas être des sites de phosphorylation essentiels à l'activité transcriptionnelle de NIC1.

Il a précédemment été montré que des modifications post-traductionnelles sur des résidus spécifiques de NIC1 pouvaient augmenter (Han *et al.*, 2012) ou diminuer (Kim *et al.*, 2007) l'activité transcriptionnelle de NIC1. De plus, nous avons observé une légère diminution de l'association entre CSL et le mutant NIC1 S2524D comparativement au NIC1 WT. Pour étudier l'effet des mutations de ces quatre résidus sérines (S2521-24A) en alanine ou de la mutation du résidu sérine (S2524D) en acide aspartique sur l'activité transcriptionnelle de NIC1, les cellules HEK293T ont été transfectées avec une construction du gène rapporteur CSL-4X-Luc et NIC1 WT-GFP, NIC1 S2521-24A-GFP ou

NIC1 S2524D-GFP avant d'être soumis à des essais luciférase. À première vue, nous observons que l'activité luciférase relative des mutants ponctuels de NIC1 est comparable à l'activité luciférase relative du NIC1 de type sauvage (Figure 16). Néanmoins, on observe une légère diminution de l'activité luciférase relative des mutants NIC1 S2521-24A-GFP (18%) et NIC1 S2524D-GFP (8,8%) comparativement au NIC1 de type sauvage (Figure 16). De plus, on remarque que l'activité luciférase relative du mutant NIC1 S2521-24A est légèrement plus faible (9,2%) que celle du mutant NIC1 S2524D (Figure 16). Cependant, il s'agit de résultats préliminaires et ces expériences devront être répétées. Sous toutes réserves, nous concluons que les quatre résidus sérines ne semblent pas affecter l'activité transcriptionnelle de NIC1.

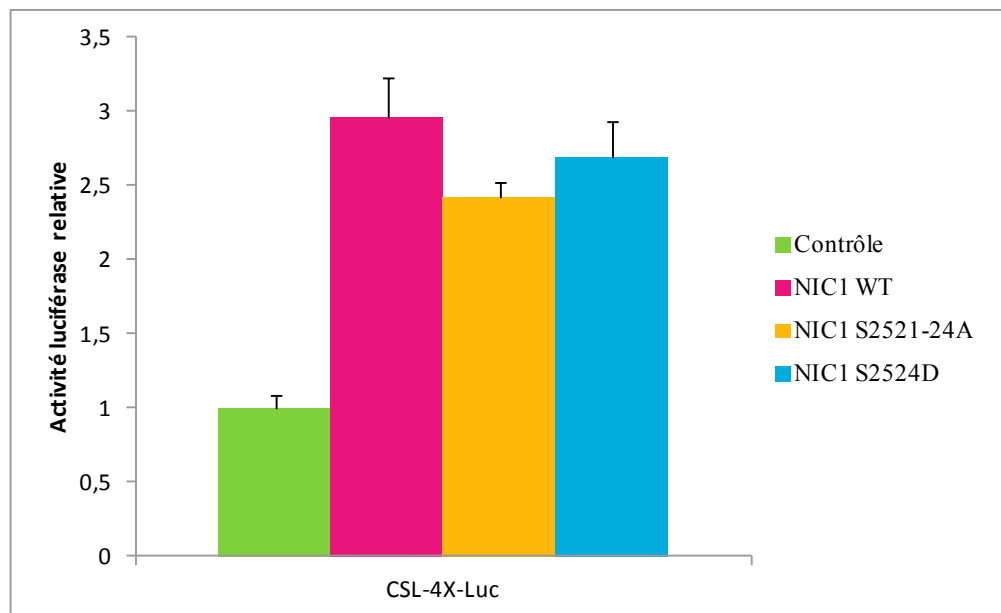


Figure 16. L'activité transcriptionnelle de NIC1 n'est pas modulée par la mutation des sites potentiels de phosphorylation S2521, 22, 23, 24.

Les cellules HEK293T ont étéensemencées en plaques 24 puits et cultivées pendant 24h. Les cellules ont été transfectées avec 200ng du gène rapporteur CSL-4X-Luc, 0,5ng de luciférase de *Renilla* et 200ng de NIC1 WT-GFP, NIC1 S2521-24A-GFP ou NIC1 S2524D-GFP. Vingt-quatre heures suivant la transfection, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été dosée au luminomètre. Les valeurs d'activité luciférase relative sont exprimées selon le ratio de l'activité luciférase de la mouche à feu (CSL-4X-Luc) et de l'activité luciférase de la *Renilla*. Le ratio contrôle CSL-4X-luciférase/*Renilla* luciférase dans les cellules transfectées avec le vecteur vide (pDEST47) a été établi à 1. (n=2)

3.10 Génération d'une lignée cellulaire stable U2OS Flp-InTM T-REXTM NIC1-GFP permettant l'expression contrôlée de NIC1.

Dans le but d'avoir un modèle cellulaire dont les niveaux d'expression de NIC1-GFP se rapprochent davantage des niveaux d'expression d'un NIC1 endogène, nous avons généré la lignée cellulaire stable U2OS Flp-InTM T-REXTM (FT) NIC1-GFP. Cette lignée cellulaire a été générée en utilisant la construction NIC1-GFP par recombinaison flp-in dans les cellules U2OS FT afin d'avoir un site unique d'intégration. L'avantage de ce modèle est que l'expression de notre gène d'intérêt est inductible à la doxycycline, permettant l'expression contrôlée de NIC1-GFP. Afin de valider notre modèle, NIC1-GFP a été immunoprécipité à l'aide des billes d'agarose GFP-Trap ou d'un anticorps dirigé contre NOTCH1. Suivant l'immunoprécipitation GFP-Trap, l'expression du NIC1-GFP a été validée par immunobuvardage à l'aide de l'anticorps dirigé contre NIC1. De la même manière, suivant l'immunoprécipitation NOTCH1, l'expression de NIC1-GFP a été validée par immunobuvardage à l'aide de l'anticorps dirigé contre GFP (Figure 17A). Afin de vérifier que le NIC1-GFP pouvait subir des modifications post-traductionnelles dans notre modèle, nous avons procédé à un essai phosphatase *in vitro*. On observe que la forme immunoprécipitée du NIC1-GFP traité à la lambda phosphatase migre plus rapidement sur gel SDS-PAGE que celle non-traitée (Figure 17B). Ces résultats suggèrent que le NIC1-GFP est une protéine phosphorylée dans les cellules U2OS FT. Afin de vérifier si le NIC1-GFP était capable de s'associer à des partenaires d'interaction connus, nous avons immunoprécipité NIC1-GFP à l'aide des billes d'agarose GFP-Trap et nous avons validé l'expression de CSL par immunobuvardage (Figure 17C). Ce résultat nous a permis de montrer l'association de NIC1-GFP avec son partenaire CSL dans les cellules U2OS FT. En somme, ces résultats nous ont permis de valider notre modèle où le NIC1-GFP se comporte de façon semblable au NIC1 endogène.

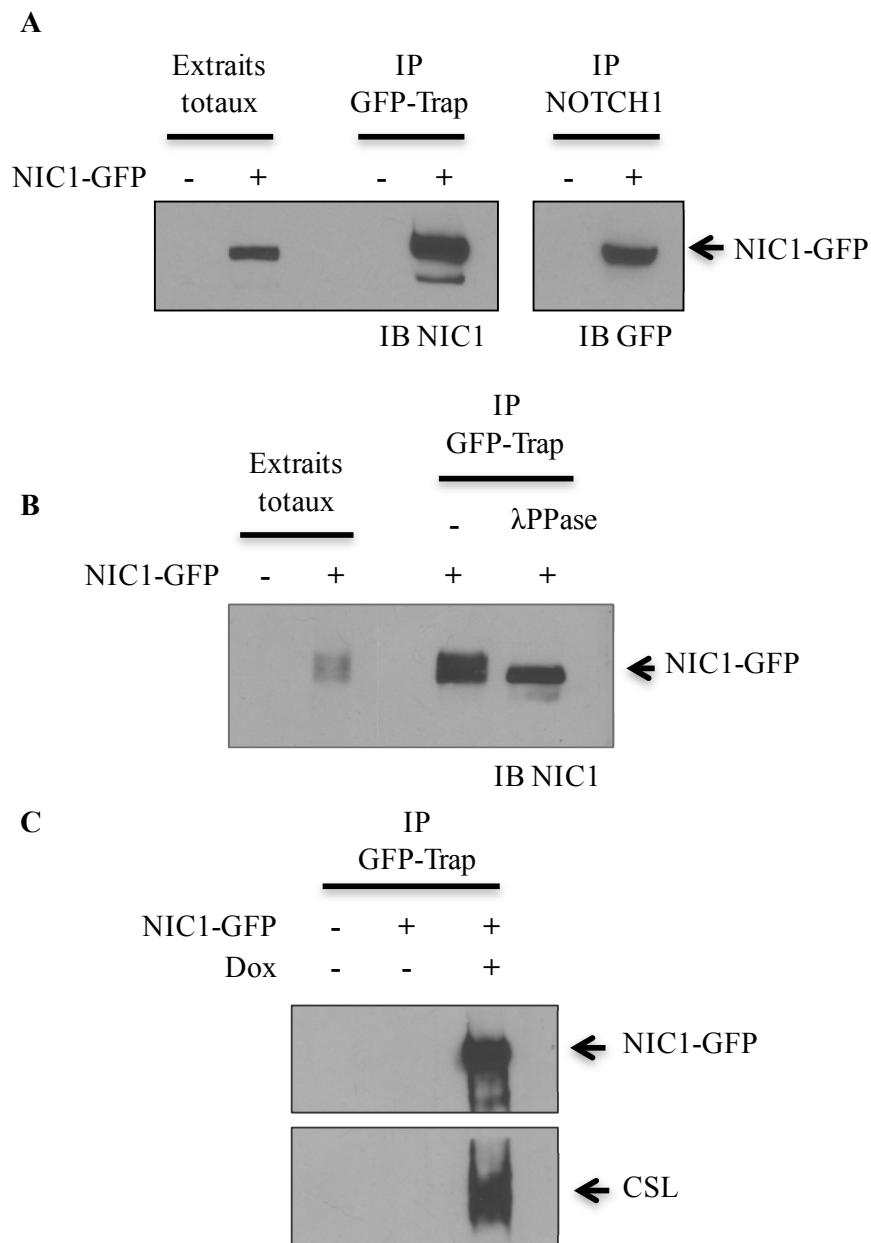


Figure 17. La population U2OS Flp-InTM T-REXTM NIC1-GFP exprime un NIC1 se comportant de façon semblable à la protéine endogène.

Les cellules U2OS Flp-InTM T-REXTM ont été transfectées avec une construction NIC1-GFP puis la population stable a été sélectionnée à l'aide de l'hygromycine B (0,15mg/mL) et induite à la doxycycline (Dox). (A) NIC1-GFP a été immunoprécipité à l'aide du GFP-Trap ou d'un anticorps anti-NOTCH1. L'expression du NIC1-GFP a été évaluée par IB à l'aide d'anticorps anti-NIC1 et anti-GFP respectivement. (B) NIC1-GFP a été immunoprécipité à l'aide du GFP-Trap. L'IP a été séparé en deux et la λPPase a été ajoutée à une seule des 2 fractions. Suivant l'essai phosphatase *in vitro*, l'expression de NIC1 a été sondée par IB. (C) NIC1-GFP a été immunoprécipité à l'aide du GFP-Trap. L'expression de NIC1-GFP et de CSL a été sondée par IB avec des anticorps spécifiques. (A,B, C n=3)

3.11 L'analyse par spectrométrie de masse des partenaires d'interaction de NIC1-GFP révèle plusieurs classes fonctionnelles de protéines.

Après avoir validé notre nouveau modèle cellulaire, U2OS Flp-InTM T-REXTM NIC1-GFP, nous avons de nouveau procédé à des analyses par spectrométrie de masse, toujours dans le but d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction de NIC1 humain. Comme décrit dans la section 3.4, nous avons utilisé une approche de protéomique quantitative, la méthode SILAC. Les cellules U2OS Flp-InTM T-REXTM NIC1-GFP ont donc été cultivées en milieu SILAC et NIC1-GFP a été immunoprécipité à l'aide des billes d'agarose GFP-Trap. Nous avons ensuite comparé les immunoprécipitats GFP-Trap des cellules U2OS FT NIC1-GFP non-induits (milieu léger) aux immunoprécipitats GFP-Trap des cellules traitées à la Doxycycline (milieu moyen). Comme mentionné précédemment, ce design expérimental nous permet de faire la discrimination entre les interactions spécifiques et les contaminants (Figure 18). Afin de visualiser les partenaires d'interaction de NIC1 identifiés par spectrométrie de masse, les données ont été représentées dans un graphique du Log de l'intensité des peptides en fonction du ratio SILAC (i.e. moyen(M)/léger(L)) (Figure 19). Seules les protéines ayant un ratio d'enrichissement IP/contrôle (ratio M/L) d'une valeur de 2,0 et plus ont été analysées. Sur les 539 protéines identifiées, 97 protéines avaient un ratio d'enrichissement supérieur à 2,0. Ces analyses nous ont permis d'identifier les membres du complexe tertiaire NIC1/CSL/MAML1 (Figure 19 et Tableau 7), suggérant que NIC1-GFP est capable de former un complexe transcriptionnel fonctionnel. Les 97 protéines ayant un ratio d'enrichissement supérieur à 2,0 ont été regroupées en 12 classes fonctionnelles (Figure 20) à l'aide du logiciel DAVID (david.ncifcrf.gov) en utilisant le module *Functional Annotation Clustering* (Huang *et al.*, 2009). De manière intéressante, la classe fonctionnelle la plus volumineuse est celle de la régulation transcriptionnelle. En effet, elle regroupe 16 protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle, que ce soit des enzymes (acétyltransférase) ou des cofacteurs (Tableau 7). Enfin, une autre classe fonctionnelle intéressante est celle de la dégradation protéique puisqu'elle regroupe des protéines impliquées dans l'ubiquitination/sumoylation. En effet, la protéine NIC1 est sujette à des modifications post-traductionnelles incluant l'ubiquitination régulant sa dégradation par la voie du protéasome (Figure 12).

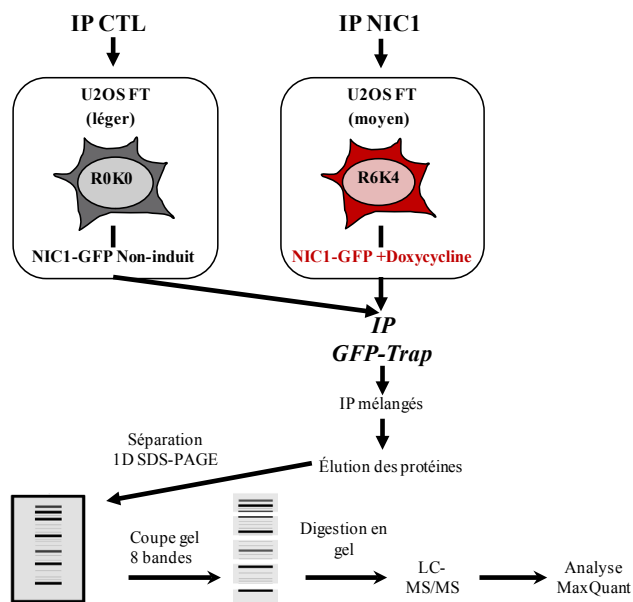


Figure 18. Design expérimental, double immunoprécipitation en milieu SILAC: NIC1-GFP.

À partir des cellules U2OS Flp-InTM T-REXTM NIC1-GFP cultivées en milieu SILAC, les immunoprécipitats GFP-Trap des cellules non-induites (milieu léger) ont été comparés aux immunoprécipitats GFP-Trap des cellules induites à la doxycycline (milieu moyen). (n=2)

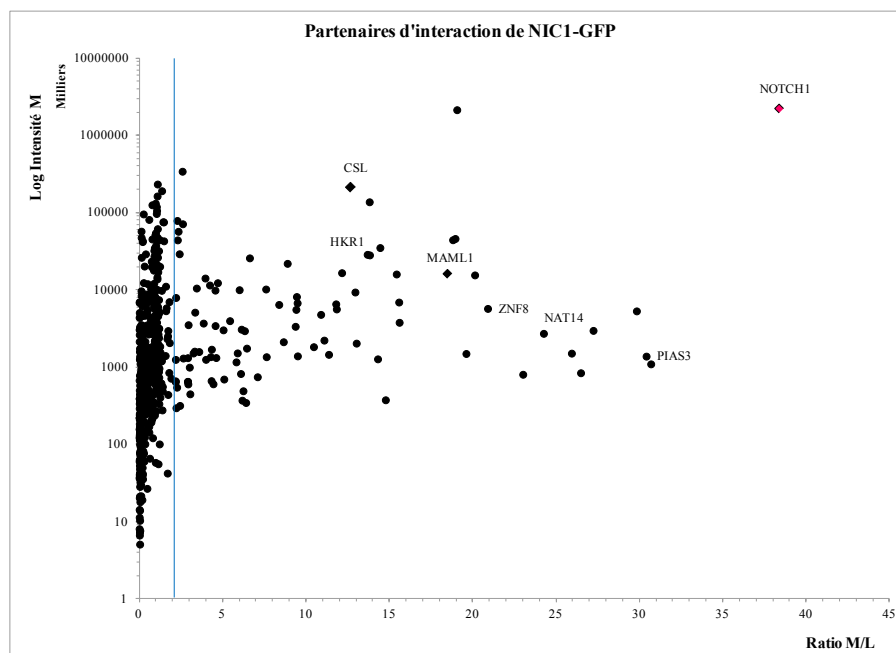


Figure 19. Nouveaux partenaires d'interaction potentiels de NIC1 identifiés par spectrométrie de masse.

Graphique du Logarithme à base 10 (Log) de l'Intensité des peptides vs le ratio SILAC (i.e. moyen(M)/léger(L) arginine et/ou lysine) calculé pour chaque protéine identifiée dans l'immunoprécipitat NIC1-GFP.

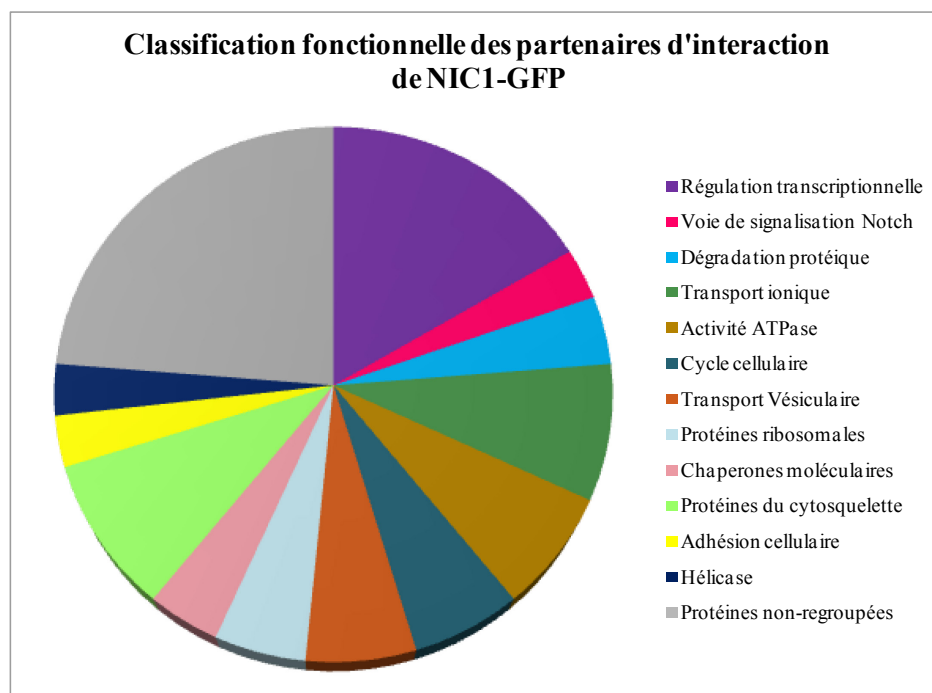


Figure 20. Regroupement fonctionnel des 97 protéines enrichies dans l'IP NIC1-GFP et identifiées par protéomique quantitative.

Analyses bioinformatiques des partenaires d'interaction de NIC1-GFP suite à son immunoprécipitation dans les cellules U2OS FT cultivées en milieu SILAC (voir Figure 19). Les 97 protéines ayant un ratio d'enrichissement supérieur à 2,0 ont été regroupées en 12 classes fonctionnelles. La classe fonctionnelle Régulation transcriptionnelle regroupe 16 partenaires potentiels de NIC1-GFP.

Fonction	Nom des gènes	Nom des protéines
Voie de signalisation NOTCH	<i>NOTCH1</i>	Neurogenic locus notch homolog protein 1
	<i>MAML1</i>	Mastermind-like protein 1
	<i>RBPJ, CSL</i>	Recombining binding protein suppressor of hairless
Régulation transcriptionnelle	<i>PIAS3</i>	E3 SUMO-protein ligase PIAS3
	<i>NAT14</i>	N-acetyltransferase 14
	<i>ZNF8</i>	Ran-binding protein 3
	<i>NRIP1</i>	Nuclear receptor-interacting protein 1
	<i>HKR1</i>	Krüppel-related zinc finger protein 1
	<i>ZNF92</i>	Zinc finger protein 92
	<i>MYBBP1A</i>	Myb-binding protein 1A
	<i>SIM1</i>	Single-minded homolog 1
	<i>BAHD1</i>	Bromo adjacent homology domain-containing 1 protein
	<i>PPARGC1B</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta
	<i>YEATS2</i>	YEATS domain-containing protein 2
	<i>ZNF182</i>	Zinc finger protein 182
	<i>ZNF654</i>	Zinc finger protein 654
	<i>DDX5</i>	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5
	<i>ZNF92</i>	Zinc finger protein 92
<i>EYA4</i>	Eyes absent homolog 4	

Tableau 7. Partenaires d'interaction de NIC1 impliqués dans la régulation transcriptionnelle.

Seize partenaires d'interaction potentiels de NIC1 identifiées par spectrométrie de masse (voir Figure 20) ont été regroupés dans cette classe fonctionnelle en fonction de leur implication dans la régulation transcriptionnelle.

IV. DISCUSSION

La voie de signalisation NOTCH1 est impliquée dans divers processus développementaux et physiologiques, où elle influence la différenciation et la prolifération cellulaire. Ainsi, une mauvaise régulation de cette voie de signalisation mène à des pathologies humaines telles que l'adénocarcinome ductal pancréatique (PDA) (Ranganatha *et al.*, 2011) et la leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T (T-ALL) (South *et al.*, 2012). Une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels NIC1 coordonne l'expression génique est importante puisque NOTCH1 est modulé dans diverses pathologies humaines. Puisque les études jusqu'à présent n'ont pas permis d'identifier tous les partenaires d'interaction se retrouvant dans le complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1 et pouvant moduler son activité, nous avons procédé à l'analyse protéomique de NOTCH1 dans le but d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction. L'identification de nouveaux partenaires d'interaction devrait améliorer notre compréhension de cette voie de signalisation d'apparence simple, mais plutôt complexe.

En accord avec des études antérieures (Rand *et al.*, 2000; Tremblay *et al.*, 2013), nos résultats démontrent que le traitement des cellules exprimant un NOTCH1 à l'EGTA est un modèle fiable pour l'étude de l'activation synchronisée de NOTCH1. En effet, ce modèle nous a permis de montrer que NIC1 subit une série de modifications post-traductionnelles suivant sa relâche du récepteur transmembranaire. Des essais phosphatases *in vitro* nous ont permis de postuler qu'il s'agissait, entre autres, de phosphorylation. Malgré que très peu de choses soient connues sur la régulation de NIC1 par phosphorylation, il a été suggéré que NIC1 peut être phosphorylé sur certains résidus et ce, par diverses kinases. Par exemple, il a été suggéré que la phosphorylation de NIC1 par GSK3 β au niveau de son domaine ANK favorise l'activité transcriptionnelle de NIC1 (Han *et al.*, 2012). D'autre part, le domaine PEST de NIC1 contient plusieurs sites de phosphorylation qui sont importants dans le contrôle de la stabilité de NIC1 et qui servent d'amorce pour l'ubiquitination subséquente. En effet, la phosphorylation de NIC1 par

Cycline C/CDK8, notamment sur les sérines 2481, 2484, 2506, favorise sa dégradation par le protéasome (Fryer *et al.*, 2004).

Suivant la liaison de son ligand, le récepteur NOTCH1 subit une série de clivages protéolytiques, par des métalloprotéases de la famille ADAM/TACE et par le complexe gamma-sécrétase, permettant la libération de NIC1 (Bray, 2006). Il est possible de bloquer cette libération en utilisant un inhibiteur de gamma-sécrétase tel que le DAPT. En effet, il a été démontré qu'un traitement au DAPT diminue l'expression de NIC1 et que cette diminution de NIC1 est associée à une transcription réduite des gènes cibles de la voie Notch dont HES1 (Tremblay *et al.*, 2013). Ainsi, pour valider notre modèle de surexpression de Notch1 Δ E, nous avons procédé à un traitement avec l'inhibiteur de gamma-sécrétase, DAPT, où on observe une perte de l'expression de NIC1, suggérant que le DAPT prévient le clivage et l'activation du Notch1 Δ E dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. Plus précisément, puisque Notch1 Δ E présente une délétion de son domaine extracellulaire, il devient indépendant de l'association de son ligand pour son activation, voire l'exposition du site de clivage par le complexe gamma-sécrétase, et devient donc constitutivement activé. Dans le but de vérifier si le Notch1 Δ E avait un comportement similaire au NOTCH1 endogène, nous avons procédé à des essais phosphatases *in vitro*, sachant que le NIC1 endogène est une protéine phosphorylée. D'abord, on observe une accélération de la migration du NIC1 murin exogène sur gel SDS-PAGE suivant la déphosphorylation par la lambda phosphatase dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. Visiblement, cette expérience nous a permis de montrer que le NIC1 murin exogène est aussi une protéine phosphorylée. Par contre, nous avons observé que l'accélération de la migration du NIC1 murin exogène suite à l'essai phosphatase *in vitro* est moins importante que celle du NIC1 humain endogène, suggérant que le NIC1 murin exogène est moins phosphorylé que le NIC1 humain endogène. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que l'ADN codant pour le Notch1 Δ E est murin et qu'il a été surexprimé dans des cellules humaines. Ainsi, notre hypothèse est que le NIC1 murin exogène n'a peut-être pas été reconnu par l'ensemble des kinases pouvant phosphoryler le NIC1 humain endogène. Enfin, une co-immunoprécipitation de MAML1 a

été observée autant avec le NIC1 murin exogène que le NIC1 humain endogène, suggérant qu'ils ont la même capacité de s'associer avec ce partenaire transcriptionnel connu.

Après avoir validé notre modèle de surexpression de Notch1 Δ E, nous avons procédé à des analyses par spectrométrie de masse dans le but d'identifier des partenaires d'interaction de NIC1. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche de protéomique quantitative, la méthode SILAC. La quantification permet la comparaison avec un contrôle négatif afin de faire la distinction entre les interactions spécifiques et non-spécifiques (Mann, 2006). D'abord, suite à l'immunoprécipitation du Notch1 Δ E, nous avons pu confirmer la présence de NOTCH1 dans les échantillons analysés, ainsi que la présence de partenaires d'interaction connus, MAML1 et p300. En fait, MAML1 agit en tant que co-activateur en stabilisant la liaison de NIC1 et CSL à l'ADN lors de l'activation de la transcription des gènes cibles (Wu *et al.*, 2000). Ensuite, le complexe tertiaire NIC1/CSL/MAML1 recrute l'histone acétyltransférase p300, qui agit en tant que cofacteur positif de la transcription Notch dépendante (Oswald *et al.*, 2001; Wallberg *et al.*, 2002). Bref, l'identification de partenaires connus de NIC1 valide l'approche utilisée permettant l'identification de protéines interagissant avec le NIC1 murin exogène.

De façon plus novatrice, les analyses par spectrométrie de masse suggèrent l'interaction possible entre NIC1 murin et plusieurs membres du complexe médiateur. La fonction de base du complexe médiateur est de communiquer les signaux de régulation provenant des facteurs de transcription liés à l'ADN directement à l'enzyme ARN polymérase II (Pol II) (Allen et Taatjes, 2015). Il est suggéré que les sous-unités du complexe médiateur résident dans 4 modules, la tête, le centre, la queue et le module kinase. Ainsi, MED11 et 17 font partie de la queue, MED1, 10 et 21 font partie du centre, MED15, 23 et 24 font partie de la queue et MED12 et 13 font partie du module Kinase (Larivière *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que notre modèle de Notch1 Δ E mène à l'expression d'un NIC1 qui est susceptible d'être recruté à la chromatine et qui s'associe avec la machinerie transcriptionnelle de base. Nos analyses des partenaires d'interaction du NIC1 murin exogène identifiés par spectrométrie de masse suggèrent également de possibles interactions avec des protéines ayant des fonctions dans la transcription. En effet,

la plupart de ces protéines sont des co-activateurs transcriptionnels de par leur fonction acétyltransférase (CBP), remodelage de la chromatine (ATRX) ou méthyltransférase (CARM1) (Chan et La Thanque, 2001; McDowell *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2013). Ces résultats nous suggèrent donc qu'en plus d'être recruté à la chromatine et de s'associer à la machinerie transcriptionnelle de base, le NIC1 murin exogène se retrouve dans un complexe potentiellement actif au niveau transcriptionnel.

Enfin, nos analyses suggèrent des interactions possibles avec des protéines impliquées dans l'ubiquitination (UBA1, HERC2, NICE4, USPL1 et BAT2D1). Ces protéines sont principalement impliquées dans la voie de dégradation par le protéasome, car ce sont, entre autres, des E1, E2 et E3 ubiquitines ligases (Xie, 2014; Sculzs *et al.*, 2012; Wilde *et al.*, 2011). En effet, ce processus nécessite l'ubiquitination des protéines impliquant consécutivement trois enzymes. En fait, l'enzyme E1 est d'abord conjuguée à l'ubiquitine qui est ensuite transférée à l'enzyme E2 et, l'E3 permet de recruter la protéine cible pour y transférer l'ubiquitine et cette protéine ubiquitinylée est dégradée par le protéasome (Palermo *et al.*, 2014). D'ailleurs, il a été montré que l'ubiquitination de NOTCH1 est hautement dynamique et réversible. En fait, plusieurs E3 ubiquitines ligases sont associées à la régulation de la stabilité de NOTCH1, comme Deltex, Itch et FBW7 (Andersson *et al.*, 2011), suggérant que ces interactions sont critiques pour la régulation des niveaux protéiques de NOTCH1 dans la cellule. La stabilité de NOTCH1 est régulée à différents niveaux. Par exemple, FBW7 ubiquitinye NIC1 qui est ensuite dégradé par le protéasome, alors que l'ubiquitination de NOTCH1 par Deltex régule plutôt l'internalisation et le trafic intracellulaire de NOTCH1 (Andersson *et al.*, 2011). De manière intéressante, nos analyses par spectrométrie de masse avec le Notch1 Δ E suggèrent des interactions avec de nouvelles protéines impliquées dans l'ubiquitination. Ainsi, il sera intéressant de confirmer ces interactions et de caractériser leur impact sur les fonctions de NOTCH1. Par exemple, nous pourrions exprimer Notch1 Δ E-myc ou NIC1-GFP en présence d'E3 ubiquitine ligase de type sauvage ou d'un dominant négatif et comparer l'impact sur différentes fonctions de NOTCH1, comme l'activité transcriptionnelle ou la stabilité. Enfin, ces résultats nous suggèrent tout de même la possibilité que le NIC1 murin exogène soit régulé par l'ubiquitination, comme l'est le NIC1 endogène.

Il est intéressant de noter que malgré la validation de notre modèle et d'avoir démontré que Notch1 Δ E est clivé par le complexe gamma-sécrétase, qu'il mène à l'expression de NIC1, qu'il est phosphorylé et qu'il s'associe à MAML1, il nous a été impossible d'identifier tous les partenaires d'interaction connus de NIC1. En fait, l'approche utilisée par spectrométrie de masse ne permet pas d'identifier tous les candidats parce que certaines protéines peuvent être insolubles, et certaines interactions sont faibles et/ou transitoires (Roux *et al.*, 2012). Dans le but d'augmenter le nombre de partenaires d'interaction identifiés par spectrométrie de masse, il serait possible de répéter l'expérience plusieurs fois. Ainsi, les données bioinformatiques pourraient être analysées dans un seul projet MaxQuant. L'avantage de procéder ainsi est que la force de MaxQuant réside dans l'analyse d'un grand nombre de séries LC-MS facilitant la comparaison des expériences (Cox *et al.*, 2009). Il serait également intéressant d'utiliser une autre enzyme de digestion que la trypsine, comme Lys-C, Asp-N, Glu-C ou Arg-C. En fait, les peptides générés par la trypsine contiennent des résidus basiques, arginine et lysine, en C-terminal. Lorsque protonés et en phase gazeuses, ces peptides cationiques sont idéals pour le séquençage par activation de collision lors de l'analyse MS/MS. En général, les peptides ayant une faible charge (z) et un ratio masse sur charge (m/z) élevé sont idéals pour le séquençage, ce qui explique l'utilisation de la trypsine (Swaney *et al.*, 2009). Néanmoins, il a été montré que l'utilisation de plusieurs protéases pouvait augmenter considérablement les séquences recouvertes pour l'identification à large spectre de protéines lors d'analyses protéomiques (Swaney *et al.*, 2009). Ainsi, il serait intéressant de répéter l'expérience avec le Notch1 Δ E en utilisant différentes protéases et en combinant ces données bioinformatiques pour augmenter le nombre de partenaires d'interaction identifiés par spectrométrie de masse. Par ailleurs, nous avons surexprimé dans des cellules pancréatiques tumorales humaines une construction Notch1 Δ E codant pour un récepteur Notch1 murin. Il se pourrait très bien que le NIC1 murin exogène ne puisse pas recruter les mêmes partenaires que le NIC1 humain endogène. Plus encore, nous avons surexprimé le Notch1 Δ E par transfection transitoire, ainsi l'expression est beaucoup moins homogène comparativement au NOTCH1 endogène. C'est pourquoi nous avons tenté d'améliorer notre modèle d'étude en générant la lignée cellulaire stable U2OS Flp-InTM T-REXTM NIC1-GFP.

Dans le but d'améliorer notre modèle de surexpression de NIC1, nous avons généré les constructions codantes pour un NIC1 humain avec une étiquette GFP. L'utilisation du GFP est une étiquette de choix puisqu'elle montre un minimum d'interactions non-spécifiques avec les protéines de cellules mammifères, elle peut être utilisée pour la purification par affinité de complexe protéique spécifique et, elle permet d'intégrer des données d'interactions protéiques avec des mesures *in vivo* par microscopie à fluorescence (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2008). D'abord, nous avons montré que NIC1-GFP s'exprimait dans les HEK293T. Nous avons aussi montré que NIC1-GFP était localisé au noyau par microscopie à fluorescence et qu'il était plus particulièrement localisé dans la fraction chromatine par fractionnement cellulaire. Il est à noter que le taux d'efficacité de transfection n'a pas été déterminé, puisque nous voulions simplement étudier la localisation cellulaire du NIC1-GFP de façon qualitative. Pour s'assurer que l'étiquette GFP n'interférait pas avec les interactions protéiques, nous avons montré que NIC1-GFP s'associait avec son partenaire transcriptionnel CSL. Par la suite, nous avons vérifié que NIC1-GFP était capable de s'associer à la machinerie transcriptionnelle de base. Plus précisément, nous avons montré l'association de NIC1-GFP avec Rpb1 CTD, la plus grosse sous-unité de l'ARN Polymérase II. Ces résultats suggèrent que NIC1-GFP transloque au noyau et est capable de former un complexe transcriptionnel fonctionnel en recrutant l'ARN Polymérase II. Par ailleurs, la régulation de la stabilité de NIC1 est un processus clé des mécanismes moléculaires régulant l'activité transcriptionnelle de NOTCH1. En effet, la dégradation de NIC1 mène au désassemblage du complexe tertiaire et permet la réinitialisation de la cellule pour une prochaine série de signaux (Kopan et Ilagan, 2010). Toujours dans le but de valider notre modèle, nous avons montré qu'après 4h de traitement au cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique, le NIC1-GFP nouvellement synthétisé est disparu. En parallèle, nous avons montré que le NIC1-GFP était dégradé par le protéasome. Au terme de cette série d'expériences, nous avons montré que le NIC1-GFP est un bon modèle d'étude, puisqu'il se comporte de façon semblable au NIC1 endogène.

Les résultats de la littérature suggèrent que NIC1 est une protéine phosphorylée et nous en avons fait la preuve. Néanmoins, selon le résidu phosphorylé et/ou la kinase qui le phosphoryle l'impact sur la stabilité ou l'activité transcriptionnelle de NIC1 est différente

(Palermo *et al.*, 2014). Suivant des analyses bioinformatiques visant à identifier des résidus hautement susceptibles d'être phosphorylés, nous avons choisi d'étudier quatre sites potentiels de phosphorylation de NIC1, soit les résidus sérines 2521, 2522, 2523 et 2524. De manière intéressante, ces quatre résidus sérines sont conservés chez le dNotch de la *Drosophile* ainsi que chez le NOTCH1 et le NOTCH2 des vertébrés (Chiang *et al.*, 2006). En fait, cette région WSSSSP (résidus 2520-2525) contient la position d'une mutation importante dans le T-ALL, c'est-à-dire une mutation du résidu S2524 menant à un codon stop qui résulte en la délétion de la région C-terminale de NIC1 (Weng *et al.*, 2004). La majorité des délétions viennent à éliminer souvent le domaine PEST, suggérant qu'il contient des régions régulatrices et/ou des motifs importants comme signal de régulation négative de NOTCH1 (Feldman *et al.*, 2000; Hoemann *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que la région WSSSSP (résidus 2520-2525) de NIC1 est importante pour le contrôle du signal NOTCH1, et influence le développement du T-ALL dans un modèle murin (Chiang *et al.*, 2006). Ainsi, pour tester l'idée que les quatre résidus sérines 2521-24 pourraient jouer un rôle dans la régulation des fonctions de NOTCH1, nous avons travaillé avec les mutants ponctuels NIC1 S2521-24A et NIC1 S2524D.

Premièrement, nous avons montré par fractionnement cellulaire que les mutants ponctuels de NIC1 étaient localisés majoritairement dans la fraction chromatine au même titre que le NIC1 de type sauvage. Ces résultats suggèrent que le statut de phosphorylation des résidus S2521-24 ne semble pas influencer la localisation cellulaire de NIC1. Il est intéressant de noter qu'après avoir rapporté la distribution relative des mutants ponctuels de NIC1 et du NIC1 WT dans un histogramme, nous avons remarqué que le mutant NIC1 S2524D était retrouvé à 40% dans la fraction chromatine alors que le NIC1 WT s'y retrouvait à 62%. Étant donné que la mutation de la sérine 2524 de NIC1 en acide aspartique sert à mimer une phosphorylation en ajoutant une charge négative, on pourrait supposer que le mutant NIC1 S2524D se retrouve transitoirement à la chromatine et est rapidement cibler pour être dégradé par le protéasome. Toutefois, puisqu'il s'agit de résultats préliminaires, il sera nécessaire de répéter ces expériences pour pouvoir procéder à des études statistiques approfondies.

Deuxièmement, nous avons étudié la capacité des mutants NIC1 à interagir avec CSL et MAML1 comparativement au NIC1 de type sauvage. Nous avons montré que les mutants NIC1 S2521-24A et NIC1 S2524D pouvait s'associer à CSL et MAML1. Néanmoins, nous avons remarqué que le mutant NIC1 S2524D semblait être moins associé à CSL que le NIC1 de type sauvage. Malgré ces observations, il nous est impossible de conclure avec certitude que ces sites potentiels de phosphorylation régulent suffisamment le recrutement de CSL et MAML1 pour affecter l'activité du complexe NIC1/CSL/MAML1 formé. En considérant que NIC1 interagit avec CSL via ses domaines RAM et ANK, et qu'il interagit avec MAML1 via son domaine ANK (Friedmann *et al.*, 2008), il devient logique de conclure que ces quatre sites potentiels de phosphorylation de NIC1 ne permettent pas de moduler la formation du complexe NIC1/CSL/MAML1. On pourrait plutôt supposer que ces quatre sites potentiels de phosphorylation de NIC1 pourraient plutôt moduler le recrutement de d'autres cofacteurs.

Troisièmement, nous avons étudié l'effet de ces mutations de quatre résidus sérines (S2521-24A) en alanine ou de la mutation du résidu sérine (S2524D) en acide aspartique sur l'activité transcriptionnelle de NIC1. À première vue, nous avons observé que l'activité luciférase relative des mutants est semblable à celle du NIC1 de type sauvage. Malgré qu'il semble y avoir une légère diminution d'interaction du mutant NIC1 S2524D avec CSL, nos résultats suggèrent que l'activité transcriptionnelle de NIC1 n'est pas modulée de façon marquée par la mutation des sites potentiels de phosphorylation des sérines 2521-24. On peut supposer que la mutation de ces quatre résidus sérines seulement n'est pas suffisante pour permettre de moduler l'activité transcriptionnelle de NIC1. De plus, il s'agit de résultats préliminaires et ces résultats devront être confirmés. Il est à noter que lors de nos expériences, nous avons remarqué que pour une même quantité d'ADN transfectée, il y avait systématiquement une plus grande expression des mutants comparativement au NIC1 de type sauvage. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure qu'il pourrait y avoir une légère diminution de l'activité transcriptionnelle des mutants comparativement au NIC1 de type sauvage, si nous arrivions à exprimer une quantité équivalente des mutants et du NIC1 de type sauvage. Enfin, il serait aussi intéressant d'utiliser des mutants de délétion, où un plus

grand nombre de résidus seraient mutés, ce qui augmenterait nos chances de découvrir une nouvelle région régulant l'activité transcriptionnelle de NIC1.

Comme mentionné précédemment, il a été montré que la région WSSSSP (résidus 2520-2525) de NIC1 est importante pour le contrôle de la force du signal NOTCH1, et influence le développement du T-ALL dans un modèle murin (Chiang *et al.*, 2006). Plus précisément, il a été montré que la mutation des résidus S2521-24 en alanine augmentait considérablement l'activité luciférase de NOTCH1 dans les cellules U2OS Flp-InTM T-REXTM (FT) (Chiang *et al.*, 2006), alors que nos observations préliminaires nous indiquent le contraire. En fonction des résultats de cette étude, il a été suggéré que les résidus S2521-24 contribuent à la régulation négative du signal NOTCH1. Il a également été montré que la mutation des résidus S2521-24 en alanine menait à une hypophosphorylation de NIC1 et permettait de stabiliser le complexe NIC1/CSL/MAML1 (Chiang *et al.*, 2006). De manière intéressante, les auteurs ont utilisé le système Flp-InTM T-REXTM (FT) d'Invitrogen pour générer des lignées cellulaires stables. Ainsi, on pourrait supposer que les différences observées entre nos résultats et les résultats de cette étude résident dans l'approche de surexpression et le modèle cellulaire utilisés. De ce fait, il serait intéressant de refaire nos expériences en générant des lignées cellulaires stables U2OS FT NIC1 WT-GFP, U2OS FT NIC1 S2521-25A-GFP et U2OS FT NIC1 S2524D-GFP. Ce système nous permettrait peut-être de contrer l'expression plus grande des mutants comparativement au NIC1 de type sauvage et nous arriverions peut-être aux mêmes conclusions que Chiang et collaborateurs.

En somme, nous avons observé que ces sites potentiels de phosphorylation de NIC1 ne semblent pas être essentiels à la localisation cellulaire, ne semblent pas influencer la formation du complexe tertiaire et ne semble pas affecter l'activité transcriptionnelle de NIC1. Comme mentionné précédemment, nous avons observé que lors de nos expériences, pour une même quantité d'ADN transfectée, il y avait systématiquement une plus grande expression des mutants comparativement au NIC1 de type sauvage. Ainsi, on pourrait supposer que ces sites potentiels de phosphorylation pourraient plutôt jouer un rôle dans la stabilité de NIC1. En fait, trois sites en C-terminal de NIC1 près des 4 résidus sérine 2521-24 peuvent être phosphorylés par Cycline C/CDK8 (S2514, S2517 et S2538), acteur

important dans la régulation de la dégradation de NIC1 (Fryer *et al.*, 2004). Ainsi, il serait intéressant de comparer la stabilité des mutants ponctuels de NIC1 (S2521-24A et S2524D) au NIC1 de type sauvage. Pour ce faire, il suffirait de transfecter des cellules HEK293T avec NIC1 WT-GFP, NIC1 S2521-24A-GFP ou NIC1 S2524D-GFP, et de traiter les cellules au cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique. Le traitement au cycloheximide nous renseignerait sur la demi-vie des mutants ponctuels de NIC1 comparativement au NIC1 de type sauvage. En parallèle, il serait possible de traiter les cellules au MG132, un inhibiteur du protéasome, pour vérifier si les mutants ponctuels de NIC1 sont dégradés par le protéasome. Enfin, il serait intéressant de caractériser les niveaux de phosphorylation globaux des mutants ponctuels de NIC1 comparativement au NIC1 de type sauvage. Par exemple, on pourrait procéder à des essais phosphatases *in vitro*, ce qui nous renseignerait sur l'influence des résidus sérines 2521-24 sur la phosphorylation de NIC1 par une ou plusieurs kinases, car il a été montré que la mutation des résidus S2521-24 en alanine mène à une hypophosphorylation de NIC1 (Chiang *et al.*, 2006). On pourrait également analyser les modifications post-traductionnelles des mutants ponctuels en comparaison au NIC1 de type sauvage par spectrométrie de masse.

Dans le but d'avoir un modèle cellulaire dont les niveaux d'expression de NIC1-GFP se rapprochent davantage des niveaux d'expression d'un NIC1 endogène, nous avons généré la lignée cellulaire stable U2OS Flp-InTM T-REXTM (FT) NIC1-GFP. Afin de valider notre modèle, NIC1-GFP a été immunoprécipité à l'aide des billes d'agarose GFP-Trap et d'un anticorps dirigé contre NOTCH1. Le GFP-Trap est une protéine de 16kD dérivée de la chaîne lourde d'un anticorps de lama qui lie avec une grande affinité et spécificité le GFP (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2008). L'avantage d'utiliser le GFP-Trap est qu'il permet d'éviter le bruit de fond occasionné par l'utilisation d'IgG. Bref, nous avons montré qu'il était possible d'immunoprécipiter spécifiquement NIC1-GFP à l'aide du GFP-Trap au même titre qu'avec un anticorps dirigé contre NOTCH1. Afin de vérifier que le NIC1-GFP pouvait subir des modifications post-traductionnelles dans ce modèle cellulaire, nous avons procédé à des essais phosphatases *in vitro*. D'une part, on observe une accélération de la migration du NIC1-GFP sur gel SDS-PAGE suivant la déphosphorylation par la lambda phosphatase dans les cellules U2OS FT. Visiblement, cette expérience nous a

permis de montrer que le NIC1-GFP est aussi une protéine phosphorylée. Enfin, on s'est assuré que le NIC1-GFP était capable de s'associer à des partenaires d'interactions connus dans les U2OS FT. En effet, nous avons montré, par co-immunoprécipitation, l'association entre NIC1-GFP et CSL dans les cellules U2OS FT. En somme, ces résultats nous ont permis de valider notre modèle, où le NIC1-GFP se comporte de façon semblable au NIC1 endogène.

Après avoir validé notre modèle, nous avons procédé à des analyses par spectrométrie de masse toujours dans le but d'identifier des partenaires d'interaction de NIC1. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche de protéomique quantitative, la méthode SILAC. D'abord, nous avons confirmé la présence de NOTCH1 et la présence des partenaires d'interaction connus CSL et MAML1. Ces résultats suggèrent qu'il y a formation du complexe transcriptionnel NIC1/CSL/MAML1. Comme pour les analyses de spectrométrie de masse avec le Notch1ΔE, en s'assurant d'avoir identifié des partenaires connus de NIC1, on valide que l'approche utilisée permet l'identification de protéines interagissant avec le NIC1-GFP. Il est intéressant de noter que malgré nos efforts de valider notre modèle, d'avoir démontré que NIC1-GFP est phosphorylé et qu'il s'associe à CSL, il nous a été impossible d'identifier tous les partenaires d'interaction connus de NIC1. En fait, on se serait attendu à identifier certains cofacteurs connus de NIC1, comme le co-régulateur transcriptionnel SKIP, les histones acétyltransferases p300 et PCAF/GCN5 ou encore BRM, membre du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Fiùza et Arias, 2007; Kurooka et Honjo, 2000; Wallberg *et al.*, 2002; Kadam et Emerson, 2003). Évidemment, ça nous permet de souligner les limitations de cette expérience et l'importance d'utiliser d'autres approches pour valider les interactions suggérées suivant les analyses protéomiques.

L'utilisation du NIC1-GFP apportait son lot de limitations. En effet, dans ce modèle-ci, malgré l'utilisation d'une lignée cellulaire stable, l'expression de NIC1-GFP était plutôt faible amenant une diminution de l'efficacité de l'immunoprécipitation. De plus, les cellules U2OS FT ont une plus grande surface de contact que les MIA PaCa-2 et donc, pour un pétri 100 mm confluent ont obtenu une quantité moindre de protéines avec

les U2OS FT qu'avec les MIA PaCa-2. Encore plus, nous avons utilisé des lysats cellulaires totaux pour nos immunoprécipitations, ce qui pourrait avoir diminué l'efficacité d'immunoprécipitation de partenaires nucléaires. Il serait donc intéressant de refaire les expériences en passant par un fractionnement cellulaire dans le but d'enrichir les protéines nucléaires, dont NIC1-GFP. Enfin, nous avons surexprimé un NIC1-GFP qui n'est que le fragment intracellulaire actif de NOTCH1, ce qui n'est pas totalement représentatif de la signalisation Notch. Ainsi, il serait intéressant d'utiliser plutôt une construction codant pour le récepteur NOTCH1-GFP complet et de générer des lignées cellulaires stables dans un autre modèle que les U2OS FT, comme les HEK293T ou les MIA PaCa-2. De cette façon, il serait possible d'étudier les mécanismes moléculaires régulant la voie Notch en activant le récepteur par un traitement à l'EGTA. Ainsi, NIC1-GFP serait immunoprécipité à différents temps suivant l'activation du récepteur NOTCH1-GFP. Ce modèle d'étude serait unique puisqu'il permettrait pour la première fois d'identifier temporellement des modifications post-traductionnelles ainsi que des nouveaux partenaires d'interaction de NIC1.

Pour contrer les limitations de cette expérience, soit la perte de candidats à cause d'interactions faibles ou de l'insolubilité de certaines protéines, il est possible d'utiliser une autre approche de purification, le BioID (proximity-dependent biotin identification). Cette méthode permet le dépistage de protéines interagissant ou étant à proximité de notre protéine d'intérêt dans son environnement cellulaire (Roux *et al.*, 2012). Cette méthode est basée sur la fusion d'une protéine biotine ligase d'*Escherichia coli* (BirA) à notre protéine d'intérêt. Il serait possible de générer une lignée cellulaire stable exprimant cette protéine recombinante, par exemple U2OS FT NIC1-BirA. Le principe serait simple, en supplémentant le milieu de culture cellulaire en biotine, l'activité biotine ligase de BirA permettrait de biotinyler les protéines interagissant avec notre protéine d'intérêt ainsi que les protéines à proximité (Roux *et al.*, 2012). Il se formerait donc un gradient de biotinylation, où les protéines les plus près de notre protéine d'intérêt seraient beaucoup plus biotinylées que celles qui ne seraient pas à proximité. Les protéines biotinylées seraient purifiées à l'aide de billes couplées à la streptavidine qui a une très grande affinité pour la biotine ($K_d = 10^{-14}$ M) (Roux *et al.*, 2012). De ce fait, en utilisant la méthode SILAC

couplée à la stratégie de BioID, il serait possible d'identifier des candidats qui interagissent et/ou ont été à proximité de notre protéine d'intérêt.

Malgré que certains partenaires répertoriés de NIC1 n'aient pas été identifiés, l'analyse SILAC suivant l'immunoprécipitation de NIC1-GFP dans les U2OS FT a permis d'identifier 97 protéines ayant un ratio d'enrichissement supérieur à 2,0 qui ont été regroupées en 12 classes fonctionnelles. De manière intéressante, la classe fonctionnelle la plus volumineuse est celle de la régulation transcriptionnelle. En effet, elle regroupe 16 protéines capables de réguler la transcription à différents niveaux. Par exemple, certaines de ces protéines sont des modificateurs de nucléosome (NAT14, YEATS2, BAHD1, EYA4), c'est-à-dire qu'elles peuvent ajouter des groupements chimiques sur les queues des histones ou qu'elles peuvent participer au remodelage de la chromatine (Takahashi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008; Bierne *et al.*, 2009; Schönberger *et al.*, 2005). Certaines de ces 16 protéines interagissent directement avec des facteurs de transcription pour en moduler l'activité (NRIP1, PPARG1B, DDX5) et d'autres vont plutôt apporter des modifications post-traductionnelles qui vont moduler l'activité de facteurs de transcription (PIAS3) (Zhang *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2012; Dardenne *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013). Parmi ces 16 régulateurs transcriptionnels, certains vont plutôt lier des séquences régulatrices sur l'ADN (MYBBP1A) et enfin, certaines ne sont pas caractérisées, mais pourrait avoir un rôle régulateur de la transcription (Zinc Finger Protein) (George *et al.*, 2015). De manière intéressante, on remarque que plusieurs de ces protéines pouvant potentiellement interagir avec NIC1-GFP sont des régulateurs positifs de la transcription (NAT14, PPARG1B, YEATS2, DDX5), suggérant que le NIC1-GFP forme un complexe tertiaire NIC1/CSL/MAML1 fonctionnelle et qu'il pourrait activer la transcription des gènes cibles de la voie Notch (Takahashi *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008; Dardenne *et al.*, 2014). Bien entendu, ce sont tous des partenaires d'interaction potentiels de NIC1, ce qui signifie que ces interactions devront être confirmées par des techniques de biochimie. Par exemple, il serait possible de procéder à des co-immunoprécipitations avec les protéines exogènes dans les U2OS FT. Il serait aussi intéressant de confirmer ces interactions avec les protéines endogènes, par exemple dans les cellules pancréatiques

tumorales humaines. De plus, le rôle de ces différents partenaires d'interaction sur l'activité du complexe NIC1/CSL/MAML1 devra être confirmé via des études fonctionnelles.

Il est intéressant de noter qu'une étude antérieure similaire à la nôtre avait permis d'identifier l'interactome nucléaire de NIC1 dans un modèle cellulaire de T-ALL (Yatim *et al.*, 2012). Comme nous l'avons fait, les auteurs avaient regroupé les protéines identifiées par spectrométrie de masse en 9 classes fonctionnelles (Yatim *et al.*, 2012). De façon plus novatrice, nous avons fait nos études protéomiques à l'aide de la méthode SILAC, une méthode quantitative, alors que les auteurs n'ont pas utilisé une telle méthode pour leurs analyses par spectrométrie de masse, signifiant que leurs données sont qualitatives. En comparant nos données, il nous a été possible d'identifier des partenaires d'interaction communs à ceux identifiés dans cette étude. En effet, les protéines CAND1 et MED26 ont également été identifiés dans l'étude de Yatim et collaborateurs, ce qui soutient la validité de la méthode utilisée pour identifier des partenaires d'interaction de Notch1 ΔE . Toutefois, on se serait attendu à obtenir un plus grand nombre de protéines en commun. En fait, on pourrait expliquer que nous retrouvons peu de partenaires communs à ceux identifiés dans cette étude par le fait que lorsque nous procédons à nos expériences de spectrométrie de masse, c'est comme si nous prenions une photo des protéines dans la cellule à un instant donné. Ainsi, c'est comme si la photo prise par Yatim et collaborateurs était différente de la nôtre. C'est pourquoi, il peut être avantageux de répéter plus d'une fois nos analyses par spectrométrie de masse et de combiner nos données pour augmenter le nombre de protéines identifiées. Tout compte fait, plutôt que de tenter d'obtenir les mêmes données que les auteurs, nous aurions intérêt à les considérer comme complémentaires. D'autre part, les auteurs ont généré des lignées cellulaires stables de T-ALL exprimant un NIC1 étiqueté Flag/Ha pour leurs expériences (Yatim *et al.*, 2012). De ce fait, ils ont directement associé leurs données à une pathologie. Ainsi, il pourrait être intéressant de générer des lignées cellulaires stables exprimant NIC1-GFP dans un modèle de cancer pancréatique, comme les MIA PaCa-2. Enfin, l'étude de Yatim et collaborateurs est beaucoup plus complète que la nôtre, car ils ont ciblé des cofacteurs de NIC1 potentiellement importants pour son activité transcriptionnelle et ils ont confirmé ces interactions en plus de les caractériser via des études fonctionnelles.

En ce qui concerne nos analyses par spectrométrie de masse, une fois de plus, nos données suggèrent des interactions possibles entre NIC1 et des protéines impliquées dans l'ubiquitination/sumoylation (HACE1, UBB et SUMO4 (Classe fonctionnelle de la dégradation protéique, Figure 20)). Lors de nos analyses par spectrométrie de masse avec le Notch1 Δ E, nous avons aussi identifié des protéines impliquées dans l'ubiquitination et plus particulièrement des E1, E2 et E3 ubiquitines ligases (UBA1, NICE4 et HERC2) (Xie, 2014; Sculzs *et al.*, 2012; Wilde *et al.*, 2011). Cette fois-ci, nous avons identifié l'ubiquitine B (UBB) qui a pour rôle de cibler les protéines pour la dégradation par le protéasome (Palermo *et al.*, 2014). En considérant que nous avons identifié des enzymes ubiquitines ligases, la protéine ubiquitine B et que nous avons montré que NIC1-GFP était dégradé par le protéasome, ces résultats suggèrent la possibilité que le NIC1-GFP soit régulé par l'ubiquitination, comme le NIC1 endogène, et qu'il s'agit d'une modification post-traductionnelle essentielle au maintien des niveaux protéiques de NIC1 dans la cellule. Encore une fois, ces interactions potentielles avec des protéines impliquées dans l'ubiquitination devront être confirmées à l'aide de techniques de biochimie. De façon plus novatrice, nous avons identifié une petite protéine SUMO (small ubiquitin-like modifier). La sumoylation est une modification post-traductionnelle qui ressemble à l'ubiquitination, où une protéine SUMO est conjuguée à une protéine cible sur un résidu lysine (Chen et Lu, 2015). En revanche, alors que l'ubiquitination entraîne généralement la dégradation d'une protéine cible par le protéasome, la sumoylation régule plutôt les propriétés biochimiques d'une protéine cible (interaction protéique, interaction ADN-protéine et activité transcriptionnelle) (Chen et Lu, 2015). Il est à noter qu'il n'y a pas d'évidences dans la littérature que NOTCH1 soit sumoylé. Ainsi, il devient pertinent d'en connaître davantage sur cette modification post-traductionnelle. D'autant plus intéressant, cette modification post-traductionnelle pourrait modifier les interactions protéiques de NIC1 et son activité transcriptionnelle. Enfin, il sera nécessaire de confirmer ces interactions et d'en caractériser l'impact sur les fonctions de NIC1.

Le rôle des modifications post-traductionnelles dans le contrôle des fonctions protéiques est de plus en plus évident. C'est pourquoi, suivant nos analyses par spectrométrie de masse, nous avons tenté d'identifier des sites potentiels de modifications

post-traductionnelles sur NIC1, et plus particulièrement des sites potentiels de phosphorylation. Malheureusement, il nous a été impossible d'en faire l'identification. En fait, l'identification à large spectre des modifications protéiques demeure difficile. Pour nos expériences, nous avons opté pour une digestion en gel à la trypsine. L'activité protéase de la trypsine permet de couper les liens peptidiques spécifiquement en C-terminal des arginines et des lysines. S'il y a des acides aminés avoisinant le site de clivage, comme l'acide aspartique ou l'acide glutamique, le taux d'hydrolyse est diminué. De plus, une proline en C-terminal du site de clivage peut potentiellement inhiber complètement l'hydrolyse (Thiede *et al.*, 2000). Étant donné qu'une grande quantité des sites potentiels de phosphorylation se situe dans le domaine PEST de NIC1 et qu'il contient peu de résidus lysine et arginine, la taille des peptides générés était trop grande pour permettre l'identification de sites potentiels de phosphorylation. Pour parvenir à identifier des sites potentiels de phosphorylation sur NIC1, il faudrait changer de stratégie de digestion.

Il a été montré que l'utilisation de plusieurs protéases augmente considérablement le nombre de sites de phosphorylation identifiés. En effet, une approche de digestion séquentielle combinant l'utilisation de Glu-C et de la trypsine permet de produire des peptides de tailles plus adéquates pour être analysés par spectrométrie de masse. Étant donné que la protéase Glu-C clive en C-terminal des acides glutamiques et des acides aspartiques, les sites de phosphorylation identifiés par Glu-C et la trypsine sont complémentaires (Bian *et al.*, 2015). Ainsi, pour augmenter nos chances d'identifier des sites potentiels de phosphorylation de NIC1, il faudrait d'abord digérer les protéines purifiées avec Glu-C. Ensuite, les peptides générés suite à cette digestion pourraient être de nouveau digérés avec la trypsine.

En favorisant la génération de peptides de taille adéquate pour la détection par spectrométrie de masse, une approche par digestion séquentielle permettrait d'augmenter le nombre de sites de phosphorylation pouvant être identifié. Il existe d'autre stratégie permettant d'enrichir les peptides phosphorylés. L'une des stratégies la plus couramment utilisée est l'utilisation de micro-colonnes de dioxyde de titane (TiO_2) (Dunn *et al.*, 2010). L'utilisation d'une résine de métal oxydé sert de support d'affinité sélective pour

capturer les peptides phosphorylés (Larsen *et al.*, 2005). Le principe est simple, une fois digéré, le mélange de peptides phosphorylés et non-phosphorylés est passé sur la micro-colonne de TiO_2 . À pH acide, le TiO_2 est chargé positivement ce qui permet de lier sélectivement les peptides phosphorylés. Ainsi, le mélange de peptides est passé sur la colonne dans une solution acide. Ensuite, la micro-colonne de TiO_2 subit une série de lavage pour éliminer les peptides non-phosphorylés et l'agent de digestion. Les peptides phosphorylés enrichis par la micro-colonne de TiO_2 sont ensuite élués à l'aide d'une solution basique (Dunn *et al.*, 2010). Enfin, les peptides phosphorylés sont purifiés afin d'enlever toute trace de sels et sont concentrés avant d'être analysés par spectrométrie de masse (Larsen *et al.*, 2005). Ainsi, pour augmenter nos chances d'identifier des sites potentiels de phosphorylation de NIC1, nous pourrions utiliser une micro-colonne de dioxyde de titane pour enrichir les phosphopeptides.

Somme toute, nous avons établi un système fiable pour l'identification de nouveaux partenaires de NIC1. Bien entendu, les interactions possibles entre NIC1 et les partenaires identifiés par spectrométrie de masse devront être confirmés par des techniques de biochimie. Par ailleurs, nous devons changer de stratégie pour l'identification de nouveaux sites potentiels de phosphorylation de NIC1.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En résumé, les travaux présentés dans ce mémoire de maîtrise ont permis de mettre en évidence l'établissement d'un système fiable pour l'identification de nouveaux partenaires de NIC1. D'une part, nous avons montré que NIC1 était phosphorylé dans les cellules pancréatiques tumorales humaines et dans les cellules U2OS FT. Nous avons montré que NIC1-GFP était une protéine nucléaire capable de s'associer à l'ARN polymérase II. Nous avons également montré que NIC1-GFP était une protéine de courte demi-vie et dégradée par le protéasome. Ainsi, ces expériences nous ont permis de valider nos modèles d'étude.

À la suite de nos analyses par spectrométrie de masse avec le Notch1 Δ E, nous avons validé l'approche utilisée en confirmant la présence de NOTCH1 et celle de partenaires d'interaction connus, soit MAML1 et p300. De façon plus novatrice, ces analyses par spectrométrie de masse suggèrent l'interaction de NIC1 avec des protéines du complexe médiateur, suggérant que l'expression de Notch1 Δ E mène à l'expression de NIC1 qui est recruté à la chromatine et qu'il s'associe avec la machinerie transcriptionnelle de base. De plus, nos analyses par spectrométrie de masse avec le Notch1 Δ E suggèrent de nouvelles interactions de NIC1 avec des protéines ayant une activité acétyltransférase ou méthyltransférase, suggérant qu'en plus d'être recruté à la chromatine et de s'associer à la machinerie transcriptionnelle de base, le NIC1 murin exogène se retrouve dans un complexe actif transcriptionnellement. Enfin, nos analyses avec le Notch1 Δ E suggèrent des interactions possibles avec des protéines impliquées dans l'ubiquitination, suggérant que le NIC1 murin exogène est régulé par l'ubiquitination, comme l'est le NIC1 humain endogène (Fryer *et al.*, 2004).

Nos analyses par spectrométrie de masse des partenaires d'interaction de NIC1-GFP ont révélé plusieurs classes fonctionnelles de protéines. L'approche a encore une fois été validée par la présence de NOTCH1 et de partenaires connus tels CSL et MAML1. Plus de 90 protéines ont été enrichies dans l'immunoprécipitat NIC1-GFP et ont été regroupées en 12 classes fonctionnelles. De manière intéressante, la classe fonctionnelle la plus

volumineuse est celle de la régulation transcriptionnelle regroupant 16 partenaires potentiels de NIC1. Ces 16 partenaires potentiels de NIC1 pourraient réguler la transcription à différents niveaux, par exemple, au niveau du remodelage de la chromatine, via des interactions directes avec des facteurs de transcription, ou encore en modifiant post-traductionnellement des facteurs de transcription. De plus, nous avons remarqué que certains de ces partenaires potentiels de NIC1 sont des régulateurs positifs de la transcription, suggérant que le NIC1-GFP forme un complexe tertiaire NIC1/CSL/MAML1 fonctionnelle et qu'il peut activer la transcription des gènes cibles de la voie Notch. Une fois de plus, nos analyses par spectrométrie de masse suggèrent des interactions possibles entre NIC1 et des protéines impliquées dans l'ubiquitination. Ainsi, ces résultats suggèrent la possibilité que le NIC1-GFP soit régulé par l'ubiquitination, comme l'est le NIC1 endogène, et qu'il s'agit d'une modification post-traductionnelle essentielle au maintien des niveaux protéiques de NIC1 dans la cellule.

D'autre part, suivant nos analyses par spectrométrie de masse, nous avons tenté d'identifier des sites potentiels de modifications post-traductionnelles sur NIC1, et plus particulièrement des sites potentiels de phosphorylation. Malheureusement, il nous a été impossible d'en faire l'identification. De plus, nos études avec les mutants ponctuels de NIC1 (S2521-24A et S2524D) n'ont pas permis d'identifier des sites potentiels de phosphorylation pouvant réguler certaines fonctions de NOTCH1. En effet, nous avons observé que les quatre résidus sérine ne semblent pas être des sites de phosphorylation essentiels à la localisation cellulaire de NIC1. De plus, ces quatre résidus sérines ne semblent pas influencer la formation du complexe tertiaire NIC1/CSL/MAML1. Enfin, à prime abord, l'activité transcriptionnelle de NIC1 n'est pas modulée par la mutation des sites potentiels de phosphorylation S2521-24. Des études plus approfondies seront toutefois nécessaires pour exclure tout impact de ces résidus dans l'activité transcriptionnelle de NIC1 puisque les niveaux d'expression des mutants étaient toujours supérieurs à ceux du NIC1 WT malgré le potentiel transcriptionnel similaire des mutants comparativement au NIC1 WT.

En perspective, les interactions potentielles de NIC1 avec les partenaires identifiés par spectrométrie de masse devront être confirmées par des techniques de biochimie. Par exemple, ces interactions pourraient être confirmées en co-immunoprécipitant les protéines exogènes dans les U2OS FT. Elles pourraient également être confirmées en co-immunoprécipitant les protéines endogènes dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. De plus, il serait intéressant de vérifier si les mutants ponctuels de NIC1 (S2521-24A et S2524D) pourraient être associés à une modulation des interactions avec ces nouveaux partenaires d'interaction.

À plus long terme, il serait intéressant de caractériser l'implication des nouveaux partenaires identifiés dans l'activité transcriptionnelle de NIC1. D'abord, il serait intéressant de vérifier si ces nouveaux partenaires sont recrutés au promoteur des gènes cibles de NOTCH1 par la méthode de CHIP (chromatine immunoprecipitation). Ensuite, à l'aide des gènes rapporteurs CSL-luciférase et Hes1-luciférase, il serait possible de quantifier, par des essais luciférase, l'implication de ces nouveaux partenaires dans l'activité transcriptionnelle de NIC1. Enfin, on pourrait vérifier si ces nouveaux partenaires sont essentiels à l'activité transcriptionnelle de NIC1. Pour ce faire, on pourrait utiliser une stratégie de shARN dans les cellules pancréatiques tumorales humaines visant à diminuer spécifiquement l'expression de chacun de ces partenaires. L'expression des gènes cibles de NIC1 pourraient ensuite être mesurée par RT-PCR quantitatif.

Quant à l'identification de nouveaux sites de phosphorylation de NIC1, nous devons certainement changer de stratégie, soit en adoptant une approche de digestion séquentielle ou une approche d'enrichissement du phosphoprotéome. De plus, une fois notre nouvelle stratégie au point, il serait intéressant d'identifier d'autres sites modifiés post-traductionnellement. Par exemple, il serait intéressant d'identifier des sites d'ubiquitination, puisque nous avons identifié plusieurs partenaires potentiels de NIC1 impliqués dans l'ubiquitination. À plus long terme, ces nouvelles modifications post-traductionnelles de NIC1 devront être caractérisées afin de comprendre leur impact sur les fonctions de NIC1.

En conclusion, ce projet a permis de mettre en place une approche de protéomique quantitative menant à l'identification de nouveaux partenaires d'interaction de NOTCH1, résultats qui serviront à mieux comprendre la signalisation Notch. Ces nouvelles connaissances sont d'autant plus importantes considérant qu'une activation aberrante de la signalisation Notch est connue pour promouvoir la carcinogenèse pancréatique (Mysliwiec et Boucher, 2009). De plus, il a été démontré que l'inhibition de la voie Notch prévenait le développement du cancer pancréatique chez la souris (Plentz *et al.*, 2009). Ainsi, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques résultant en l'inhibition de la voie Notch s'avère une avenue intéressante pour le traitement des patients atteints du cancer pancréatique. Malheureusement, ces patients n'ont que très peu d'espoir de survie puisque le cancer pancréatique représente depuis plusieurs années le cancer avec le plus faible taux de survie après 5 ans soit environ 5%.

VI. REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mes directeurs de recherche Pr François-Michel Boisvert et Pre Marie-Josée Boucher de m'avoir accueilli dans leur laboratoire respectif pour mes stages et ma maîtrise. Cette expérience m'a permis de développer mes connaissances en laboratoire et en résolution de problème, en plus d'améliorer mes capacités pratiques, orales et écrites. Je vous remercie de m'avoir soutenue et aidé tout au long de mon cheminement scolaire et professionnel, j'en ressors grandi.

J'aimerais également dire un énorme merci à Benoit Marchand et à Mélanie Douzich pour leur aide, leur conseil, leur écoute, et pour tant de fou rires partagés. Je veux aussi remercier Dominique Lévesque pour sa patience et son soutien technique. Enfin, je remercie les membres des deux laboratoires, Dominique Arsenault, Patrick Asselin-Mullen, Jennifer Blain, Marie-Line Dubois, Romain Drissi, Dominique Jean, Alex-Ann Mathieu et Émanuel Paré pour leur support moral et technique.

Avant de terminer, je tiens à remercier le Pr Brendan Bell pour avoir siégé sur mon comité de mentorat. J'aimerais également remercier Pr Bell et Pre Nathalie Perreault pour tous deux avoir pris le temps de corriger ce mémoire. Finalement, je remercie la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke pour l'octroi d'une bourse aux études supérieures et je remercie l'organisme subventionnaire fédéral du CRSNG pour l'octroi d'une bourse d'études supérieures du Canada.

VII. LISTE DES RÉFÉRENCES

- Allen, B. L., et Taatjes, D. J. (2015) The mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **16**(3): 155-166.
- Andersson, E. R., Sandberg, R., et Lendahl, U. (2011) Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* **138** (17): 2593-3612.
- Artavanis-Tsakonas, S., Muskavitch, M. A., et Yedvobnick, B. (1983) Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**(7): 1911-1981.
- Bian, Y., Ye, M., Song, C., Cheng, K., Wang, C., Wei, X., Zhu, J., Chen, R., Wang, F., et Zou, H. (2012) Improve the coverage for the analysis of phosphoproteome of HeLa cells by tandem digestion approach. *J. Proteome Res.* **11**: 2828-2837.
- Bierne, H., Tham, T. N., Batsche, E., Dumay, A., Lagillou, M., Kerméis-Golsteyn, S., Regnault, B., Seeber, J. S., Muchard, C., Feunteun, J., et Cossart, P. (2009) Human BAHD1 promotes heterochromatic gene silencing. *PNAS* **106**(23): 13826-13831.
- Blom, N., Gammeltoft, S., et Brunak, S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**: 1351-1362.
- Blom, N., Sicheritz-Pontéon, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., et Brunak, S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**: 1633-1649.
- Boisvert, F-M., Lam, Y. W., Lamont, D., et Lamond, A. I. (2010) A quantitative proteomics analysis of subcellular proteome localization and changes induced by DNA damage. *Mol. Cell. Proteomics* **9**:457-470.
- Borggreffe, T., et Oswald, F. (2008) The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**:1631-1646.
- Bray, S. J. (2006) Notch signaling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**(9): 678-689.
- Buchholz, R., Ringrose, L., Angrand, P. O., Rossi, F., et Stewart, A. F. (1996) Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: Implications for applied site-specific recombination. *Nuc. Acids Res.* **7**: 2745-2752.

Büchler, P., Gazdhar, A., Schubert, M., Giese, N., Reber, H. A., Hines, O. J., Giese, T., Ceyhan, G. O., Müller, M., Büchler, M. W., et Friess, H. (2005) The Notch signaling pathway is related to neurovascular progression of pancreatic cancer. *Ann. Surg.* **242**(6): 791-800.

Cao, Y-M., Wan, G-X., Sun, J-P., Cui, X-B., Hu, J-M., Liang, W-H., Zheng, Y-Q., Li, Y-Q., et Li, F. (2015) Implication of the Notch1-Snail/Slug-epithelial to mesenchymal transition axis for lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma. *Kaohsiung J. Med.* **31**(2): 70-76.

Chadwick, N., Zeef, L., Portillo, V., Fennessy, C., Warrander, F., Hoyle, S., et Buckle, A-M. (2009) Identification of novel target genes in T cell leukemia. *Mol. Cancer* **8**:35.

Chan, H. M., et La Thanque, N. B. (2001) p300/CBP proteins : HAT for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell. Sci.* **114**(pt 13): 2363-2373.

Chen, Z., et Lu, W. (2015) Roles of ubiquitination and SUMOylation on prostate cancer : Mechanisms and clinical implications. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 4560-4580.

Cheng, H., Qin, Y., Fan, H., Su, P., Zhang, X., Zhang, H., et Zhou, G. (2013) Overexpression of CARM1 in breast cancer correlated with poorly characterized clinicopathologic parameters and molecular subtypes. *Diagn. Pathol.* **8**:129.

Chiang, M. Y., Xu, M. L., Histen, G., Shestova, O., Roy, M., Pear, W. S., et Aster, J. C. (2006) Identification of a conserved negative regulatory sequence that influences the leukemogenic activity of NOTCH1. *Mol. Cell. Biol.* **26**(16): 6261.

Choi, Y-H., Ann, E-J., Yoon, J-H., Mo, J-S., Kim, M-Y., et Park, H-S. (2013) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV) enhances osteoclast differentiation via the up-regulation of Notch1 protein stability. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**(1) : 69-79.

Coschi, C. H., Martens, A. L., Ritchie, K., Francis, S. M., Chakrabarti, S., Berude, N. G., et Dick, F. A. (2010) Mitotic chromosome condensation mediated by the retinoblastoma protein is tumor-suppressive. *Genes Dev.* **24**: 1351-1363.

Cox, J., et Mann, M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**:1367-1372.

Cox, J., Matic, I., Higer, M., Nagaraj, N., Selbach, M., Olsen, J. V., et Man, M. (2009) A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat. Protocols* **4**: 698-705.

Dardenne, E., Espinoza, M., P., Fattet, L., Germann, S., Lambert, M-P., Chakrama, F. Z., Samaan, S., Desmet, F-O., Tranchevant, L-C., Duterte, M., Rimokh, R., Bourgeois, C. F., et Auboeuf, D. (2015) RNA helicase DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, miRNA, and splicing programs in cell differentiation. *Cell Reports* **7**: 1900-1913.

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

Deng, W., et Roberts, S. G. E. (2006) Core promoter elements recognized by transcription factor IIB. *Biochem. Soc. Trans.* **34**(6): 1051-1053.

Diez, H., Fischer, A., Winkler, A., Hu, C-J., Hatzopoulos, A. K., Breier, G., et Gessler, M. (2007) Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Exp. Cell. Res.* **313**(1): 1-9.

Dohda, T., Maljukova, A., Liu, L., Heyman, M., Grander, D., Brodin, D., Sangfelt, O., et Lendahl, U. (2007) Notch signaling induces SKP2 expression and promotes reduction of p27Kip1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Exp. Cell. Res.* **313**(14): 3141-3142.

Drissi, R., Dubois, M-L., Douziech, M., et Boisvert, F-M. (2015) Quantitative proteomics reveals dynamic interaction of the minichromosome maintenance complex (MCM) in the cellular response to Etoposide induced DNA damage. *Mol. Cell. Proteomics* **14**(7): 2002-2013.

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

Edlund, H. (2001) Factors controlling pancreatic cell differentiation and function. *Diabetologia* **44**(9): 1071-1079.

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

Fiuza, U-M., et Arias, A. M. (2007) Cell and molecular biology of Notch. *J. Endocrinol.* **195**(3): 459-474.

Friedmann, D. R., Wilson, J. J., et Kovall, R. A. (2008) RAM-induced allostery facilitates assembly of a Notch pathway active transcription complex. *J. Biol. Chem.* **283**: 14781-14791.

Fryer, J., White, B., et Jones, K. A. (2004) Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol. Cell.* **16**(4): 509-512.

Fujikura, J., Hosoda, K., Kawaguchi, Y., Noguchi, M., Iwakura, H., Odori, S., Mori, E., Tomita, T., Hirata, M., Ebihara, K., Masuzaki, H., Fukuda, A., Furuyama, K., Tanigaki, K., Yabe, D., et Nakao, K. (2007) Rbp-j regulates expansion of pancreatic epithelial cells and their differentiation into exocrine cells during mouse development. *Dev. Dyn.* **236**(10): 2779-2791.

George, B., Horn, D., Bayo, P., Zaoui, K., Flechtenmacher, C., Grabe, N., Plinkert, P., Krizhanovsky, V., et Hess, J. (2015) Regulation and function of Myb-binding protein 1A (MYBBP1A) in cellular senescence and pathogenesis of head and neck cancer. Regulation and function of Myb-binding protein 1A (MYBBP1A) in cellular senescence and pathogenesis of head and neck cancer. *Cancer Lett.* **358**(2): 191-199.

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

Guarani, V., Deflorian, G., Franco, C. A., Kruger, M., Phng, L-K., Bentley, K., Toussaint, L., Dequiet, F., Mostoslavsky, R., Schmidt, M. H., Zimmerman, B., Brandes, R. P., Mione, M., Westphal, C. H., Braun, T., Zeiher, A. M., Gerhardt, H., Dimmeler, S., et Potente, M. (2011) Acetylation-dependent regulation of endothelial Notch signaling by SIRT1 deacetylase. *Nature.* **473**(7346): 234-238.

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

Herranz, D., Ambesi-Impiombato, A., Palomero, T., Schnell, S. A., Belver, L., Wendorff, A. A., Xu, L. Castillo-Martin, M., Llobet-Navas, D., Cordon-Cardo, C., Clappier, E., Soulier, J., et Ferrando, A. A. (2014) A NOTCH1-driven MYC enhancer promotes T cell development, transformation and acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* **20**(10): 1130-1137.

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

Huang, D. W., Sherman, B. T., et Lempicki, R. A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**(1): 44-57.

Jensen, J., Pederson, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, R., Srup, P., et Madsen, O. D. (2000) Control of endodermal endocrine development by Hes1. *Nat. Genet.* **24**(10): 36-44.

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Cheng-Ho Lin, J., Leary, R. J., Argenendt, P., Manko, P., Carter, H., Kamiyame, H., Jimeno, A., Hong, S-M., Fu, B., Lin, M-T., Calhoun, E S., Kamiyama, M., Walter, K., Mikolskaya, T., Nikolsky, Y., Hartigan, J., Smith, D., Hidalgo, M., Leach, S.D., Klein, A. P., Jaffe, E. M., Goggins, M., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C., Eshleman, J. R., Kern, S. E., Hruban, R. H., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W. (2008) Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**(5897): 1801-1806.

Kadam, S., et Emerson, B. M. (2003) Transcriptional Specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell.* **11**: 377-389.

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

Kao, H-J., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C. R., Evens, R. M., et Kadesch, T. (1998) A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev.* **12**(15): 2269-2277.

Kim, M-Y., Ann, E-J., Kim, J-Y., Mo, J-S., Park, J-H., Kim, S-Y., Seo, M-S., et Park, H-S. (2007) Tip60 acetyltransferase acts as a negative regulator of Notch1 signaling by means of acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **27**(18): 6506.

Kimura, K., Satoh, K., Kanno, A., Hamada, S., Hirota, M., Endoh, M., Masamune, A., et Shimosegawa, T. (2006) Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice. *Cancer Sci.* **98**(2): 155-162.

Kopan, R., et Ilagan, G. (2009) The canonical Notch signaling pathway : Unfolding the activation mechanism. *J. Cell.* **137**(2): 137-233.

Kovall, R. A., et Hendrickson, W. A. (2004) Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *EMBO J.* **23**(17): 3441-3451.

Kuruka, H., et Honjo, T. (2000) Functional interaction between the mouse Notch1 intracellular region and histone acetyltransferase PCAF et GNC5. *J. Biol. Chem.* **275**(22): 17211-17220.

Larivière, L. Seizl, M., et Cramer, P. (2012) A structural perspective on mediator function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **24** : 305-313.

Larsen, M. R., Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Roepstorff, P., et Jorgensens, T. J. D. (2005) Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using Titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell. Proteomics* **4**(7): 873-886.

Li, H., Gao, H., Bijukchle, S. M., Wang, Y., et Li, T. (2013) PIAS3 may represent a potential biomarkers for diagnosis and therapeutic of human colorectal cancer. *Med. Hypotheses* **81**(6): 1151-1154.

- Li, S., Zhang, X., Wang, Y., Ji, H., Du, Y., et Liu, H. (2012) DAPT protects brain against cerebral ischemia by down-regulating the expression of Notch1 and Nuclear factor kappa B in rats. *Neurol. Sci.* **33**: 1257-1264.
- Mann, M. (2006) Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**(12): 952-958.
- Marchand, B., Arsenault, D., Raymond-Fleury, A., Boisvert, F-M., et Boucher M-J. (2015) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibition induces prosurvival autophagic signals in human pancreatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* **290**(2): 5592-5605.
- McCarthy, J. V., Twomey, C., et Wujek, P. (2009) Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis γ -secretase activity. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**:1534-1555.
- McDowell, T. L., Gibbons, R. J., Sutherland, H., O'Rourke, D. M., Bickmore, W. A., Pombo, A., Turley, H., Gatter, K., Picketts, D. J., Buckle, V. J., Chapman, L., Rhodes, D., et Higgs, D. R. (2009) Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at the pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *PNAS* **23**(96): 13983-13988.
- Meier-Stiegen, F., Swanbeck, R., Bernoth, K., Martini, S., Hieronymus, T., Ruau, D., Zenke, M., et Just, U. (2010) Activated Notch1 target genes during embryonic cell differentiation depend on the cellular context and include lineage determinants and inhibitors. *PLoS ONE* **5**(7): e11481.
- Mendez, R., et Stillman, B. (2000) Chromatin association of human origin recognition complex, Cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: Assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol. Cell. Biol.* **20**(22): 8602-8612.
- Mullendore, M. E., Koostra, J-B., Li, Y-M., Offerhaus, G., J., Fan, X., Henderson, C. M., Matsui, W., Eberhart, C. G., Maitra, A., et Feldmann, G. (2009) Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumour initiation and tumour maintenance in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**(7): 2291-2301.
- Murata, K., Hattori, M., Hirai, N., Shinozuka, Y., Hirata, H., Kageyama, R., Sakai, T., et Minato, N. (2005) Hes1 directly controls cell proliferation through the transcriptional repression of P27^{Kip1}. *Mol. Cell. Biol.* **25**(10):4262-4271.
- Mysliwiec, P., et Boucher, M-J. (2009) Targeting Notch signaling in pancreatic cancer patients-rationale for new therapy. *Adv. Med. Sci.* **54**(2): 136-142.
- Orphanides, G., et Reinberg, D. (2002) A unified theory of gene expression. *Cell* **108**: 439-451.
- Oswald, F., Tauger, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., Liptay, S., et Schmid, R. M. (2001) p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol. Cell. Biol.* **21**(21): 7761-7774.

Oswald, F., Winkler, M., Cao, Y., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Knochel, W., et Borggreffe, T. (2005) RBP-J κ /SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Mol. Cell. Biol.* **25**(23):10379-10390.

Palermo, R., Checquolo, S., Bellavia, D., Talora, C., et Screpanti, I. (2014) The molecular basis of Notch signaling regulation: A complex simplicity. *Curr. Mol. Med.* **14**(1):34-44.

Palomero, T., Lim, W. K., Odom, D. T., Sulis, M. L., Real, P. J., Margolin, A., Barnes, K. C., O'Neil, J., Neubergh, D., Weng, A. P., Aster, J. C., Sigaux, F., Soulier, J., Look T. A., Young, R. A., Califano, A., et Ferrando, A. A. (2006) NOTCH1 directly regulates *c-MYC* and activates a feed-forward transcriptional network promoting leukemic cell growth. *PNAS* **103**(48): 18261-18266.

Pestova, T., V., et Hellen, C. U. T. (2003) Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes Dev.* **17**(2): 181-186.

Plentz, R., Park, J-S., Rhim, A. D., Abravanel, D., Hezel, A. F., Sharma, S. V., Gurusurthy, S., Desphande, V., Kenefic, C., Setleman, J., Majumder, P. J., Stanger, B. Z., et Bardeesy, N. (2009) Inhibition of γ -secretase activity inhibits tumor progression in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* **138**(5): 1741-1749.

Popko-Scibor, A. E., Lindberg, M. J., Hansson, M. L., Holmund, T., et Wallberg, A. E. (2011) Ubiquitination of Notch1 is regulated by MAML1-mediated p300 acetylation of Notch1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**: 300-306.

Radtke, R., et Ral, K. (2003) The role of Notch1 in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor. *Nat. Rev. Cancer* **3**(10): 756-767.

Rand, M. D., Grimm, L. M., Artanais-Tsakonas, S., Patriub, V., Blackbow, S. C., Skilar, J., et Aster, J. C. (2000) Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric Notch receptors. *Mol. Cell. Biol.* **20**(5): 1825-1835.

Ranganathan, P., Weaver, K. L., et Capobianco, A. J. (2011) Notch signaling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat. Rev. Cancer* **11**(5): 338-351.

Roux, K. J., Kim, D. I., Manfred, R., et Burke, B. (2012) A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* **196**(6): 801-810.

Sanchez-Irizarry, C., Carpenter, A. C., Weng, A. P., Pear, W. S., Aster, J. C., et Blacklow S. C. (2004) Notch subunit hétérodimérisation and prevention of ligand-independant proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and LNR repeats. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 9265-9273.

Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., Green, R., Shen, B., et Liu, J. O. (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* **6**(3): 209-217.

Schönberger, J., Wang, L., Shin, J. T., Kim, S. D., Depreux, F. S., Zhu, H., Zon, L., Pizard, A., Kim, J. B., MacRae, C. A., Mugall, A., J., Seidmen, J. G., et Seidmen, C. E. (2005) Mutation in the transcriptional coactivator *EYAA4* causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat. Genet.* **37**(4): 418-422.

Schulz, S., Chachami, G., Kozaczekiewicz, L., Winter, U., Stankovic-Valentin, N., Haas, P., Hofmann, K., Urlaub, H., Ovaas, H., Wittbrodt, J., Meulmeester, E., et Melchior, F. (2012) Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO Rep.* **13**(10): 930-938.

Sharma, I., Monga, R., Singh, N., Datta, T. K., et Singh, D. (2012) Ovary-specific novel peroxisome proliferator activated receptors-gamma transcripts in buffalo. *Gene* **504**: 245-252.

Shi, Y., Sawada, J-I., Sui, G., Affar, E. B., Whetstone, J. R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M. P., Nakatani, Y., et Shi, Y. (2003) Coordinate histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex.

Sikorowski, T. W., et Buratowski, S. (2009) The basal machinery: beyond the general transcription factors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **21**(3): 344-351.

South, A. P., Cho, R. J., et Aster, J. C. (2012) The double-edged of Notch signaling in cancer. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **23**(4): 468-464.

Swaney, D. L., Wenger, C. D., et Coon, J. J. (2009) Value of using multiple protease for large-scale spectrometry-based proteomics. *J. Proteome Res.* **9**: 1323-1329.

Takahashi, S., Furuyama, K., Kobayashi, A., Taketani, S., Harigae, H., Yamamoto, M., Igarashi, K., Sasaki, T., et Hayash, N. (2000) Cloning of a coproporphyrinogen oxidase promoter regulatory element binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**: 596-602.

Thiede, B., Lamer, S., Mattow, J., Siejak, F., Dimmler, C., Rudel, T., et Jungblut, P. R. (2000) Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **14**(6): 496-502.

Tremblay, I., Paré, E., Arsenault, D., Douziech, M., et Boucher, M-J. (2013) The MERK/ERK pathway promotes NOTCH signaling in pancreatic cancer. *PLoS ONE* **8**(12): e85502.

Trinkle-Mulcahy, L., Boulton, S., Lam, Y. W., Urica, R., Boisvert, F-M., Vandermoere, F., Morrice, N. A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H., et Lamond, A. (2008) Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J. Cell. Biol.* **183**(2): 223-239.

Van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F., et Clevers, H. (2005) Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**(7044): 959-963.

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

Wallberg, A. E., Pederson, K., Lendahl, U., et Roeder, R. G. (2002) p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by Notch intracellular domain In vitro. *Mol. Cell. Biol.* **22**(22): 7812-7819.

Wang, Y-L., Faiola, F., Xu, M., Pan, S., et Martinez, E. (2008) Human ATAC is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **283**(49): 33808-33815.

Wang, Z., Zhang, Y., Li, Y., Banerje, S., Liao, J., et Sarkar, F. H. (2006) Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **5**(3): 483-493.

Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P., Silverman, L. B., Sanchez-Irisarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., Aster, J. C. (2004) Activating mutations of *NOTCH1* in Human T cell Acute Lymphoblastic leukemia. *Science*. **306**(5694): 269-271.

Weng, A. P., Millholland, J. M., Yashiro-Ohtani, Y., Acangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., del Bianco, C., Rodriguez, C. G., Sai, H., Tobias, J., Li, Y., Wolfe, M. S., Shachaf, C., Felsher, D., Blacklow, S. C., Pear, W. S., et Aster, J. C. (2006) *c-MYC* is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Gene Dev.* **20**(15):2096-20109.

Wilde, I. B., Brack, M., Winget, J. M., et Mayor, T. (2011) Proteomic characterization of aggregating proteins after the inhibition of the ubiquitine protéasome system. *J. Proteome Res.* **10**(3): 1062-1072.

Witkiewicz, A. K., McMillan, E. A., Balaji, U., Baek, G., Lin, W-C., Mansour, J., Mollae, M., Wagner, K-U., Koduru, P., Yopp, A., Choti, M. A., Yeo, C. J., McCue, P., White, M. A., et Knudsen, E. S. (2015) Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat. Commun.* **6**: 6744.

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

Xie, S-T. (2014) Expression, purification, and crystal structure of N-terminal domains of human ubiquitine-activating enzyme (E1). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**(9): 1542-1549.

Yatim, A., Benne, C., Sobhian, B., Laurent-Chabalier, S., Deas, O., Judde, J-G., Lelievre, J-D., Levy, Y., et Benkiranne, M. (2012) NOTCH1 nuclear interactome reveals key regulators of its transcriptional activity and oncogenic function. *Mol. Cell.* **48**: 445-458.

Zhang, D., Wang, Y., Dai, Y., Wang, J., Suo, T., Pan, H., Liu, H., et Shen, S. (2015) Down regulation of RIP140 in hepatocellular carcinoma promoted the growth and migration of the cancer cells. *Tumor Biol.* **36**: 2077-2085.

