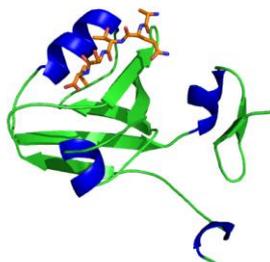


**FACULTE DE MEDECINE DE LA TIMONE**  
**Université de la Méditerranée Aix-Marseille II**

**Master recherche 2<sup>ème</sup> année**  
**Science de la santé, Mention pathologie humaine**  
**Spécialité Oncologie : Pharmacologie et thérapeutique**

**Identification de nouvelles interactions entre les protéines  
à domaines PDZ et les protéines kinases**



**Stage réalisé sous la direction du Pr. J.P. Borg**  
**Equipe : polarité, signalisation et cancer**  
**Unité U891 INSERM - Université de la Méditerranée**  
**Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM)**  
**Institut Paoli-Calmettes**

**Soutenu le 28 juin 2010 par BLIBEK Karim**

# Remerciements

Au Pr Borg Jean-Paul,  
Directeur de l'équipe polarité cellulaire, signalisation et cancer, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche et pour ses encouragements tout au long de mon stage.

*Je lui présente mon Hommage respectueux.*

A Frédérique Lembo,  
Pour m'avoir accompagné dans la réalisation de mon projet ainsi que pour l'intérêt et la motivation manifestés pour la réussite de ce travail.

*Je la prie de croire à ma profonde gratitude et à mon respectueux attachement.*

A toute l'équipe polarité cellulaire, signalisation et cancer,  
Ce stage a été rendu très agréable par l'ambiance très familiale que vous savez faire régner au sein de l'équipe.

*Merci d'avoir facilité mon adaptation.*

A toute l'unité UMR891-INSERM,  
Pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires au bon déroulement de mon stage de master 2, en plus de votre générosité illustrée par vos précieux conseils.

*Je vous témoigne ici ma sincère reconnaissance.*

Aux membres du jury,  
Qui m'ont fait honneur d'examiner mon travail.

A mes très chers parents, qui n'ont cessé de m'encourager et qui ont toujours donné le meilleur d'eux même pour me voir réussir.

A toute ma famille à laquelle je témoigne mon entière affection.

A mes amis (es) qui m'ont toujours soutenu et cru à ma réussite.

A tous ceux qui ont croisé mon chemin et qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## ABREVIATIONS:

**AD** : Domaine d'activation de GAL4.  
**ADE2** : Gène de la prototrophie à l'Adénine.  
**att** : Site de recombinaison homologue du phage  $\lambda$ .  
**BD** : Domaine de fixation de GAL4.  
**BET**: Bromure d'éthidium.  
**coIP** : Coimmunoprécipitation.  
**Ct kinase**: Extrémité C terminale de la kinase.  
**DLG**: Disc large homology.  
**DVL** : Dishevelled.  
**ERBB2 (HER2)** : Récepteur tyrosine kinase de la famille EGFR.  
**ERBIN**: ErbB2 interacting protein.  
**GAL4** : facteur de transcription GAL4.  
**GST** : Glutathione S-transferase.  
**H** : Histidine.  
**HA** : Hémagglutinine.  
**HEK** : Human Embryonic Kidney  
**HIS3** : Gène de la prototrophie à l'Histidine.  
**HPRD** : Human protein resource database.  
**Inad**: Inactivation no afterpotential D.  
**JNK**: c-Jun N-terminal Kinase.  
**L** : Leucine.  
**lacZ** : Gène qui code pour la  $\beta$ -galactosidase.  
**LB** : Milieu de culture des bactéries Luria Bertani.  
**LEU2** : Gène de la prototrophie à la Leucine.  
**MATa** : Type sexuel a.  
**MAT $\alpha$**  : Type sexuel  $\alpha$ .  
**MCS** : Site multiple de clonage.  
**MEL1** : Gène qui code pour la  $\beta$ -galactosidase.  
**PDGFR**: Platelet-derived growth factor receptor.  
**PDZ** : PSD95/DLG/ZO-1.  
**PEG** : Polyéthylène glycol.  
**PRKD1** : Protéine kinase D1.  
**PRKD2** : Protéine kinase D2.  
**PSD95** : Post Synaptic Density-95.  
**PTEN**: Phosphatase and tensin.  
**SC** : Milieu synthétique complet.  
**SGK1** : Serum/glucocorticoid regulated kinase 1  
**siRNA** : Small interfering RNA.  
**SNX27** : Sorting nexin family member 27  
**Src** : Sarcoma kinase.  
**ssDNA** : ADN de sperme de saumon.  
**TAE**: Tris, Acétate, EDTA.  
**TELiAc** : Tris-Edta/ Acétate de Lithium.  
**TRP1** : Gène de la prototrophie au Tryptophane.  
**W** : Tryptophane.  
**WNT**: Wingless-type MMTV integration site family.  
**ZO1** : *Zonula occludens*.

# Sommaire

## CHAPITRE I: INTRODUCTION

I.1. Cancer, signalisation et polarité.....	1
I.2. Les protéines à domaines PDZ .....	2
I.3. Le domaine PDZ.....	2
I.4. Importance physiologique des protéines à domaine PDZ.....	2
I.5. Régulation des interactions PDZ-dépendantes.....	3
I.6. Les protéines Kinases.....	3
I.7. Problématique.....	4

## CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

II.1. Souches de levures utilisées.....	5
II.2. Souches bactériennes utilisées.....	6
II.3. Les plasmides utilisés pour le clonage Gateway.....	6
II.4. Ressource des domaines PDZ.....	7
II.5. Présélection des kinases à tester.....	7
II.6. Liste des kinases testées en double hybride.....	8
II.7. Préparation de la ressource des séquences C terminale de kinases.....	8
II.8. Double hybride en levure.....	10

## CHAPITRE III: RESULTATS

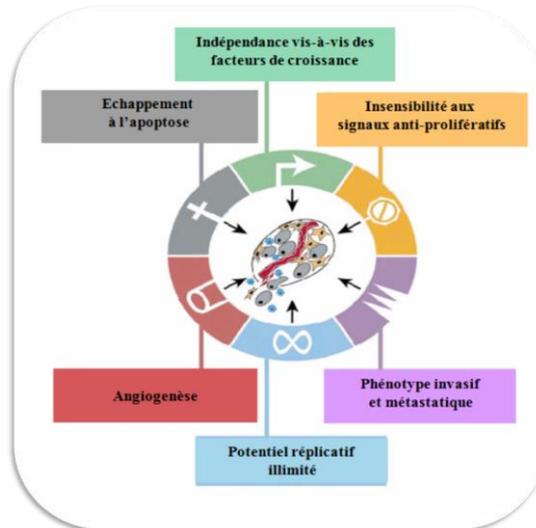
III.1. Obtention des séquences C terminales des kinases par amplification.....	12
III.2. Clonage Gateway.....	13
III.3. Transformation des levures.....	13
III.4. Test de transactivation du système.....	14
III.5. Mating des levures Y187 et AH109.....	14
III.6. Stockage des résultats des matings .....	15
III.7. Comparaison des résultats avec la bibliographie .....	15
III.8. Exploitation des résultats des matings en bioinformatique.....	15
III.9. Résultats préliminaires de la confirmation biochimique .....	16

## CHAPITRE IV: DISCUSSIONS

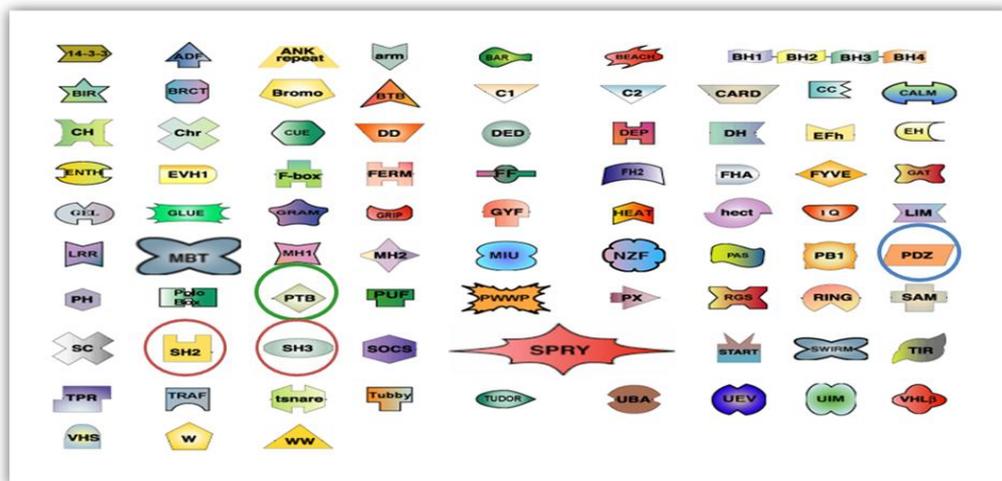
IV.1. Le choix des séquences Ct kinases.....	17
IV.2. Clonage et transformation des séquences Ct kinases .....	17
IV.3. Résultats des tests d'interactions par double hybride en levure.....	17
IV.4. Problème de la nomenclature des peptides.....	18
IV.5. Analyse bioinformatique .....	18
IV.6. Confirmation biochimique de certaines interactions .....	19

## CHAPITRE V: CONCLUSION-PERSPECTIVES.....20

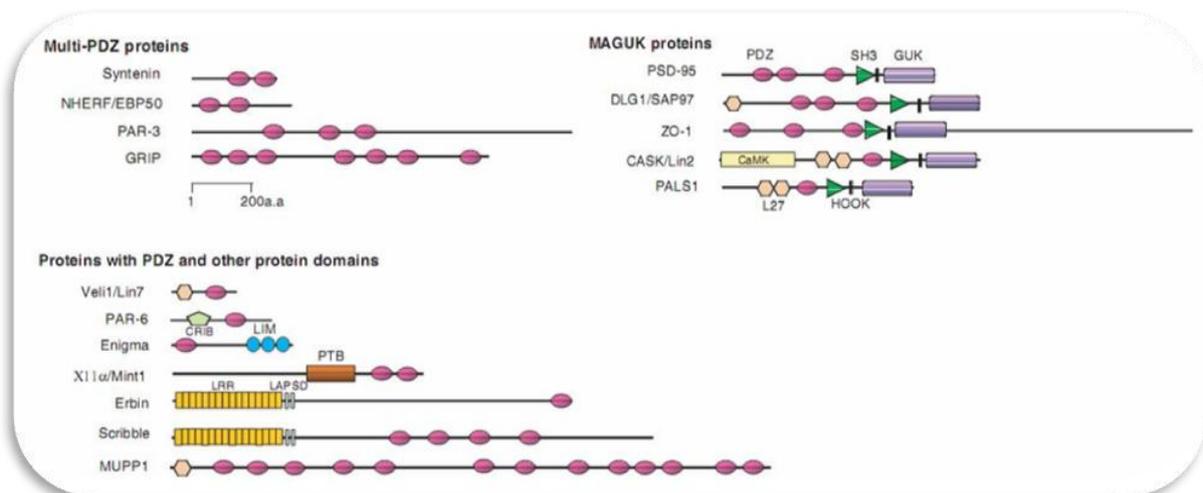
## BIBLIOGRAPHIE



**Figure 1 :** Altérations moléculaires au cours de la tumorigénèse (Hanahan et al., 2000).



**Figure 2 :** Domaines d'interactions protéiques (<http://pawsonlab.mshri.on.ca/>).



**Figure 3 :** Classification des protéines à domaine PDZ (Nourry et al., 2003).

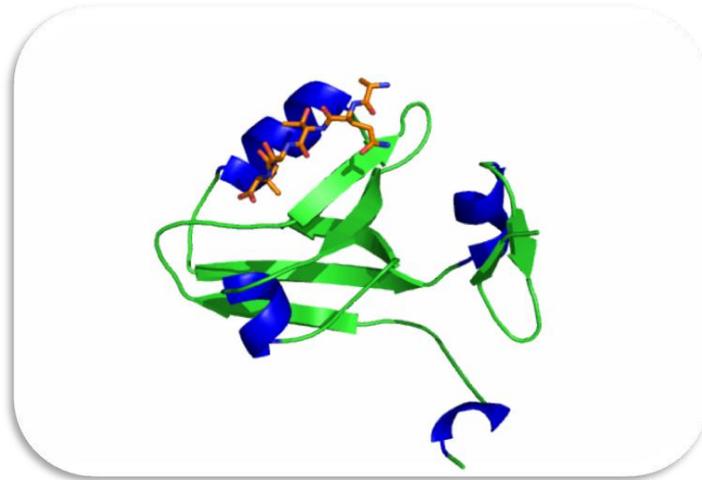
## CHAPITRE I: INTRODUCTION

### I.1. Cancer, polarité et signalisation

Le cancer se définit comme étant l'accumulation d'altérations moléculaires (**Figure 1**) dont les effets combinés, conduisent à l'apparition d'une tumeur, et à son évolution vers un profil de plus en plus agressif et résistant aux traitements (**Hanahan et Weinberg, 2000**). Ces altérations visent à rompre l'organisation des cellules et à perturber l'homéostasie tissulaire. Dans 90% des cas, les tumeurs humaines chez l'adulte ont pour origine la transformation maligne des cellules épithéliales, provoquée par la dérégulation d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur. Au niveau des tissus à structure polarisée, tels que les tissus épithéliaux, les cellules se caractérisent par la formation de domaines membranaires distincts avec des fonctions spécialisées. La conception, le maintien et les fonctions de ces tissus sont dépendants des mécanismes de la polarité (planaire et apicobasale) et contrôlent les relations avec le milieu extérieur. Cette organisation est assurée par un canevas de protéines de surface connectées à des réseaux intracellulaires de molécules de structure et de signalisation (**Jaulin-Bastard et al., 2005**). Au sein de ces échafaudages moléculaires, les protéines interagissent entre elles via différents domaines d'interaction protéiques qui assurent les rôles d'adaptateurs. Ces domaines, assez bien caractérisés aujourd'hui, sont classés en plusieurs familles (**Figure 2**), parmi lesquelles on peut citer : les domaines SHC (Src-Homology Collagren proteins), les domaines PTB (Phospho Tyrosin Binding) et les domaines PDZ (PSD95/DLG/ZO-1). Notre équipe s'intéresse plus particulièrement à la famille des protéines adaptatrices à domaines PDZ.

### I.2. Les protéines à domaines PDZ

Les protéines à domaines PDZ sont retrouvées de façon importante chez plusieurs espèces. Au niveau du génome humain, on estime au total qu'il existe 440 domaines PDZ qui sont répertoriés dans plus de 260 protéines (**Skelton et al., 2003**). Un grand nombre de ces protéines a été identifié comme interacteur avec des canaux ioniques (**Gao & Chen, 2010**), des enzymes de signalisation (**Dai F et al., 2003**) ou des molécules d'adhérence (**Tchachenko et al., 2006**). D'autre part, il a été rapporté qu'elles sont responsables de l'adressage de protéines vers des compartiments spécifiques de la membrane plasmique (**Jaulin-Bastard et al., 2005**). Parmi les plus étudiées, on trouve les familles PAR, ZO, DLG et LIN (**Figure 3**). Actuellement, il émerge un rôle important des protéines à domaines PDZ dans les maladies humaines, ce qui les place dans le rang des cibles prometteuses pour l'établissement de nouveaux médicaments (**Dev K. K., 2004**).

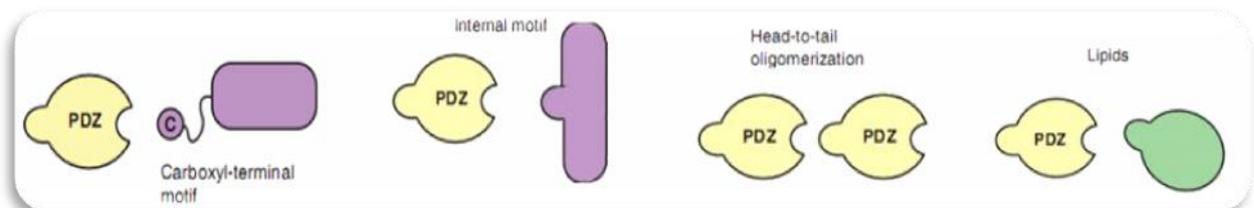


**Figure 4** : Représentation de la structure cristallographique du domaine PDZ (PSD-95) complexée à un ligand (en orange). On observe que le domaine est représenté sous forme de six brins  $\beta$  ( $\beta$ A- $\beta$ F en vert) entourés de deux hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ A et  $\alpha$ B en bleue). L'interaction avec le ligand se fait entre le brin  $\beta$ B et  $\alpha$ B. La « carboxyle-binding loop » contient la séquence signature Gly-Leu-Gly-Phe (Doyle D.A et al., 1996).

**Tableau I** : Motifs d'interactions reconnus par les domaines PDZ (Sheng et al., 2002).

Classe I	Classe II	Classe III
X-(S ou T)-X-V	X- $\Psi$ -X $\Psi$	X-(D ou E)-X- $\Psi$
X-(S ou T)-X-L		

X= Un acide aminé quelconque,  $\Psi$ = un acide aminé hydrophobe.



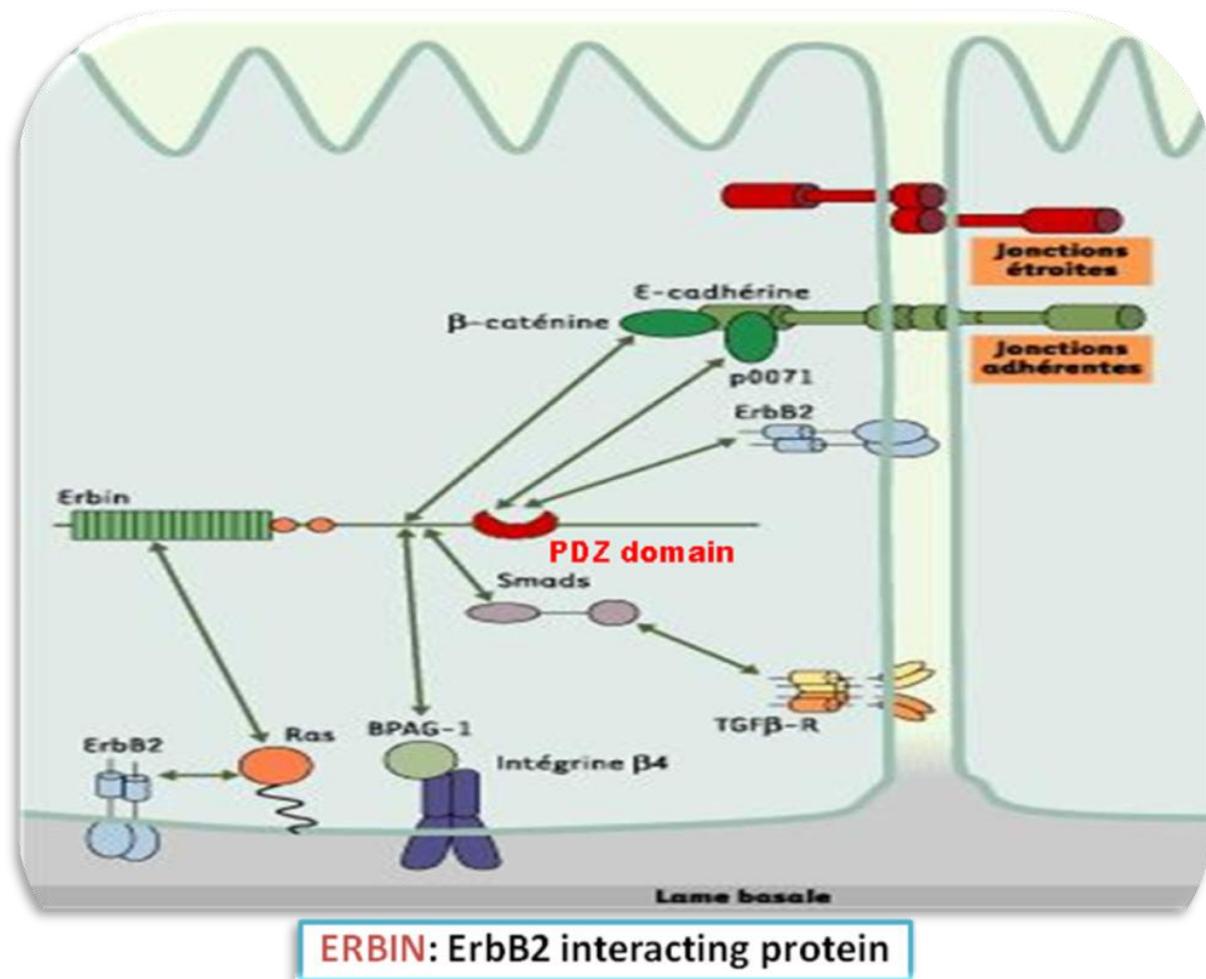
**Figure 5** : Les différents modes d'interactions des domaines PDZ. (Nourry et al., 2003).

### I.3. Le domaine PDZ

Ce domaine a été découvert pour la première fois chez les métazoaires à partir des séquences génomiques de *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* et *Homo sapiens* (**Baruch et al., 2001**). Il s'agit d'un domaine très abondant chez les eucaryotes multicellulaires, impliqué dans les interactions protéines-protéines, dans la transduction du signal et dans les jonctions cellulaires. Le domaine PDZ doit son nom aux trois premières protéines découvertes, dans les années 1990, qui étaient pourvues de ce motif de 90 à 100 acides aminés: la protéine PSD-95 (Post Synaptic Density) intervenant au niveau de la synapse, la protéine DLG (*Drosophila melanogaster* disc large protein) qui est un suppresseur de tumeur chez la drosophile et la protéine ZO-1 (*Zonula occludens*) qu'on retrouve au niveau des jonctions cellulaires (**Nourry et al., 2003**). Ces domaines sont également appelés DHR (DLG Homology Region) et la présence d'un térapeptide conservé (Gly-Leu-Gly-Phe) leur vaut le nom de « GLGF ». La structure cristallographique du domaine PDZ montre qu'il s'agit d'une structure globulaire compacte dont le repliement est un tonneau de six brins  $\beta$  ( $\beta$ A- $\beta$ F) encadré par deux hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ A et  $\alpha$ B) (**Figure 4**) (**Doyle D.A et al., 1996**). Ce domaine protéique interagit généralement avec une molécule cible en reconnaissant, de manière spécifique, des motifs constitués de résidus d'acides aminés en extrémité C terminale (**Niethammer M. et al., 1996**). Sur s séquences consensus des 4 derniers acides aminés (**Tableau I**). Toutefois, ces domaines peuvent aussi interagir avec des séquences peptidiques internes (**Hillier et al., 1999**), former des dimères PDZ-PDZ (**Im et al., 2003**) et même se lier à des séquences lipidiques (**Zimmermann et al., 2002**) (**Figure 5**).

### I.4. Importance physiologique des protéines à domaine PDZ

De par la diversité et l'abondance des domaines PDZ dans les cellules, il apparaît évident que plusieurs fonctions cellulaires et biologiques, particulièrement celles impliquant des complexes de transduction des signaux, sont affectées par des interactions PDZ-dépendantes. La relevance physiologique du ciblage, de l'ancrage et de l'échafaudage via les domaines PDZ était déjà évident pour InaD, une protéine à domaine PDZ ayant un rôle important dans la régulation négative de la cascade de signalisation des protéines G activées par les faisceaux lumineux, au niveau des photorécepteurs de la Drosophile (**Tsunoda et al., 1997**). Plusieurs anomalies sont associées à une déficience en protéines à domaines PDZ qui sont primordiales pour l'établissement de la polarité des tissus épithéliaux et neuronaux (**Nourry et al., 2003**). Chez *C. elegans*, la mutation du gène *let-413* (un orthologue d'*Erbin*) affecte l'intégrité épithéliale, provoque des défauts d'assemblage des jonctions adhérentes et désorganise le



**Figure 6:** Au niveau du tissu épithélial, la localisation basolatérale du récepteur tyrosine kinase ErbB2 est déterminée par son interaction avec la protéine à domaine PDZ ERBIN (ErbB2 interacting protein) (Jaulin-Bastard et al., 2005).

squelette d'actine, menant ainsi, à de graves défauts de morphogenèse chez l'embryon (**Legouis et al., 2000**).

La mutation de certaines protéines à domaines PDZ induisant une perte de la polarité cellulaire est corrélée directement avec l'agressivité de la tumeur. En effet, la mutation perte de fonction de DLG aboutit à une absence de l'arrêt du cycle cellulaire, une augmentation de la croissance et une perte de polarité sévère chez la drosophile (néoplasie tumorale) (**Humbert et al., 2003**).

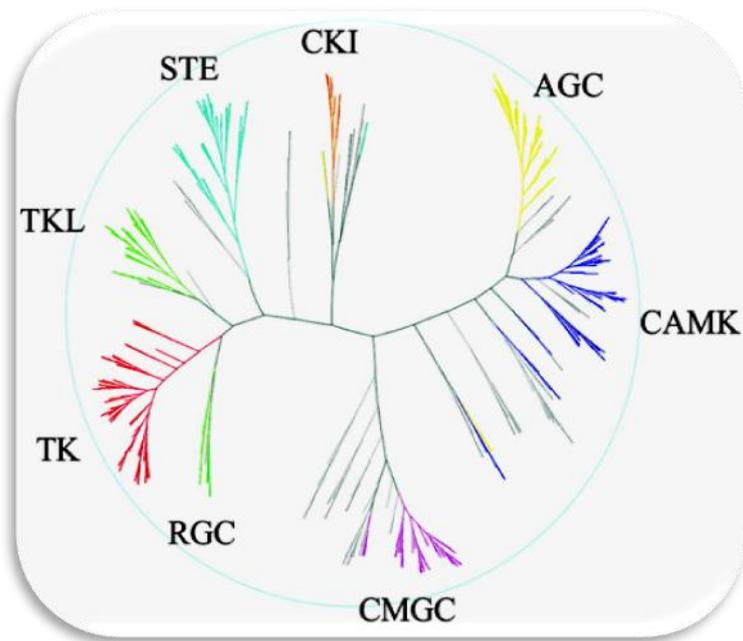
L'importance de l'implication des domaines PDZ dans l'apparition des cancers est également corroborée par leurs interactions avec les protéines oncovirales. En effet, de nombreux virus ont pour cibles les protéines à PDZ : en produisant des ligands de PDZ qui rompent les complexes protéiques de l'hôte, perturbent la cytoarchitecture épithéliale et promeuvent la tumorigénèse (**Gardiol et al., 1999; Nakagawa et al., 2000**).

### **I.5. Régulation des interactions PDZ-dépendantes**

Les protéines à domaines PDZ ont à présent un rôle reconnu dans le développement des cancers, en régulant de différentes manières (signalisation, adressage, localisation,...etc.) les fonctions de phosphatases et/ou de kinases (**Valiente et al., 2005**). Par exemple, la phosphatase suppresseur de tumeur PTEN ainsi que des kinases pro-oncogènes (ErbB2, PDGFR, Src...) interagissent, via leur extrémité C-terminale, avec des protéines à domaines PDZ importantes pour leur fonction et leur activité oncogène (**Figure 6**) (**Nourry et al., 2003 ; Radziwill et al., 2007**). Il apparaît alors évident qu'une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de ces interactions PDZ-dépendantes est importante et permettra d'apporter des éclairages nouveaux sur leur implication dans différentes pathologies et particulièrement le cancer. Ainsi, la recherche de nouvelles interactions entre les domaines PDZ et les kinases du protéome humain permettra d'établir une liste précieuse d'informations au service de la communauté scientifique.

### **I.6. Les protéines Kinases**

Ce sont des enzymes de la famille des transférases qui catalysent la réaction du transfert d'un ion phosphate sur une molécule cible afin de l'activer ou de l'inhiber. Elles interviennent dans la plupart des processus de transduction des signaux et jouent un rôle de régulateurs des voies de signalisation. Considérées souvent comme des oncogènes, les gènes codant pour les kinases constituent, une fois mutés, l'un des acteurs majeurs de la tumorigénèse.



**Figure 7:** Classification structurale et fonctionnelle des protéines kinases: Kinome (G. Manning *et al.*, 2002).

Généralement les kinases sont classées selon leurs fonctions et leurs structures, en huit grandes familles (**Manning et al., 2002**) (**Figure 7**): les **Tyrosine kinases** phosphorylent leur molécule cible au niveau d'un résidu tyrosine, les **Tyrosine Kinase-Like** (proches des TK), les **AGC** (leur nom est relatif au trois kinases PKA, PKG et PKC), les **CaMK** (Kinases régulatrices de Calcium/Calmoduline et les kinases relatives structurellement), les **CK1** (Les caséines kinases de groupe 1), les **CMGC** (leur nom est relatif aux membres CDK, MAPK, GSK3 et CLK), les **RGC** pour Récepteur Guanylate Cyclases (ce petit groupe contient des protéines kinases eucaryotes qui semblent toutes être catalytiquement inactives) et enfin les **STE** pour Sérine/thréonine kinases, MAP kinases kinases, les homologues de levure Ste7 (MAP2K), Ste11 (MAP3K) et Ste20 (MAP4K) kinases.

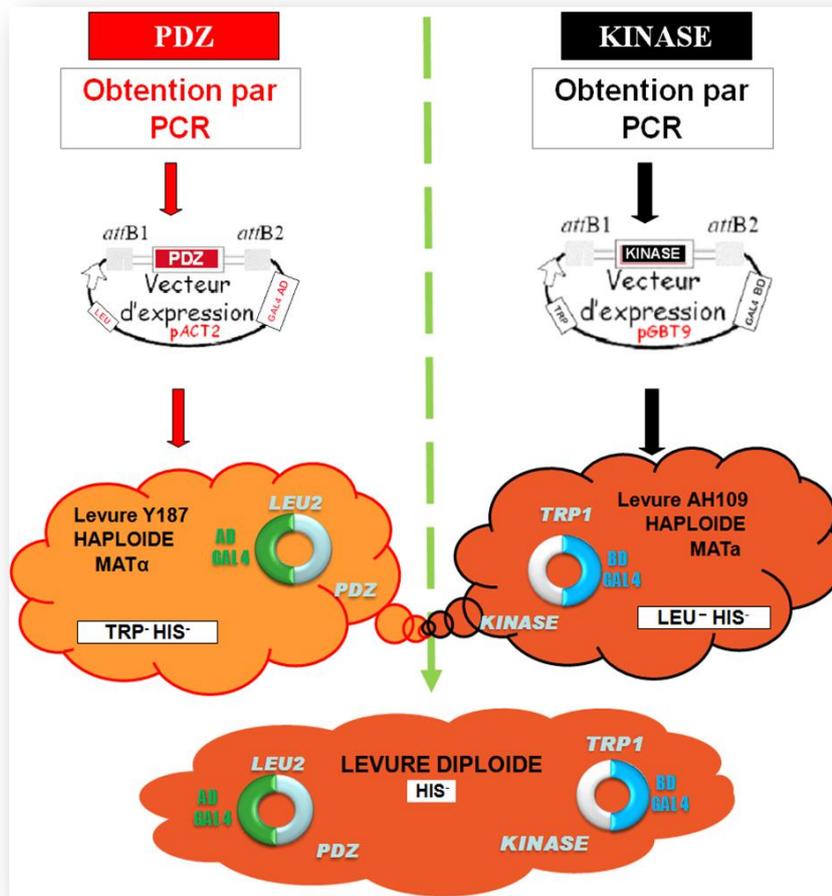
Certaines protéines kinases se distinguent par la présence, au niveau de leur séquence C terminale (Ct), d'un site de fixation aux domaines PDZ. Pour la réalisation de mon projet, j'ai sélectionnées les kinases pourvues d'un motif C terminal de classe I (**cf. Tableau I**), afin de tester leurs interactions avec une ressource de domaines PDZ.

## **I.7. Problématique**

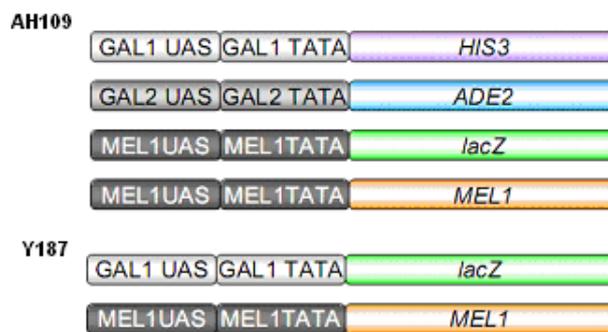
A présent, il est évident que les interactions entre les protéines à domaines PDZ et les protéines kinases ont des rôles décisifs dans plusieurs aspects structuraux et fonctionnels de l'organisation cellulaire. Malgré la disponibilité des bases de données après le séquençage complet du génome humain, la capacité de prédire les interactions, ainsi que les fonctions des protéines, à partir des séquences seules reste limitée. De ce fait, la détection et la caractérisation de ces interactions au laboratoire vont permettre d'apporter de précieuses informations pour la biologie fonctionnelle et la protéomique, telles que :

- La compréhension de l'action concertée de ces protéines dans l'espace et dans le temps ;
- L'attribution d'un rôle potentiel aux protéines de fonction inconnue « coupables par association » ;
- La connaissance des détails de l'organisation des machineries cellulaires et de leur dynamique (variation de la composition des complexes en fonction des conditions).

L'objectif de mon projet de Master 2 est donc de tester les interactions entre 247 domaines PDZ du protéome humain (présents dans 137 protéines) et les protéines kinases présentant un motif C terminal de classe I, potentiellement reconnu par les domaines PDZ.



**Figure 8 :** Démarche expérimentale du test d'interactions protéiques par double hybride en levure.



**Figure 9:** Les gènes rapporteurs des souches de levures utilisées: La souche de levure AH109 contient, intégrés dans son génome les quatre gènes rapporteurs illustrés. Ils permettent, s'ils sont exprimés, la croissance sur milieu sélectif (le gène HIS3 permet la croissance en absence d'histidine, ADE2 en absence d'Adénine). Tandis que les gènes Lac Z et MEL1 permettent l'expression de la  $\beta$  galactosidase responsable de la coloration bleu en présence d'X-Gal. La souche Y187 ne possède que les deux gènes rapporteurs Lac Z et MEL1.

Plusieurs techniques de choix permettent la caractérisation des interactions protéine-protéine (Co-IP, pull down, double hybride, phage display...etc.). Grâce à la présence sur le site d'une plateforme protéomique incluant un plateau technique de double hybride en levure, notre équipe a décidé d'associer des techniques biochimiques (Pull-down) à des techniques moléculaires (double hybride chez la levure) pour la recherche de ces interactions protéiques.

Mon travail va servir à compléter les résultats déjà obtenus au sein de notre équipe, voire préciser ces données par des tests d'interactions PDZ/Ct kinases en utilisant la technique du double hybride en levure. Cette méthode peu exigeante en moyens matériels, est de mise en œuvre assez aisée et peut être automatisée.

Je devais donc, dans un premier temps, cloner les extrémités C-terminales (peptides de 30 résidus d'acides aminés) des kinases présentant un motif consensus de classe I dans un vecteur adéquat de double hybride (expression de la Ct kinase-BD: « appât »). Après transformation d'une souche de levure appropriée et « accouplement » avec la souche partenaire exprimant la protéine de fusion « proie » (AD-PDZ), les interactions potentielles ont été révélées par sélection phénotypique sur milieu sélectif.

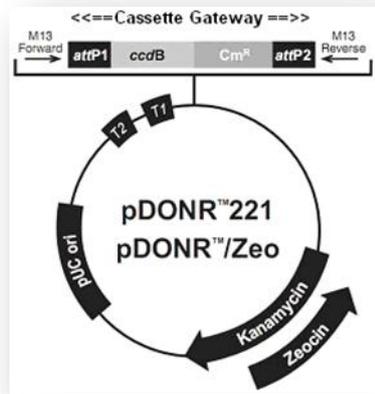
Une analyse bioinformatique des matrices d'interactions obtenues, m'a permis alors de comparer mes résultats avec les bases de données d'interactions protéiques. Dans un second temps, l'analyse détaillée de ces résultats a abouti à la distinction de nouvelles interactions non encore décrites, interactions auxquelles je pourrai m'intéresser plus particulièrement, en essayant de les valider biochimiquement et fonctionnellement.

## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

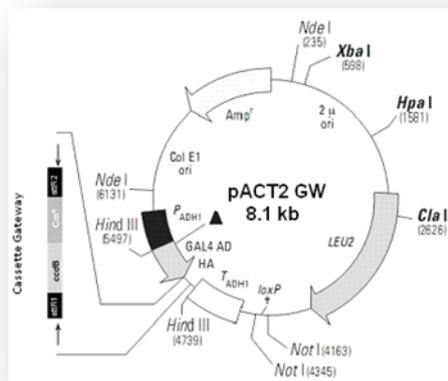
### II.1. Souches de levures utilisées

Les deux souches de levures utilisées pour le double hybride présentent un type sexuel opposé, MAT $\alpha$  et MAT $a$ , ce qui permet l'accouplement de celles-ci. La réunion (mating) de ces deux types de levures haploïdes, forme des cellules diploïdes capables d'entrer en méiose et de sporuler (**Figure 8**).

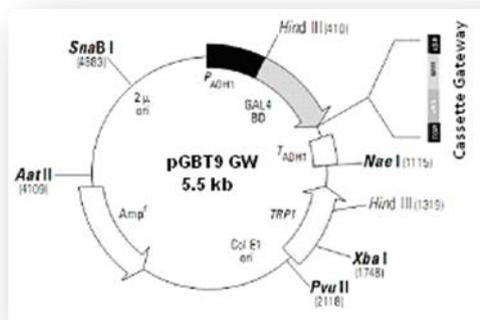
Y187 [MAT $\alpha$ ] (Clontech): Souche de *Saccharomyces cerevisiae* modifiée, conçue pour détecter les interactions protéine-protéine en utilisant le facteur de transcription GAL4 comme marqueur dans le système double hybride en levure. Le génome de la souche Y187 contient deux gènes rapporteurs GAL4-sensibles: *lacZ* et *MEL1* (**Figure 9**). Cette souche est auxotrophe pour la Leucine (*LEU2*) et le Tryptophane (*TRP1-901*), ce qui permet la sélection



-a-



-b-



-c-

Figure 10 : Plasmides utilisés pour le clonage Gateway (Clontech laboratory, 1998).

des levures transformées par les vecteurs portant soit la prototrophie Leu avec le domaine d'activation (AD) de GAL4, soit la prototrophie Trp avec le domaine de fixation (BD) de GAL4.

AH109 [MATa] (Clontech): Souche de *Saccharomyces cerevisiae* modifiée, utilisée dans le système double hybride en levure. Le génome de la souche AH109 contient quatre gènes rapporteurs GAL4-sensibles: *ADE2*, *HIS3*, *lacZ*, et *MEL1* (**Figure 9**). Comme pour les levures Y187 (partenaire idéal pour la conjugaison), les levures AH109 sont auxotrophes pour la Leucine (*LEU2*) et le Tryptophane (*TRP1-901*).

## II.2. Souches bactériennes utilisées

Bactéries DH5 $\alpha$  chimio-compétentes (Invitrogen): C'est une souche modifiée d'*Escherichia coli* préparée par une méthode proche de la procédure brevetée de Hanahan (**Hanahan D., 1983**). Ces bactéries peuvent être transformées de manière efficace avec des plasmides de grande taille et permettent une amplification optimale de l'ADN car elles sont dépourvues de recombinases (*rec<sup>-</sup>*) et d'endonucléases (*end<sup>-</sup>*).

Bactéries BL21 DE3 (Invitrogen): Les cellules BL21 (DE3) chimio-compétentes sont dérivées de la souche *Escherichia coli*. Elles sont conçues pour une haute expression de protéines recombinantes, sous le contrôle du promoteur T7 du phage  $\lambda$  avec une grande facilité d'induction offerte par l'opéron lactose.

## II.3. Les plasmides utilisés pour le clonage Gateway

pDONR 221 (Clontech): C'est un plasmide bactérien de clonage Gateway qui joue le rôle de « vecteur d'entrée ». Il contient des sites de recombinaisons homologues attP1 et attP2, un promoteur T7 et une séquence qui code pour la résistance à la kanamycine. Comme tous les vecteurs Gateway, ce plasmide contient dans sa cassette de recombinaison (cassette Gateway), un gène « suicide » *ccdB* qui code pour une protéine létale, permettant ainsi, d'éliminer tous les clones ayant intégré le plasmide non recombiné (**Figure 10.a**).

pACT2 Gateway: C'est le vecteur pACT2 (Clontech) rendu « Gateway » pour faciliter le clonage et nous permettre de générer une fusion entre le domaine d'activation (AD) de GAL4 (acides aminés 768-881), un épitope HA et une protéine d'intérêt (domaine PDZ dans notre cas) insérée au niveau du site Gateway dans le bon sens avec un cadre de lecture correct. La protéine de fusion est dirigée vers le noyau de la levure par la séquence de localisation



nucléaire (antigène T du SV40) qui a été cloné à l'extrémité 5' de la séquence GAL4-AD. Ce plasmide se réplique de manière autonome aussi bien dans *E. coli* que *S. cerevisiae* et porte le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline dans *E. coli*. Le pACT2 contient également le gène *LEU2* nutritionnel qui permet aux levures auxotrophes de se développer sur des milieux synthétiques complets (SC: 2.6 g/l de poudre d'acides aminés sans Leu, Trp et His ; 3.4 g/l de yeast nitrogen base ; 10g/l d'Ammonium sulfate ; qsp 1000 ml dH<sub>2</sub>O ; pH=5.9) carencés en Leucine (**Figure 10.b**).

pGBT9 Gateway: Il s'agit du vecteur pGBT9 (Clontech) rendu Gateway afin de générer facilement une protéine de fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (GAL-BD, aa 1-147). Pour la construction d'une protéine hybride, le gène codant pour la protéine d'intérêt (dans notre cas le domaine C terminal d'une kinase) est inséré dans le vecteur d'expression par recombinaison homologue, dans le bon sens avec un cadre de lecture correct. La protéine hybride est ciblée vers le noyau de la levure par une séquence de localisation nucléaire qui est une partie intrinsèque du GAL4-BD. Le pGBT9 est un vecteur navette qui se réplique de façon autonome dans *E. coli* et *S. cerevisiae*. Il porte le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline chez *E. coli* et aussi le gène de sélection nutritionnelle *TRP1*, permettant aux levures auxotrophes de croître sur des milieux synthétiques complets, carencés en Tryptophane (**Figure 10.c**).

#### **II.4. Ressource des domaines PDZ**

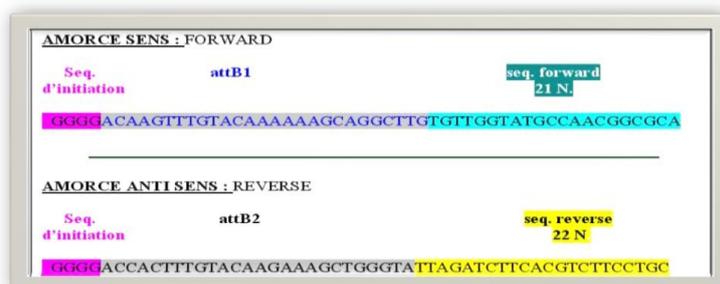
Les domaines PDZ humains ont été clonés dans le vecteur pACT2 Gateway, puis transformés dans la levure Y187 par l'équipe de Jérôme Reboul (INSERM U891). La banque de PDZ qui nous a été aimablement fournie, se présente sous forme de levure Y187 transformées et organisées en plaques 96 puits (deux plaques et demie) (**Tableau II**). Les séquences de tous les domaines PDZ clonés sont disponibles sur la base de données SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

#### **II.5. Présélection des kinases à tester**

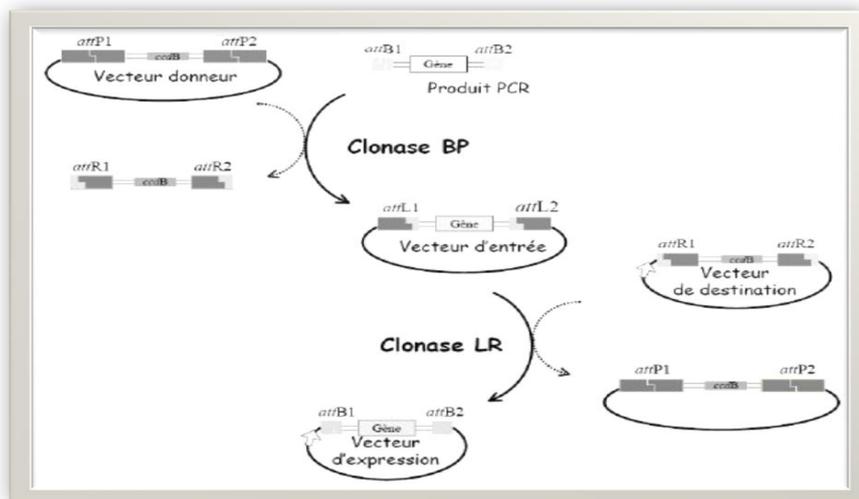
Le critère de présélection des kinases se base sur la présence d'un motif d'acides aminés en extrémité C terminale potentiellement reconnu par les domaines PDZ (classe I, II et III). Pour établir la liste de kinases à tester par pull down et par double hybride en levure, Stéphane Audebert (Equipe Polarité cellulaire, signalisation et cancer, INSERM U891) a téléchargé les séquences de toutes les protéines kinases humaines (<http://kinase.com/human/kinome/>). Puis en interrogeant cette base de données, il a pu extraire les kinases possédant un motif C

**Tableau III :** Liste des kinases de classe I. En bleu les kinases testées par double hybride en levure et en rouge les kinases qui transactivent le système.

		Séquences protéiques C terminales
	<b>Kinases de classe I</b>	X-(S ou T)-X-V OU X-(S ou T)-X-L
1	ACVR2A	TMVTNVDFPPK <b>ESSL</b>
2	ACVR2B	TSVTNVLDLPPK <b>ESSI</b>
3	BCR	APDSKRQSLF <b>STEV</b>
4	BRSK2	GLKGQKVATSY <b>ESSL</b>
5	GRK6	CGNCSDSEEL <b>PTRL</b>
6	ERBB4	TVLPPPPYRHRNTVV
7	MAP2K2	TLRLNQPGTPT <b>RTAV</b>
8	PDGFRa	<b>DIGDSSDLVE</b> <b>DSFL</b>
9	PDGFRb	SGCPAPRAEAE <b>DSFL</b>
10	PRKCA	YVNPQFVHPIL <b>OSAV</b>
11	PRKD2	QDHDMQGLAER <b>ISVL</b>
12	MAPK12	PPRQLGARVSK <b>ETPL</b>
13	GUCY2C	EYLQLNTTDK <b>ESTYF</b>
14	CDK16	EYLQLNTTDK <b>ESTYF</b>
15	PCTK1	PDSGRPAFRV <b>VDTTEF</b>
16	MAP4K1	NSPASASRVAG <b>TGTL</b>
17	ITK	SRLLRQLAEIA <b>ESGL</b>
18	AMHR2	PCSRNPQPACTL <b>SPV</b>
19	MKNK1	AQAGRGEDRS <b>PPTAL</b>
20	STK16	EALQPPAPGQH <b>TTQI</b>
21	PRKD1	EETEMKALGER <b>VSIL</b>
22	RPS6KA2	LAQRRGMKRLT <b>STRL</b>
23	RPS6KA3	LAQRRGKIKIT <b>STAL</b>
24	RPS6KA1	ILAQRRVRKLP <b>STTL</b>
25	RPS6KA6	LAQRRSMKRR <b>STGL</b>
26	SGK1	<b>AFLGFSYAPPT</b> <b>DSFL</b>
27	STYK1	AGIRVESLFYNY <b>SML</b>
28	MAP4K2	AHSNLYLTGH <b>OSTY</b>
29	PRKACA	RVSINEKCGKE <b>FSEF</b>
30	PRKACG	RISINEKCAKE <b>FSEF</b>
31	WEE1	LIGKMNRSV <b>SLTIY</b>



**Figure 11:** Design des amorces des séquences C terminale de kinases.



**Figure 12 :** Etapes de la technique de clonage Gateway par recombinaison homologue.

terminal reconnu par les domaines PDZ. Ceci dit, 90 kinases répondent à ces critères au niveau du kinome (environ 518 kinases).

## **II.6. Liste des kinases testées en double hybride**

En tenant compte des résultats antérieurs ressortis en pull down, nous n'avons testé, par double hybride en levure, que les Ct kinases de classe I (**Tableau III**), les kinases de classe II et III ayant révélé très peu d'interactions avec les domaines PDZ.

## **II.7. Préparation de la ressource des séquences C terminale de kinases**

Les séquences C terminales de kinases ont été clonées puis transformées dans la levure AH109 en utilisant les mêmes techniques que pour les domaines PDZ.

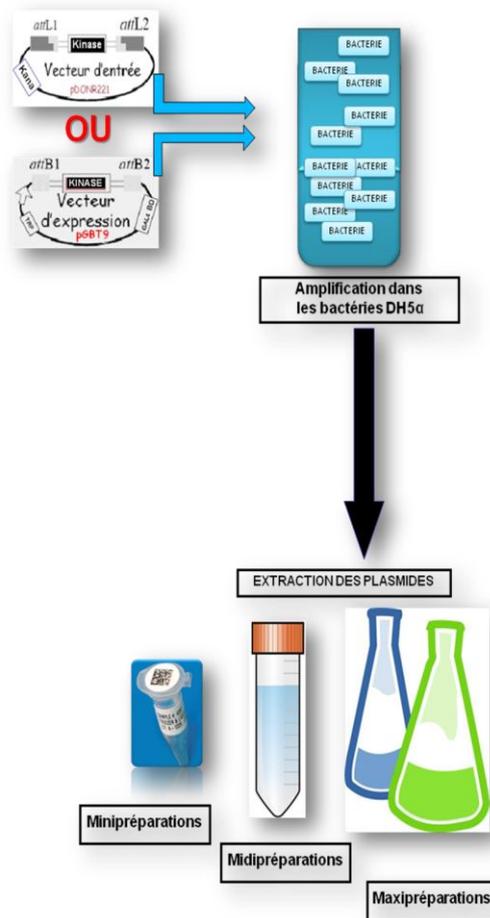
### Amplification et préparation de fragments d'ADN par PCR.

Le design des amorces a été réalisé sur des séquences délimitées à 30 acides aminés en extrémités C terminale des protéines kinases. Les amorces sont construites de part et d'autre de la séquence C terminale et sont constituées d'environ 20 bases nucléotidiques spécifiques de la kinase, auxquelles s'ajoute en amont la séquence de recombinaison homologue (attB) du phage  $\lambda$ , ainsi que quatre bases G en début de séquence (**Figure 11**).

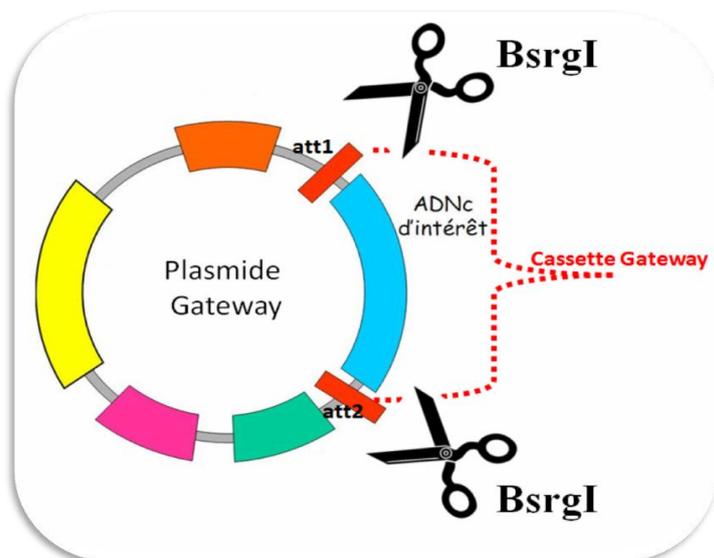
Toutes les amplifications d'ADN par PCR ont été réalisées sur une banque d'ADNc humaine en utilisant l'enzyme Taq polymérase Phire (Finnzymes), une polymérase modifiée garantissant une grande fidélité de répliation. Après une phase de dénaturation (30 sec à 98°), 30 cycles d'amplification (15 sec à 98°C ; 15 sec à Tm-2°C, 1 min à 72°C) et une phase d'élongation finale (5 min à 72°C), la taille du fragment amplifié est vérifiée sur gel d'agarose 1% (250 ml TAE 0.5X, 2.5 g agarose, 7.5  $\mu$ l Bromure d'Éthidium 10 mg/ml).

### Technique de clonage par recombinaison homologue : GATEWAY (**Figure 12**)

Cette technique de clonage très efficace, utilise une seule recombinaison homologue au lieu de deux étapes complexes de restriction et de ligation, ce qui nous permet d'avoir un rendement supérieur à 90% en une heure d'incubation seulement. La présence au niveau de la cassette Gateway du gène létal ccdB qui n'est éliminé que par recombinaison homologue, ainsi que les deux types d'antibiotiques utilisés pour les deux étapes, augmente l'efficacité.



**Figure 13:** Amplifications des plasmides dans les bactéries DH5α.



**Figure 14 :** Digestion BsrGI des plasmides purifiés après amplification.

Clonage BP : Il s'agit d'insérer la séquence d'intérêt amplifiée par PCR dans le vecteur d'entrée pDONR221, flanqué de la séquence de recombinaison attP (site de recombinaison Gateway) grâce à une BP recombinase (Invitrogen).

Clonage LR : Après une étape d'amplification post-BP en bactéries, on récupère les plasmides par mini-préparations (kit Macherey-Nagel). Les plasmides purifiés vont subir la seconde étape du clonage Gateway (recombinaison LR) qui sert à transférer la séquence d'intérêt (Ct kinase) vers le vecteur d'expression (pGBT9), en utilisant la LR recombinase (Invitrogen). Une amplification des vecteurs d'expression dans les bactéries DH5 $\alpha$ , nous permettra d'obtenir une quantité suffisante de plasmides pour la transformation des levures.

#### Transformation de bactéries compétentes et amplification des plasmides

Après chaque clonage, on amplifie les plasmides recombinés en transformant des bactéries chimio-compétentes commerciales DH5 $\alpha$  (Invitrogen).

Environ 50 ng d'ADN à transformer sont incubés avec 20 $\mu$ l de bactéries chimio-compétentes pendant 30 minutes dans la glace. Après un choc thermique de 45 secondes à 42°C stoppé par la glace, 150  $\mu$ l de milieu riche SOC (bacto-tryptone 20g/l, bacto-yeast extract 5g/l, NaCl 0.5 g/l, 1M KCl 2.5 g/l, ddH<sub>2</sub>O à 1000 ml) sont ajoutés et les bactéries sont incubées 45 minutes à 37°C sous agitation. Cette suspension de bactéries transformées est ensuite étalée sur du milieu Luria-Bertani (LB)/Agar (bacto-tryptone 1%, NaCl 100mM, bacto yeast extract 1%, agar 15g/L) contenant l'antibiotique correspondant au gène de résistance porté par le plasmide (kanamycine 50  $\mu$ g/ml ou ampicilline 100  $\mu$ g/ml).

#### Préparations d'ADN plasmidique à partir des cultures bactériennes

A partir d'une colonie bactérienne ensemencée dans du milieu LB additionné de l'antibiotique adéquat et cultivée une nuit à 37°C, l'ADN plasmidique est purifié en utilisant un kit Macherey-Nagel « nucleospin system » pour les mini-préparations, un kit Macherey-Nagel « nucleobond-AX » pour les midi-préparations ou un kit Invitrogen « pure link » pour les maxi-préparations, selon les recommandations des fabricants (**Figure 13**).

#### Digestion et vérification de la séquence des plasmides purifiés

Après chaque minipréparations, les plasmides purifiés sont soumis à une digestion avec l'enzyme BsrGI (Biolabs) qui clive les plasmides Gateway au niveau des sites de recombinaison att (**Figure14**) et génère deux fragments nucléotidiques de poids moléculaires distincts. La migration sur gel d'agarose des produits de digestion doit révéler une bande de



**Figure 15:** Principe de la détection des interactions kinases-domaines PDZ, par la reconstitution du facteur de transcription Gal4.

haut poids moléculaire représentant environ la taille du plasmide et une bande de faible poids moléculaire correspondant à la taille de la séquence insérée par recombinaison. Les minipréparations de plasmides ayant un profil de digestion correct, sont soit envoyées en séquençage pour vérifier la séquence de l'insert (après minipréparations BP), soit directement transformées dans les levures (après minipréparations LR). L'analyse des séquençages obtenus, se fait par leurs alignements avec les séquences théoriques ([www.multalin.com](http://www.multalin.com)).

#### Transformation des levures : méthode à l'acétate de lithium

La culture de la souche AH109 lancée la veille en milieu riche YPAD (1 ml x N: Nombre de transformations) est centrifugée 5 min à 1800 rpm. Le culot est lavé avec N x 1 ml d'eau distillée et centrifugé 5 min à 1800 rpm. Les levures sont relavées avec N x 1 ml de TELiAc (Tris-EDTA 1M, Acétate de Lithium 1M) et resuspendues après centrifugation 5 min à 1800 rpm dans N x 20 µl de TELiAc. N x 2 µl de ssDNA (ADN de sperme de saumon soniqué 250 µg/ml et dénaturé 5 min à 100°C) et 120 µl de PEG/TELiAc (polyéthylène glycol 50%/TELiAc) sont ajoutés à la suspension. 120 µl du mélange sont distribués dans chaque tube contenant déjà 2 µl du plasmide pGBT9 recombiné à transformer. Les tubes sont incubés 30 min à 30°C puis soumis à un choc thermique 15 min à 42°C. La suspension de levures transformées est centrifugée 5 min à 1800 rpm et le culot est resuspendu dans 30 µl d'eau distillée, avant d'être « spotté » sur un milieu SC-Trp/agar puis Incubé 72 Heures à 30°C.

### **II.8. Double hybride en levure**

Le principe de cette technique de détection d'interactions protéine-protéine, repose sur les propriétés d'activation et de modularité du facteur de transcription Gal4. Une protéine X est couplée au domaine de fixation de Gal4 et une autre protéine Y est fusionnée au domaine d'activation de Gal4 ; l'interaction entre les deux protéines permet la reconstitution du facteur de transcription et l'activation de l'expression d'un gène rapporteur (**Figure 15**).

#### Test de transactivation : cotransformation des levures

Certaines cibles (séquences Ct de kinases) peuvent activer la transcription du gène rapporteur sans interagir avec les domaines PDZ. Avant les mating ce type de faux positifs est éliminé en effectuant un test de transactivation par cotransformation de la souche AH109.

Les levures AH109 sont rendues compétentes comme pour la transformation, mais au moment de transformer avec le plasmide pGBT9 recombiné, on rajoute 2 µl du plasmide pACT2 non



recombiné. Le pACT2 vide ne génère pas un domaine PDZ et ne permet donc pas la reconstitution du facteur de transcription GAL4 par interaction avec une kinase.

Après cotransformation on spotte cette fois-ci sur milieu SC-WL/agar car les deux plasmides sont présents. Au bout de 72H d'incubation à 30°C, on repique les levures en milieu SC-WL liquide, ce qui va nous permettre après 24 H d'incubation à 30°C sous agitation, de « spotter » sur milieu SC-WHL/agar (détection de l'activation du gène rapporteur en dehors des interactions protéine-protéine). Après incubation 72 H à 30°C, la transactivation du système (auto-activation) se manifeste par la croissance des levures cotransformées sur le milieu SC-WHL/agar.

#### Mating : Accouplement des deux types de levures

L'accouplement des levures AH109 avec les levures Y187 conduit à la formation de cellules diploïdes dans lesquelles on retrouve les deux plasmides pACT2 et pGBT9. L'interaction entre le domaine PDZ et la Ct kinase restaure l'intégrité du facteur GAL4 et permet l'activation transcriptionnelle du gène rapporteur *HIS3*, porté par la levure AH109. Dès lors, les levures diploïdes sont capables de croître sur un milieu déplété en Leucine, en Tryptophane et en Histidine.

Protocole de mating optimisé : Le protocole de mating classique étant long, fastidieux et non automatisable sur milieu solide YPDA 2X/agar (40 g/L Difco peptone, 20 g/L Yeast extract, 2% glucose, 0,015% adénine /agar 15g/l), on a optimisé et adapté protocole de façon à le rendre plus simple à mettre en œuvre en milieu YPDA 2X liquide (40 g/L Difco peptone, 20 g/L Yeast extract, 2% glucose, 0,015% adénine).

Les pACT2 Gateway recombinés portant les séquences de chaque domaine PDZ (format 96 puits) et qui sont transformés dans les levures Y187 sont étalées sur boîtes SC-Leu/agar. A partir cette ressource, une colonie de chaque levure estensemencée dans 400 µl de milieu SC-Leu liquide sur plaques 96 puits et les cultures sont incubées une nuit à 30° sous agitation (250 rpm).

Les levures AH109 étant transformées par les pGBT9 recombinés portant les séquences C terminales de chaque kinase, sont étalées sur boîtes SC-Trp/agar et incubés 4 jours à 30°C.

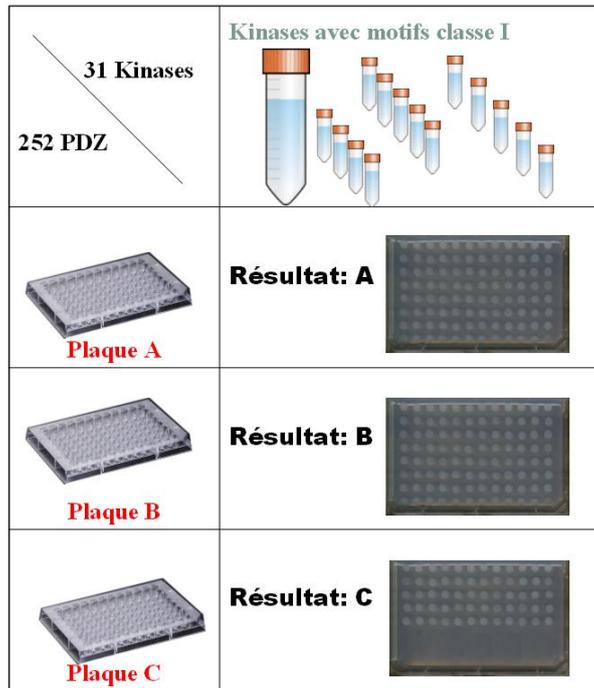


Figure 16 : Les tests d'interactions binaires par matings.



Figure 17: Robot EVO100 TeMO 96, Tecan.

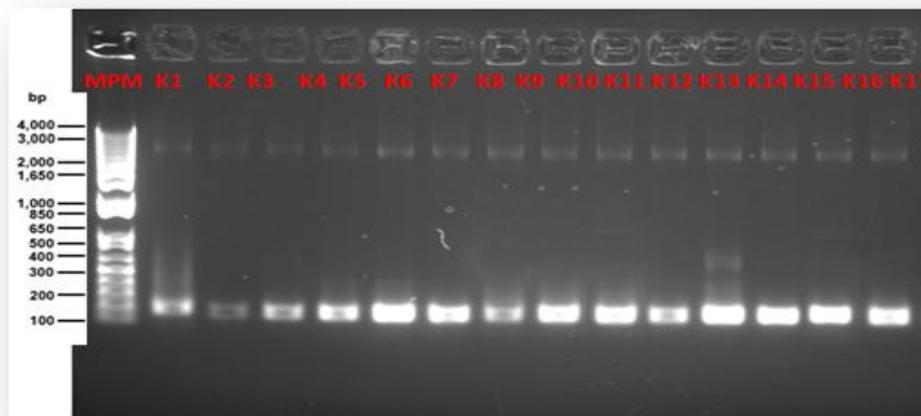


Figure 18 : Profil de la migration sur gel des Ct kinases amplifiées par PCR.

Une colonie de chaque levure estensemencée dans 7 ml de milieu SC-Trp liquide, et les cultures sont incubées une nuit à 30° sous agitation (250 rpm).

Les DO des cultures d'Y187 et d'AH109 sont ajustées par dilutions afin qu'elles soient équivalentes (DO entre 8 et 10). Le mating est réalisé à l'aide du robot Temo, en plaque 96 puits deepwell (**Figure 16**), en mettant en contact 30µl de chaque type de levure haploïde. 150µl de YPAD liquide + 48µl de PEG 50% sont rajoutés et mélangés délicatement. Après leur incubation 4h à 30°C sous agitation douce (150rpm), les levures sont centrifugées 5 min à 1800 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 200µl de ddH<sub>2</sub>O et centrifugé 5 min à 1800 rpm. Puis, le culot de levures est resuspendu dans 40µl de ddH<sub>2</sub>O avant d'être « spotté » sur boîte SC-WL/agar (efficacité du mating) et sur boîte SC-WHL/agar (détection des interactions kinases-domaines PDZ). A cette étape, des échantillons sont prélevés, afin d'estimer l'efficacité du mating : pour 3 points pris au hasard, 10 µl sont dilués dans 10ml et 300µl sont étalés sur boîte SC-WL/agar. Les cultures sont incubées quatre jours à 30°C.

Le contrôle E6 : Il s'agit de la séquence C terminale de l'oncoprotéine E6 du papillomavirus HPV16 (principal virus oncogénique) qui se fixe sur de nombreux domaines PDZ.

Robot TeMO 96 (Figure 17): Réalisation des matings à haut débit en plaques 96 puits.

## CHAPITRE III: RESULTATS

### III.1. Obtention des séquences C terminales des kinases par amplification

L'obtention des séquences C terminales des kinases a été effectuée par amplification PCR, à partir d'une banque d'ADN complémentaire humaine. Les amorces spécifiques utilisées sont flanquées des sites de recombinaison homologue du phage λ (attB1 et attB2), ce qui permet l'utilisation du système Gateway pour le clonage rapide des 31 Ct kinases à tester avec les domaines PDZ par double hybride en levure.

Les séquences amplifiées sont constituées des 30 derniers résidus d'acides aminés en extrémités C terminale représentés par une séquence nucléotidique de 93 paires de bases (90 + codon stop). Le choix de la taille des séquences a été motivé par la limite de détection des fragments d'ADN sur gel d'agarose 1 % (≈100 pb).

#### Migration des séquences C terminales de kinases obtenues par PCR

La vérification des amplifications par PCR sur gel d'agarose, a montré que la totalité des séquences avait un profil correct, avec une seule bande assez intense d'environ 150 pb. Ceci témoigne de la spécificité des amorces construites et de l'efficacité de l'enzyme polymérase (Phire) utilisées (**Figure 18**).

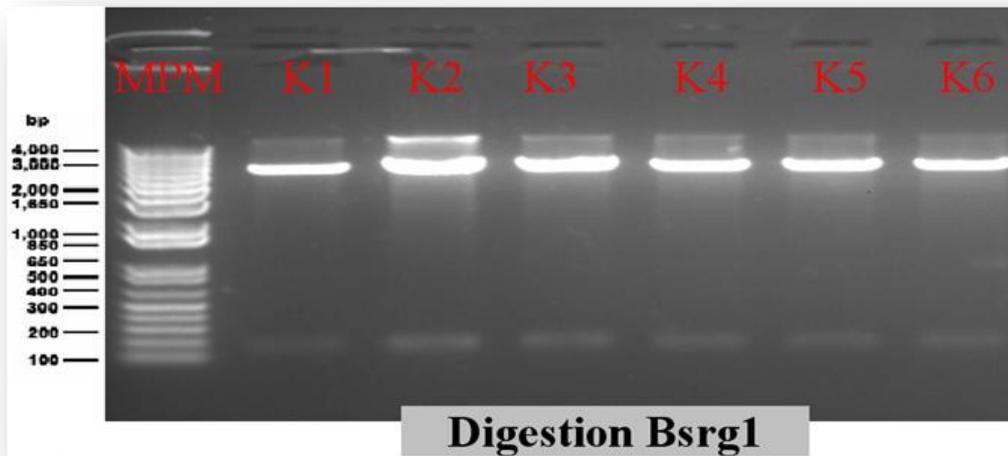


Figure 19: Profil de digestion des plasmides recombinés purifiés par minipreps.

	1	10	20	30	35
	-----+-----+-----+-----+-----				
seq.plasme	KKAGF <b>CHAHNPASRLTALRIKKT</b> LAKHVESQDVKI				
seq.theorique	<b>CHAHNPASRLTALRIKKT</b> LAKHVESQDVKI				
Consensus	..... <b>CHAHNPASRLTALRIKKT</b> LAKHVESQDVKI				

Figure 20 : Alignement de séquences détecter les mutations ([www.multiple.com](http://www.multiple.com)).

### III.2. Clonage Gateway

Le clonage Gateway comprend deux recombinaisons homologues BP et LR, la première pour insérer la séquence Ct kinase dans le vecteur d'entrée (pDONR221) et la deuxième pour transférer la séquence d'intérêt vers le vecteur d'expression en double hybride (pGBT9). Pour avoir assez de matériel et afin d'analyser l'efficacité du clonage, une amplification en bactéries est effectuée après chacune des deux étapes de recombinaison. Les plasmides sont par la suite purifiés par minipréparations et une digestion au niveau de la cassette Gateway nous a permis de vérifier le profil des vecteurs recombinés. Les fragments générés par la digestion des vecteurs recombinés révèlent un profil de migration correct, avec une bande de haut poids moléculaire représentant le fragment plasmidique et une autre bande d'environ 150 pb représentant la taille de l'insert (**Figure 19**).

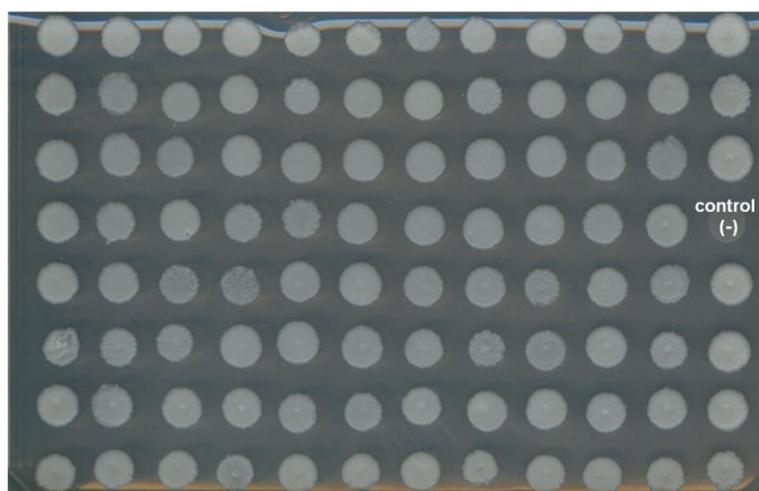
Afin d'exclure les vecteurs ayant intégré des séquences C terminales mutées lors de l'amplification, nous avons envoyé en séquençage les vecteurs recombinés après clonage BP (pDONR221 recombinés). Les séquences obtenues ont toutes été comparées aux séquences théoriques par alignement afin d'entreprendre le second clonage avec certitude (**Figure 20**). Lorsqu'une séquence est 100% homologue, la seconde étape du clonage Gateway peut être lancée en réalisant une réaction LR. Dans le cas où la séquence s'avère mutée, des plasmides issus d'autres clones de bactéries sont renvoyés en séquençage jusqu'à obtention d'une séquence correcte. La révélation d'un bon profil de digestion des plasmides pGBT9 après réaction LR, nous autorise à les intégrer dans la levure AH109.

### III.3. Transformation des levures

Pour détecter une éventuelle interaction entre les deux protéines de fusion (GAL4 AD-PDZ et GAL4 BD-Ct kinase), celles-ci doivent être coexprimées au sein de la même levure. Pour cela, les plasmides contenant chacun une des deux protéines hybrides, sont soit cotransformés directement dans une seule levure, soit transformés dans deux levures haploïdes de type sexuel opposé (Mat  $\alpha$  vs Mat  $a$ ), dont la conjugaison (mating) formera une seule levure diploïde contenant les deux plasmides. Afin de réaliser notre matrice d'interactions entre les domaines PDZ et les Ct kinases, nous avons opté pour la méthode du mating et ceci afin de pouvoir automatiser le système grâce à la ressource de domaines PDZ clonés en pACT2 et transformés en levures Y187(Mat  $\alpha$ ) en format 96 puits. Après réaction LR, les séquences Ct kinases se trouvent dans le vecteur d'expression pGBT9 qui est alors transformé dans la levure AH109 (Mat  $a$ ).



**Figure 21** : Détection des kinases transactivant le système (croissance sur milieu –WHL)  
 Kin 8 : PDGFR $\alpha$   
 Kin 26 : SGK1



**Figure 22** : Exemple de la culture des levures accouplées sur milieu –WL (control d'efficacité): les levures ont toutes bien proliférées.



**Figure 23** : Exemple de la culture des levures accouplées sur milieu –WHL (détection des interactions) : PDZ plate B vs kinase PRKD1.

### III.4. Test de transactivation du système

Certains peptides appâts (séquences Ct kinases) peuvent activer à eux seuls la transcription du gène rapporteur du système double hybride en levure. Ainsi, ils confèrent à la levure la capacité de croître en milieu –WHL, sans interagir avec les protéines proies (domaines PDZ). Pour palier ce problème, nous avons réalisé des tests de transactivation par cotransformation des plasmides pGBT9 recombinés contenant les séquences Ct kinases, plus des plasmides pACT2 vides (non recombinés) dans les levures AH109.

Parmi toutes les kinases de classe I, deux d'entre elles transactivent le système : PDGFR $\alpha$  et SGK1 (**Figure 21**), de ce fait, leurs interactions avec les domaines PDZ ne pourront pas être étudiées en utilisant cette technique. Les autres kinases n'ayant pas révélé de transactivation, sont désormais prêtes à être testées par mating des deux levures Y187 et AH109.

### III.5. Mating des levures Y187 et AH109

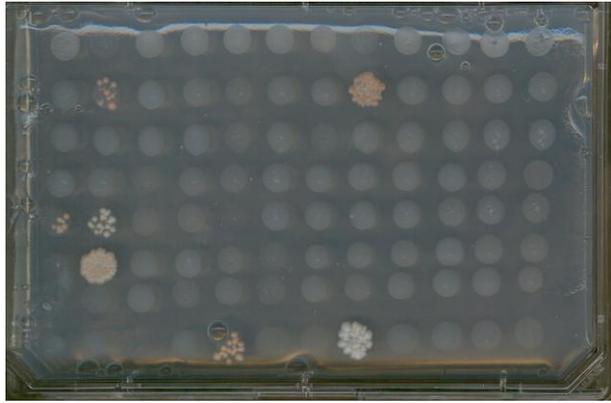
Le protocole classique du mating en milieu solide étant fastidieux et non automatisable, nous avons optimisé la technique en phase liquide. Ainsi, on a pu faire intervenir le robot Temo 96 qui exécute une liste de commandes bien ordonnées, en lui fournissant progressivement le matériel nécessaire au déroulement de l'expérience (cultures, Tips, milieux, boîtes,...etc.). De cette manière, on a pu réaliser les matings plus aisément en un temps plus court.

Les matings sont réalisés dans l'ordre de la liste de Ct kinases dégagée par les analyses précédentes. De sorte que, chaque kinase est testée avec les 247 domaines PDZ (3 plaques : A, B et C) avant de passer à une autre Ct kinase.

Les levures accouplées sont cultivées sur un milieu – WL/agar afin d'estimer l'efficacité du mating (fusion des cytoplasmes et coexistence des deux plasmides d'expression) et sur milieu –WHL/agar pour détecter d'éventuelles interactions entre les deux protéines de fusion (via la reconstitution du facteur GAL4).

L'efficacité des matings est souvent bonne, avec une croissance plus ou moins forte en milieu –WL/agar de toutes les levures accouplées (**Figure 22**). Quant aux interactions, elles sont détectées lorsque les levures prolifèrent en milieu –WHL/agar (**Figure 23**).

Mating du 16.04.10: E6 + PDZ plate B



Mating du 20.04.10: E6 + PDZ plate B

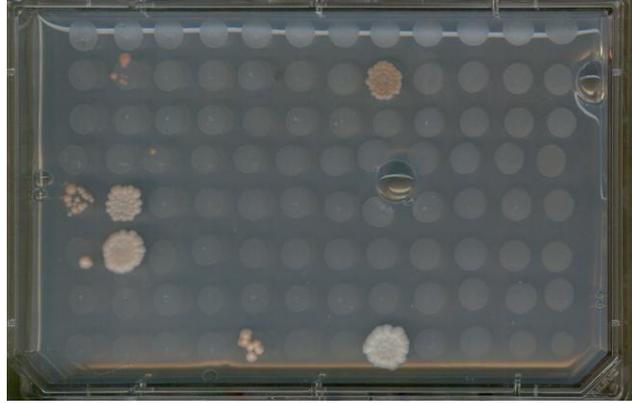
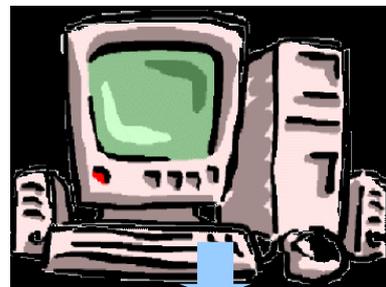


Figure 24 : Validation du système par le control E6.

Kinase PKC- mu: PRKD1 vs:											
<b>Plaque A des PDZ</b>											
APBA1_1	APBA1_2	APBA2_1	APBA2_2	APBA3_1	APBA3_2	ARHGAP2	ARHGEF1	ARHGEF1	CARD11	CARD14	CASK
DLG1_1	DLG1_2	DLG1_3	DLG2_1	DLG2_2	DLG2_3	DLG3_1	DLG3_2	DLG3_3	DLG4_1	DLG4_2	DLG4_3
DLG5_1	DLG5_2	DLG5_3	DLG5_4	HTRA2	HTRA4	INADL_1	INADL_10	INADL_2	INADL_3	INADL_4	INADL_5
INADL_6	INADL_7	INADL_8	INADL_9	LNK1_1	LNK1_3	LNK1_4	LNK2_1	LNK2_2	LNK2_3	LNK2_4	MAG1_1
MAG1_2	MAG1_3	MAG1_4	MAG1_5	MAG1_6	MAG1_1	MAG1_2	MAG1_3	MAG1_4	MAG1_5	MAG1_6	MAG1_1
MAG3_2	MAG3_3	MAG3_4	MAG3_5	MAG3_6	MAGIX	MPP1	MPP2	MPP3	MPP4	MPP5	MPP6
MPP7	PAR3_1	PAR3_3	PAR3B	PAR3B	PAR3B	PAR6B	PAR6G	PSMD9	RAPGEF2	SCRIB_1	SCRIB_2
SCRIB_3	SHANK2	SNTB1	SNTB2	TJP1_1	TJP1_2	TJP2_1	TJP2_2	TJP2_3	TJP3_1	TJP3_2	TJP3_3
<b>Plaque B des PDZ</b>											
AHNAK	CNKSR2	CNKSR3	DEPDC2	DEPDC2	DEPDC6	DFNB31_1	DFNB31_2	DFNB31_3	DVL1	DVL2	DVL3
GRID2IP	PDZK1	FNIP1	FRMPD1	FRMPD2	FRMPD2	FRMPD2L	FRMPD4	GIPC1	GIPC2	GIPC3	GOPC
GORASP2	GRASP	GRIP1_1	GRIP1_2	GRIP1_3	GRIP1_4	GRIP1_5	GRIP1_6	GRIP1_7	GRIP2_1	GRIP2_2	GRIP2_3
GRIP2_4	GRIP2_5	GRIP2_6	GRIP2_7	IL16_1	IL16_2	INTU	KIAA1849	LDB3	LIMK2	LMO7	
MAST1	MAST2	MAST3	MAST4	MPDZ_1	MPDZ_10	MPDZ_11	MPDZ_12	MPDZ_13	MPDZ_3	MPDZ_4	MPDZ_5
MPDZ_6	MPDZ_7	MPDZ_8	MPDZ_9	MYO18A	P-Rex1_1	P-Rex1_2	PDLIM1	PDLIM2	PDLIM3	PDLIM4	PDLIM5
PDLIM7	PDZD11	PDZD2_1	PDZD2_2	PDZD2_3	PDZD2_4	PDZD2_5	PDZD2_6	PDZD3_1	PDZD3_2	PDZD3_3	PDZD3_4
PDZD4	PDZD7_1	PDZD7_2	PDZD8	PDZK1_1	PDZK1_2	PDZK1_3	PDZRN3	PDZRN3	PDZRN4	PPP1R9A	PPP1R9B
<b>Plaque C des PDZ</b>											
LRRC7	LNK1_2	SHANK1	NOS1	PAR6A	ERBB2IP	LIN7C	PICK1	HTRA3	HTRA1	TAX1BP3	LIN7B
SHROOM2	SNTA1	SYNPO2	MLLT4	LIN7A	PAR3_2	TIAM1	SLC9A3R1	TJP1_3	MPDZ_2	SCRIB_4	IL16_3
PRX	PSCDBP	PTPN13_1	PTPN13_2	PTPN13_3	PTPN13_4	PTPN13_5	PTPN3	PTPN4	RGS12	RGS3	RHPN1
RHPN2	RIMS1	RIMS2	SDCBP_1	SDCBP_2	SDCBP_2	SDCBP_2	SHROOM3	SHROOM4	SIPA1	SIPA1L1	SIPA1L2
SIPA1L3	SLC9A3R2	SLC9A3R2	SLC9A3R2	SNTG1	SNTG2	SNX27	SYNJ2BP	TIAM2	USH1C_1	USH1C_2	USH1C_3



Extraction des données par bioinformatique

Comparaisons de nos résultats avec la bibliographie via la base de données d'interactions protéiques HPRD, en utilisant des logiciels adéquats.



Figure 25: Exemple de la démarche expérimentale après le stockage du résultat d'un mating. Vert = interaction, sans couleur = pas d'interaction.

### Validation du système avec le contrôle E6:

L'oncoprotéine virale E6 interagit avec un grand nombre de domaine PDZ. Elle nous permet de valider les expériences de mating, en l'intégrant comme protéine appât aux cotés des Ct kinases. Cette protéine contrôle doit ressortir à chaque fois les mêmes interactions (**Figure 24**).

### **III.6. Stockage des résultats des matings**

Tous les résultats des tests phénotypiques sont enregistrés sur un classeur Excel, sous forme de tableaux représentant les deux plaques et demie de domaines PDZ testés avec les différentes kinases de classe I (**Figure 25**). Les boites de cultures sont scannées et les images sont jointes au document Excel. Au cours de mon stage, j'ai réalisé **7163** tests d'interactions, entre les 29 Ct kinases (non transactivatrices) et les 247 domaines PDZ, ce qui a révélé **390** tests d'interactions positifs et **6773** tests négatifs. La gestion de ce grand nombre de données ne peut pas être réalisée manuellement et doit faire intervenir les techniques de bioinformatique.

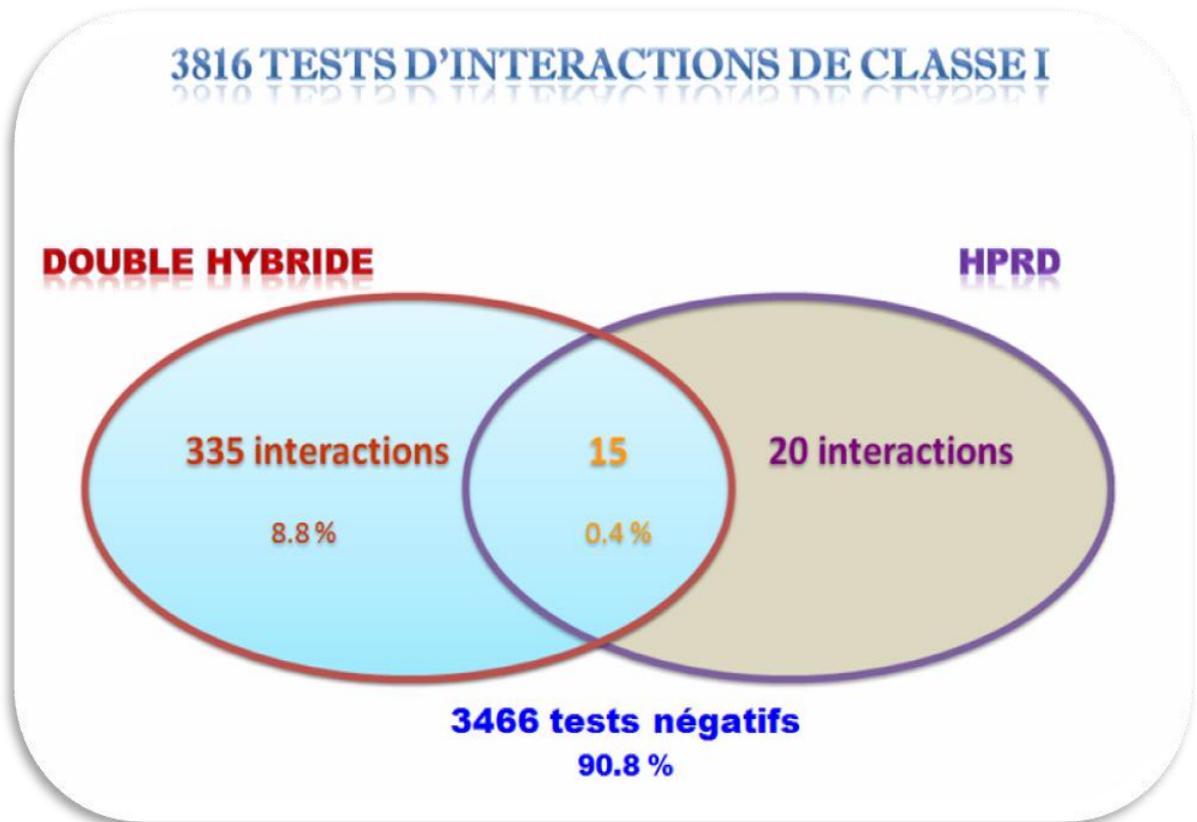
### **III.7. Comparaison des résultats avec la bibliographie**

Afin de comparer les résultats obtenus avec la littérature, j'ai commencé par regrouper les 247 domaines PDZ en 137 protéines (contenant un ou plusieurs domaines PDZ) dont la nomenclature, ainsi que celle des protéines Kinases, ont du être revues en raison des différentes appellations existantes dans la littérature pour une même protéine. Les protéines sont alors renommées en utilisant des symboles universels et compatibles avec la base de données d'interactions protéine-protéine dont nous disposons (HPRD: Human Protein Ressource Database).

### **III.8. Exploitation des résultats des matings par bioinformatique**

Les résultats des matings ont fait l'objet d'une analyse bioinformatique, avec l'aide de Maxime Garcia (Equipe de bioinformatique de l'UMR891 INSERM), afin d'extraire les données archivées sous format Excel. En effet, les résultats ont pu être comparés avec la bibliographie en interrogeant la base de données HPRD (Human Protein Reference Database) et faire ressortir quatre types de tests d'interactions en termes de protéines (**Figure 26**) :

- A. **3623** tests négatifs n'ont pas d'interactions connues dans la littérature.
- B. **20** tests négatifs ont des interactions connues dans la littérature (interactions non révélées).
- C. **15** interactions sont communes entre nos résultats et la littérature.
- D. **335** tests positifs n'ont pas été rapportés dans la littérature (nouvelles interactions).



**Figure 26** : Comparaison des résultats des matings avec la bibliographie via la base de données HPRD.

Une analyse complémentaire visuelle nous a permis de tirer quelques conclusions :

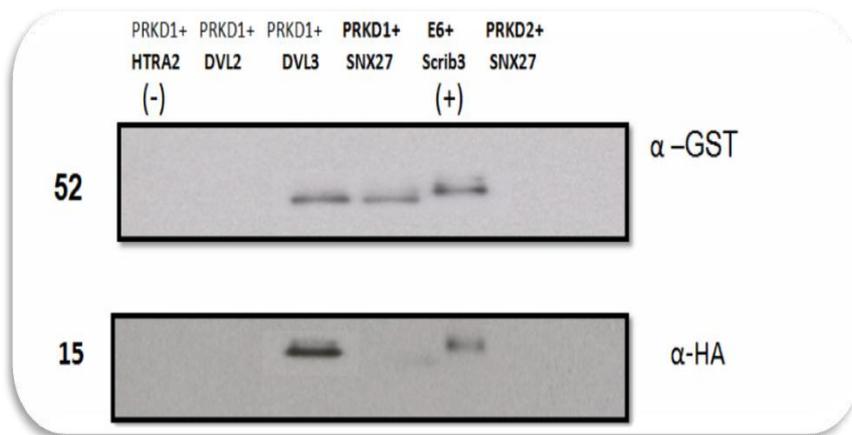
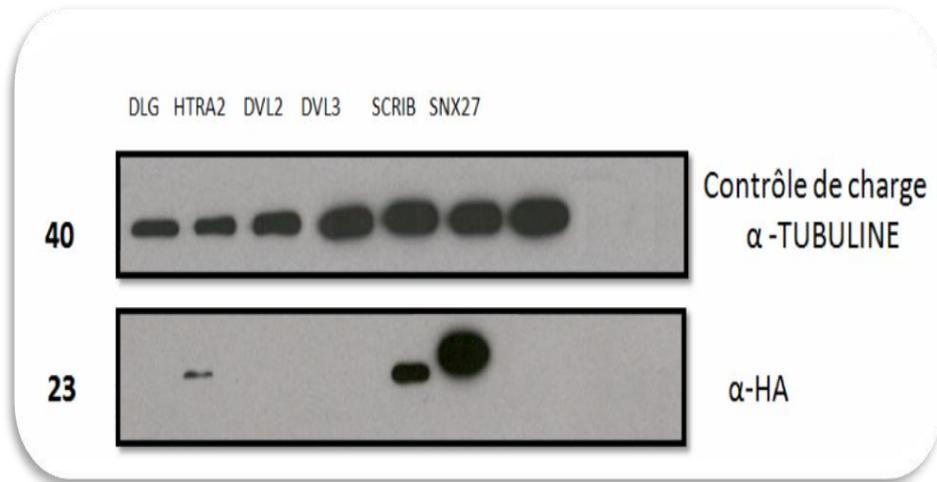
- Parmi les 350 tests positifs, on retrouve 15 interactions en commun avec la bibliographie (selon HPRD), ce qui représente 43% de la littérature. Le reste de nos interactions retrouvées et qui sont au nombre de 335, sont considérées comme étant nouvelles et doivent être vérifiées par d'autres techniques de validation (pull down, biacore, coIP,...).
- Les interactions non révélées par notre système (20) sont soit détectées par d'autres techniques plus sensibles, ou bien mettent en jeu des sites d'interactions autres que ceux visés au cours de ce projet.
- La liste des nouvelles interactions contient quelques interactions originales et intéressantes pour la thématique de notre équipe:
  - ✓ PRKD1-DVL2 (protéine kinase D 1 - dishevelled 2)
  - ✓ PRKD1-DVL3 (protéine kinase D 1 - dishevelled 3)
  - ✓ PRKD1-SNX27 (protéine kinase D 1 - sorting nexin family member 27)
  - ✓ PRKD2-SNX27 (protéine kinase D 2 - sorting nexin family member 27)
- Parmi la sélection ci-dessus, les interactions entre la kinase PRKD1 avec DVL2 et DVL3 sont celles qui ont attiré le plus mon attention, car les protéines DVL n'ont pas révélé d'interactions avec les autres séquences Ct kinases. De plus les protéines DVL, font l'objet de plusieurs projets en cours d'investigation au sein de notre équipe de recherche.

### **III.9. Résultats préliminaires**

La stratégie que j'ai choisie pour confirmer les quelques nouvelles interactions sélectionnées, s'appuie sur la technique biochimique de précipitation par affinité (GST pull down) suivie d'un Western blot pour la révélation des protéines marquées.

#### Génération de peptides marqués :

Les séquences de peptides intervenant dans les quelques interactions sélectionnées, sont transférées par clonage Gateway (réaction LR) à partir des plasmides d'entrée vers des plasmides d'expression contenant une séquence tag (étiquette). Une fois exprimé, le peptide est donc flanqué d'un tag grâce auquel il peut être révélé, en faisant intervenir un anticorps dirigé contre ce tag. Les Ct kinases sont marquées par un tag GST et les domaines PDZ sont marqués par un tag HA.



**Figure 27 :** Résultats préliminaires de la confirmation biochimique des interactions.

**Tableau IV :** Résultats antérieurs en pull down.

P à PDZ	peptides CT KINASES																						
	beta PIX	ACVRA	ACVR3B	BCR	BRK2	GRK6	ERBB4	MAP2K2	PDGFRA	PDGFRB	PRKCA	PRKD2	MAPK12	GLYC2C	PCTK1	STRADD	ULK4	BMPRIA	LATS1	MERTK	CSF1R	PRK2	
identified interactors	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A9	B1	B2	B3	B5	B12	C4	C6	F6	F9	D1	E5	E10	G5	G11		
Utrophin	x	x	x	x																			
DNA apks						x																	
ZO-1																	x						
Magi3				x																			
ZO-2																	x						
Scribble	x	x	x	x	x																		
PARD3																							
Dlg		x	x	x	x		x	x															
SAP97		x	x	x	x		x	x															
alpha actinin 2				x																			
CASK		x	x	x	x		x	x															
Sec23																							
Villin																							
Maguk7		x	x	x	x		x	x															
Snx27	x																						
Dystrobrevin		x	x	x	x		x																
Syntrophin alpha		x	x	x	x		x																
Syntrophin beta		x	x	x	x		x																
Maguk2 (Mp55)		x	x																				
Pist (Crif associated ligand)																							
Nherf1	x																						
Nherf2 (SLC9A3R2 protein)	x																						
HTRA-2																							
Lin7				x	x		x																

■ classe I  
■ classe II  
■ classe III

### GST pull down + Western blot

Les résultats préliminaires obtenus sont encourageants, car pour la première expérience effectuée, j'ai pu précipiter les billes GST, auxquelles sont liées les kinases, avec les domaines PDZ marqué par une queue HA. La révélation par western blot, nous a permis de détecter les interactions.

Deux interactions déjà obtenues par double hybride en levure sont confirmées par cette approche de GST pull down : PRKD1-SNX27 et PRKD2 et SNX27 (**Figure 27**).

## **CHAPITRE IV: DISCUSSIONS**

### **IV.1. Le choix des séquences Ct kinases**

Une expérience antérieure de détection des interactions PDZ-Ct kinases en pull down a été réalisée au niveau de la plateforme protéomique par Stéphane Audebert. Les 15 derniers résidus d'acides aminés en queues C terminales des kinases sont accrochés sur des billes de sépharose et un lysat de cellules HEK293T a été rajouté, afin de détecter les interacteurs qui vont s'y fixer. Une approche de spectrométrie de masse a permis d'identifier les protéines à domaines PDZ parmi tous les interacteurs. Le résultat de cette expérience nous a donné une idée sur la capacité des protéines à domaines PDZ entières à se lier aux queues C terminales des kinases. En effet, nous avons remarqué que les protéines à domaine PDZ interagissent plus avec les kinases de classe I (possédant un motif de classe I) par rapport aux deux autres classes (**Tableau IV**). Ceci nous a orienté, dans un premier temps, vers le choix de tester prioritairement par double hybride en levure, les interactions entre les protéines à domaines PDZ et les kinases possédant une séquence consensus de classe I en extrémité C terminale.

### **IV.2. Clonage et transformation des séquences Ct kinases**

L'intégration des séquences Ct de kinases dans un vecteur d'expression en levure a été largement facilitée par la technique de clonage Gateway. Ceci nous a permis de construire, en un temps réduit, notre ressource de levure AH109 transformées, puis, de nous consacrer à effectuer les tests d'interactions par accouplement des levures.

### **IV.3. Résultats des tests d'interactions par double hybride en levure**

Après avoir testé les interactions entre les 247 domaines PDZ et les séquences Ct kinases possédant un motif consensus de classe I, on a obtenu un nombre important d'interactions (350). Ceci témoigne de la sensibilité du système utilisé et de l'efficacité de son optimisation.



De plus, l'utilisation de l'oncoprotéine E6 comme contrôle, consolide nos résultats et leur donne plus de valeur.

La détection d'un nombre important d'interactions est sûrement dûe à la sensibilité de la technique, mais pourrait également révéler un nombre de faux positifs. En effet, le fait d'adresser les deux protéines de fusion dans le noyau pourrait en quelque sorte forcer les interactions entre protéines.

L'archivage des résultats des accouplements sous forme de plaques 96 sur un classeur Excel, nous a permis de bien conserver les informations et de les exploiter par la suite en faisant intervenir des techniques de bioinformatique.

#### **IV.4. Problème de la nomenclature des peptides**

Les protéines à domaines PDZ ainsi que les protéines kinases sont citées avec différentes nomenclatures dans la littérature. Pour éviter toute confusion, j'ai du vérifier la compatibilité du symbole de chaque kinase testée avec la base de donnée HPRD. A titre d'exemple, la protéine kinase PRKD1 est également nommée PKD, or cette dernière appellation est retrouvée aussi pour la protéine appelée Polycystic Kidney Disease.

Pour des comparaisons plus larges avec la littérature, en faisant intervenir différentes bases de données d'interactions protéiques, il faudra renommer les protéines testées en utilisant leur « geneID »: Identifiant unique du gène.

#### **IV.5. Analyse bioinformatique**

L'analyse bioinformatique nous a apporté de nouveaux éléments en comparant nos résultats avec la littérature. En effet, au niveau de nos interactions révélées par double hybride, on a pu retrouver 43% des interactions recensées dans la bibliographie (selon HPRD). Ce pourcentage important d'interactions reproduites par notre technique, valide en grande partie notre matrice. Le reste des tests d'interactions positifs (335) n'étant pas retrouvé dans la littérature, est considéré comme étant « les nouvelles interactions ». Toutefois, des confirmations par d'autres techniques sont impératives.

Diverses techniques bioinformatiques sont envisageables, afin d'exploiter au mieux la matrice d'interactions générée. En effet, les différentes clusterisations (regroupements) des interactions, pourront ressortir un interacteur liant des kinases d'une voie cellulaire donnée. Aussi, l'alignement des séquences Ct de kinases liées par un seul domaine PDZ permettra de



détecter une éventuelle préférence pour l'un des motifs consensus. Ou encore, le regroupement des kinases en familles fonctionnelles et définir les PDZ liés. Autant de combinaisons qui peuvent être réalisées, pour interpréter les informations regroupées au sein de la matrice.

#### **IV.6. Confirmation biochimique de certaines interactions**

Ayant pris conscience des limites de la technique du double hybride en levure et des biais mis en jeu, j'ai voulu confirmer certaines interactions par des techniques biochimiques. Les interactions choisies sont en relation avec les travaux en cours d'investigations au sein de notre équipe de recherche: PRKD1-DVL, PRKD1-SNX27, PRKD2-DVL et PRKD2-SNX27.

La protéine à domaines PDZ Dishevelled (DVL) est l'un des acteurs majeurs de la cascade de signalisation WNT, qui intervient dans plusieurs processus de l'homéostasie cellulaire, tels que la prolifération, la migration et l'établissement de la polarité. La phosphorylation de DVL permet la régulation de la voie WNT, dont la déstabilisation est associée directement au développement tumoral (**Gao et al., 2010**).

Il a été rapporté que la protéine kinase D1 (PRKD1) supprime la voie c-Jun N-terminal Kinase (JNK) qui est en aval de la voie de signalisation WNT, et ceci grâce à la phosphorylation d'un site d'interaction spécifique (**Waldron RT et al., 2007**).

En tenant compte des propriétés des deux protéines DVL et PRKD1 dont l'interaction a été révélée par double hybride en levure, j'ai émis l'hypothèse que la protéine kinase PRKD1 pourrait moduler la voie de signalisation JNK en interagissant avec la protéine à domaine PDZ Dishevelled.

Afin de confirmer l'interaction entre PRKD1 et DVL, ainsi que les quelques interactions sélectionnées, j'ai généré des protéines marquées par des étiquettes (tag) qui servent à la précipitation par pull-down des protéines interagissantes entre elles puis, leur révélation par Western blot.

Les résultats préliminaires ressortis au cours de la première expérience ont bien révélé quelques interactions entre les peptides testés. Cependant, des conclusions ne peuvent pas être tirées à partir de ces résultats, car les contrôles n'ont pas été tous concluants.



## CHAPITRE V: CONCLUSION

Au cours de mon projet de Master 2, j'ai pu construire une matrice d'interactions entre 247 domaines PDZ et 28 extrémités C-terminales de kinases, en utilisant la technique du double hybride en levure, grâce à la ressource de domaines PDZ mise à ma disposition. A partir de cette matrice et en utilisant des outils bioinformatiques, j'ai pu distinguer, puis analyser 335 nouvelles interactions non décrites dans la littérature.

La matrice générée peut encore être exploitée de différentes manières, afin d'extraire les informations regroupées au sein de cette base de données. Notamment, en jouant sur la clusterisation des peptides qui peut révéler plusieurs points communs. Toutefois, la validité de cette matrice dépend étroitement de la confirmation par d'autres techniques de détection d'interactions protéiques, telles que le pull-down, le Biacore, la coIP...etc.

Pour compléter les interactions déjà mises en évidence, il serait judicieux de tester les interactions entre les séquences C-terminales des kinases avec deux ou plusieurs domaines PDZ, afin de détecter d'éventuelles combinaisons d'interactions. L'étude des interactions entre les protéines kinases et les protéines à domaines PDZ entières, nous permettra de détecter les interactions faisant intervenir des motifs à l'intérieur des protéines.

Afin d'estimer la relevance physiologique de ces interactions, on se doit de tester l'effet de leur inhibition sur la machinerie cellulaire en effectuant des invalidations de gènes par mutations, siRNA,...etc.

La détection de toutes ces interactions nous permettra de décrire de nouvelles implications des domaines PDZ dans les voies cellulaires kinases dépendantes. Et dans l'idéal, projeter le design d'une molécule pouvant moduler une interaction *in vivo* pour aboutir à un effet anticancéreux.

## BIBLIOGRAPHIE:

- Baruch Z. Harris and Wendell A. Lim.** 2001. Mechanism and role of PDZ domains in signalling complex assembly. *Journal of Cell Science* 114: 3219-3231.
- Borg Jean-Paul, Sylvie Marchetto, André Le Bivic, Vincent Ollendorff, Fanny Jaulin-Bastard, Hiroko Saito, Emmanuel Fournier, José Adélaïde, Ben Margolis & Daniel Birnbaum.** 2000. ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nat Cell Biol.* 2(7):407-14.
- Brückner K., J. Pablo Labrador, P. Scheiffele, A. Herb, P. H. Seeburg, R. Klein.** 1999. EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains. *Neuron* 22: 511-524.
- Dai F, Chang C, Lin X, Dai P, Mei L, Feng XH.** 2007. Erbin inhibits transforming growth factor beta signaling through a novel Smad-interacting domain. *Mol Cell Biol.* 19 (17): 6183-94.
- Dev K. K.** 2004. Making protein interactions druggable: targeting PDZ domains. *Nat Rev Drug Discov.* 3(12):1047-56.
- Doyle D.A., Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R.** 1996. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell.* 85(7):1067-76.
- Eunjoon Kim & Morgan Sheng.** 2009. The post synaptic density. *Curr Biol.* 17: R723-4.
- Gao C, Chen YG.** 2010. Dishevelled: The hub of Wnt signalling. *Cell Signal.* 22(5):717-27.
- Gardiol D, Kühne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L.** 1999. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene.* 18(40):5487-96.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166(4):557-80.
- Hanahan D & Weinberg RA.** 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70.
- Hillier BJ, Christopherson KS, Prehoda KE, Brecht DS, Lim WA.** 1999. Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science.* 284(5415):812-5.
- Humbert P, Russell S, Richardson H.** 2003. Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *Bioessays.* 25(6):542-53.
- Im YJ, Lee JH, Park SH, Park SJ, Rho SH, Kang GB, Kim E, Eom SH.** 2003. Crystal structure of the Shank PDZ-ligand complex reveals a class I PDZ interaction and a novel PDZ-PDZ dimerization. *J Biol Chem.* 278(48):48099-104.
- Jaulin-Bastard, Sébastien Nola, Jean-Paul Borg.** 2005. *MEDECINE/SCIENCES.* 21: 267-72.
- Kaech SM, Whitfield CW, Kim SK.** 1998. The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell.* 94(6):761-71.
- Kennedy M. B.** 1995. Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem. Sci.* 20, 350.
- Legouis R, Gansmuller A, Sookhareea S, Boshier JM, Baillie DL, Labouesse M.** 2000. LET-413 is a basolateral protein required for the assembly of adherens junctions in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol.* 2(7):415-22.
- Manning G, DB Whyte, R Martinez, T Hunter, S Sudarsanam.** 2002. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298:1912-1934
- Mishra P, Socolich M, Wall MA, Graves J, Wang Z, Ranganathan R.** 2007. Dynamic scaffolding in a G protein-coupled signaling system. *Cell.* 131(1):80-92.
- Nakagawa S & Huibregtse JM.** 2000. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol.* 20(21):8244-53.
- Niethammer M., E. Kim, M. Sheng.** 1996. Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J. Neurosci.* 16, 2157-2163.
- Nourry, Seth G. N. Grant and Jean-Paul Borg.** 2003. PDZ Domain Proteins: Plug and Play. *Sci. STKE* (179), re7.
- Pawson T.** 2007. Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Curr Opin Cell Biol* 19:112-116.
- Radziwill G, Weiss A, Heinrich J, Baumgartner M, Boisguerin P, Owada K, Moelling K.** 2007. *EMBO J.* 26(11):2633-44.
- Sheng M., Hung AY.** 2002. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem.* 277(8):5699-702.
- Skelton NJ, Koehler MF, Zobel K, Wong WL, Yeh S, Pisabarro MT, Yin JP, Lasky LA, Sidhu SS.** 2003. Origins of PDZ domain ligand specificity. Structure determination and mutagenesis of the Erbin PDZ domain. *J Biol Chem.* 278(9):7645-54
- Tsunoda S, Sierralta J, Sun Y, Bodner R, Suzuki E, Becker A, Socolich M, Zuker CS.** 1997. A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature.* 388(6639):243-9.
- Tkachenko E, Elfenbein A, Tirziu D, Simons M.** 2006. Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner. *Circ Res.* 98(11):1398-404.
- Valiente M, Andrés-Pons A, Gomar B, Torres J, Gil A, Tapparel C, Antonarakis SE, Pulido R.** 2005. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J Biol Chem.* 80(32):28936-43.
- Waldron RT, Whitelegge JP, Faulk KF, Rozengurt E.** 2007. Identification of a novel phosphorylation site in c-jun directly targeted in vitro by protein kinase D. *Biochem Biophys Res Commun.* 356(2):361-7.
- Zimmermann P, Meerschaert K, Reekmans G, Leenaerts I, Small JV, Vandekerckhove J, David G, Gettemans J.** 2002. PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol Cell.* 9(6):1215-25.



## RESUME

Les protéines sont les moteurs fondamentaux de l'organisation cellulaire en assurant la régulation des aspects fonctionnels et structuraux des cellules. Pour établir et maintenir l'homéostasie cellulaire, les protéines s'intègrent entre elles et interagissent via des domaines d'interactions protéiques, jouant le rôle d'adaptateurs. Les domaines PDZ (PSD-95, DLG-1 et ZO1) sont des domaines d'interactions protéines-protéines impliqués dans la polarité, la signalisation et l'adressage. Ces domaines protéiques reconnaissent en général, un motif consensus en extrémité C terminale de la protéine cible (motif de type I, II et III). Les protéines à domaines PDZ ont un rôle reconnu dans le développement des cancers, en régulant de différentes manières, les fonctions de protéines oncogènes ou suppresseurs de tumeur (kinases, phosphatases,...). Les protéines kinases sont souvent codées par des oncogènes, qui constituent, une fois mutés, l'un des acteurs majeurs de la tumorigénèse. Certaines kinases présentent un motif consensus C terminal potentiellement reconnu par les domaines PDZ. De ce fait, une meilleure compréhension des interactions PDZ-kinases permettra d'apporter des éclairages nouveaux sur leur implication dans le développement tumoral.

Mon projet de master 2 s'est porté sur l'identification par double hybride en levure de nouvelles interactions entre les protéines à domaines PDZ et les protéines kinases, afin de construire une matrice d'interactions, qui va compléter les travaux déjà initiés au sein de notre équipe de recherche. Après avoir obtenu par amplification PCR, 29 séquences C terminales de kinases contenant un motif consensus de type I, j'ai cloné celles-ci dans des vecteurs adéquats qui sont transformés dans des levures Ah109. En accouplant ces dernières avec les levures partenaires Y187 prétransformés avec notre ressource de domaines PDZ, j'ai pu détecter les interactions par test phénotypiques impliquant la reconstitution du facteur de transcription Gal4. Parmi tous les tests réalisés, 350 se sont révélés positifs. L'analyse par une approche de bioinformatique, m'a permis de distinguer les nouvelles interactions non décrites dans la littérature, interactions auxquelles je pourrai m'intéresser plus particulièrement, en essayant de les valider biochimiquement et fonctionnellement.

Ainsi, dans l'optique d'un projet de thèse, la matrice générée peut être exploitée de différentes manières, afin d'extraire les informations regroupées au sein de cette base de données. Toutefois, il est impératif de confirmer les interactions détectées en faisant appel à d'autres techniques, telles que le pull-down, le Biacore, la coIP...etc. En outre, La pertinence physiologique de ces interactions peut être testée par invalidations de gènes (mutations, siRNA,...etc.).

La détection de toutes ces interactions nous permettra de décrire de nouvelles implications des domaines PDZ dans les voies cellulaires kinases-dépendantes. Et dans l'idéal, projeter le design d'une molécule pouvant moduler une interaction *in vivo* pour aboutir à un effet anticancéreux.