

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

RÔLE DE LA VOIE DE LA SUMOYLATION DANS
LES FONCTIONS DE LA PROTÉINE TRIM55

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
NOUR EL HOUDA HAMMAMI

SEPTEMBRE 2020

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

DÉDICACES

C'est grâce à DIEU que tout a commencé, et c'est à lui que je rends grâce. Le reste n'est que dédicaces.

Je dédie ce mémoire à . . .

Mon cher père,

« L'épaule solide, l'œil attentif et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments. Que DIEU te préserve et te procure santé et longue vie. »

Ma chère mère,

« Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte. En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée. »

Mon cher frère et mes chères sœurs,

« Mes anges gardiens et mes fidèles accompagnants dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite. »

À mes amis de toujours

« Souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère. »

REMERCIEMENTS

C'est avec un grand plaisir que je réserve cette page en signe de gratitude et de reconnaissance à tous ceux qui ont assisté ce travail.

Je remercie mon directeur de recherche Dr Lionel Berthoux pour m'avoir accepté dans son laboratoire, pour son aide, sa patience et sa confiance en moi pour réussir ce projet. Je le prie de bien vouloir trouver ici le témoignage de ma vive gratitude pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance à Natacha Mérindol pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses précieuses directives tout au long de la réalisation de ce travail, qui m'ont beaucoup impressionnée.

Un grand merci aussi à Mélodie B. Plourde pour son aide, son soutien et son coup de main pour certaines difficultés.

J'adresse mes vifs remerciements à mes collègues de laboratoire Soumia Khalfi, Amita Singh et Kevin Désaulniers pour leurs encouragements et leur contribution à créer une atmosphère harmonieuse de travail.

RÉSUMÉ

Les protéines TRIM (Tripartite Motif) sont une large famille de protéines humaines dont certains membres sont SUMOylés ou interagissent avec SUMO par des motifs d'interaction non covalente avec SUMO (SIM). Les protéines TRIM possèdent trois domaines en commun en N-terminal incluant le domaine RING (ligase d'ubiquitine) et diffèrent au niveau de leurs extrémités C-terminales, ce qui a conduit à leur classification. TRIM54 (MURF3), TRIM55 (MURF2) et TRIM63 (MURF1) font partie du deuxième groupe des TRIM et sont connues pour réguler la dynamique des microtubules.

Notre objectif est de déchiffrer les relations fonctionnelles entre la SUMOylation et les MURF. Pour ce faire, nous avons exprimé et purifié par immunoprécipitation les protéines marquées (FLAG-TRIM) dans des cellules humaines. Nos résultats indiquent que les MURF ne sont pas SUMOylées. Par contre, un outil de prédiction informatique (GPS-SUMO) suggère que TRIM55 contient deux SIM potentiels (SIM1 et SIM2). De plus, nous avons observé que la surexpression de SUMO-3 favorise la dégradation de TRIM55 essentiellement via la voie protéasomique. SIM1mut et SIM2mut sont plus stables que TRIM55 WT. En présence d'ubiquitine surexprimée, nous avons observé la poly-ubiquitination de TRIM55 WT via des liaisons K48.

Par microscopie, nous observons que TRIM55 WT forment des corps cytoplasmiques, alors que SIM1 et SIM2 ont une localisation périnucléaire diffuse. Dans une autre expérience, nous observons que SIM1 et SIM2 co-transfектées avec SUMO-1 et SUMO-3 présentent une faible co-localisation avec les microtubules.

En conclusion, nos résultats suggèrent que SUMO-3 favorise la dégradation et la poly-ubiquitination de TRIM55 via des chaînes K48 ainsi que sa dégradation. Les motifs SIM1 et SIM2 favorisent le roulement rapide de TRIM55, ce qui suggère qu'ils pourraient être impliqués dans des interactions avec SUMO-3. Nos résultats indiquent que la voie de la SUMOylation régule la localisation, la stabilité et probablement l'activité E3 ligase d'ubiquitine du domaine RING de TRIM55.

Mots clés : SUMOylation, SIM, TRIM55, stabilité, poly-ubiquitination et localisation subcellulaire

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACES	ii
REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 La famille des TRIM	1
1.1.1 Classification des protéines TRIM	1
1.1.2 Structure des TRIM	2
1.1.3 Origines et fonctions de certains membres des protéines TRIM	5
1.1.4 Les Muscles RING Finger (MURF)	8
1.2 Les modifications post-traductionnelles	13
1.2.1 La SUMOylation.....	13
1.2.2 Moyen de prédiction des sites de SUMOylation et/ou des motifs d'interaction avec SUMO	19
1.2.3 Les protéines TRIM et la voie de la SUMOylation	19
1.2.4 Les enzymes E3 ligase de SUMO.....	24
1.2.5 Les inhibiteurs de la dé-SUMOylation	27
1.2.6 Ubiquitination	28
CHAPITRE II	
PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS.....	32
CHAPITRE III	
MATÉRIELS ET MÉTHODES	34
3.1 Culture cellulaire	34
3.2 Plasmides utilisés.....	34
3.3 Transfection et lyse cellulaire.....	35
3.4 Immunoprécipitation.....	35

3.5 Western Blot.....	36
3.6 Test de stabilité.....	37
3.7 Mutation des motifs d'interaction avec SUMO (SIM)	37
3.8 Microscopie à immunofluorescence	40
3.9 PyMOL	40
CHAPITRE IV RÉSULTATS.....	42
4.1 Western Blotting des WCL et des IP des MURF exogènes co-transfектés avec SUMO.....	42
4.2 Stabilité de TRIM55	44
4.3 Identification des motifs d'interaction avec SUMO.....	46
4.4 Rôle des SIM dans la stabilité de TRIM55.....	47
4.5 Rôle des SIM dans la localisation subcellulaire	50
4.6 Rôle des SIM dans l'ubiquitination	54
CHAPITRE V DISCUSSION	57
CHAPITRE VI CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	62
ANNEXE A PRÉPARATION DES SOLUTIONS	76
ANNEXE B LES PLASMIDES UTILISÉS	80

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Classification des protéines TRIM.....	2
1.2	Organisation de la séquence primaire du domaine RING de type consensus, CX ₂ CX(9-39)CX(1-3)HX(2-3)C/HX ₂ CX(4-48)CX ₂ C.....	3
1.3	Structure tridimensionnelle du domaine RING	4
1.4	Relation de TRIM55 (MURF2) avec la titine, myosine, les filaments de l'actine et les microtubules durant la formation de sarcomère	9
1.5	Structures des MURF.....	11
1.6	Co-Localisation de TRIM55 avec les microtubules	12
1.7	Co-localisation de TRIM63 avec les microtubules.....	12
1.8	La voie de la SUMOylation	14
1.9	Structure de la protéine SUMO.....	15
1.10	Les différentes formes de la SUMOylation	16
1.11	Les différentes isoformes de PML.....	21
1.12	Dégénération de PML.....	23
1.13	Structure des PIAS.....	26
1.14	La voie de l'ubiquitination.....	29
3.1	Schéma explicatif de l'immunoprécipitation	36
4.1	Aucune MURF n'est SUMOylée	43
4.2	TRIM55 est dégradée par la voie protéasomique et lysosomiale en présence de SUMO-3	45
4.3	TRIM55 contient deux SIM potentiels	46
4.4	Modélisation de TRIM55.....	47
4.5	SIM1mut et SIM2mut sont plus stables que TRIM55 WT	48

4.6	Pas d'effet des voies protéasomique et lysosomiale dans l'expression des mutants.....	49
4.7	SIM1mut et SIM2mut présentent une distribution plus diffuse autour de noyau	52
4.8	SIM1mut et SIM2mut co-transfектées avec SUMO co-localisent partiellement avec les microtubules.....	54
4.9	Forme ubiquitinée de TRIM55	55
4.10	SIM1mut ou SIM2mut préviennent la forme poly-ubiquitinée de TRIM55 .	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Localisation subcellulaire et fonctions du quelques TRIM	7
1.2	Les différents types des SIM.....	19
3.1	Conditions des PCR 1	38
3.2	Conditions des PCR 2	39
3.3	Réaction de ligation avec le T4 ligase (NEB).....	39
3.4	Analyse par PyMOL	41
4.1	Mutations des SIM.....	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP-ribose	Adenosin Diphosphate Ribose (Adénosine diphosphate ribose)
AP-1	Activator Protein-1 (Protéine activatrice-1)
ARN	Acide Ribonucléique
ARNr	Acide Ribonucléique ribosomal
BafA	Bafilomycin (Bafilomycine)
BSA	Bovin Serum Albumin (Albumine de sérum bovin)
CD4 ⁺	Cluster of Differentiation 4 (Lymphocytes T de classe 4 de différenciation)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Milieu Eagle Modifié de Dulbecco)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EB	Elution Buffer (tampon d'élution)
ER α	Estrogen Receptor alpha (Récepteur d'œstrogène alpha)
FBS	Fetal Bovine Serum (Sérum du Bovin Fœtal)
HCM	Hydrophobic Core Motif (Motif de SUMOylation des noyaux hydrophobes)
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus (Homologue au E6-AP Carboxyle Terminale)
HeLa	Henrietta Lacks (nom de la patiente)
IFN	Interferon (Interféron)
IgG-HRP	Immunoglobulin G conjugated to Horseradish Peroxidase (Immunoglobuline G conjugué à horseradish peroxidase)
IP	Immunoprécipitation

IRF3	Interferon Regulatory Factor 3 (Facteur de régulation de l'interféron)
ISM	Inverted SUMOylation Motif (Motif consensus de SUMOylation inversé)
LB	Lysogeny Broth (Bouillon de lysogénie)
LMB	Leptomycin Inhibitor (Inhibiteur de leptomycine B)
Mdm2	Mouse double minute 2 (double minute 2 des souris)
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts (Fibroblaste Embryonnaires de souris)
MURF	Muscle RING Finger (protéine musculaire RING-Finger)
NB-PML	Nuclear Bodies of PML (corps nucléaire des PML)
NDSM	Negatively Dependent SUMOylation Motif (Motif de SUMOylation dépendant des acides aminés chargé négativement)
NEM	N-Ethylmaleimide (N-Éthylmaléimide)
NF-κB	Nuclear Factor Kappa-light-Chain-Enhancer of activated B cells (Facteur Nucléaire Kappa B)
PARP1	Poly ADP-Ribose Polymerase 1 (Poly (ADP-Ribose) Polymérase 1)
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Tampon phosphate salin)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction en Chaîne par Polymérase)
PDB	Protein Data Base (Banque des données sur les protéines)
PDSM	Phosphorylation-Dependent SUMOylation Motif (Motif de SUMOylation dépendant de la phosphorylation)
PEI	Polyethylenimine (Polyéthylénimine)
PHD	Plant HomeoDomain Finger (homéodomaine végétale)
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT (Inhibiteur de la protéine STAT activé)
PINIT	Proline-Isoleucine-Asparagine-Isoleucine-Thréonine
PML-RAR α	Retinoic Acid Receptor (Récepteur de l'acide rétinoïque)
PML	Promyelocytic Leukemia protein (protéine de leucémie promyélocyttaire)

PSB	Protein Solving Protein (Solution de dépôt)
RBCC	RING-B-B-Box-Coiled-Coil
RBR	RING Between RING (RING entre RING)
RING	Really Interesting New Gene
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay buffer (tampon de test de radioimmunoprécipitation)
RNF4	RING-Finger 4 (la protéine RING Finger 4)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SAP	N-terminal scaffold attachment factor-A/B, acinus and PIAS domain (Facteur d'attachement N-terminal de l'échafaudage A / B, acinus et domaine PIAS)
SENP	Sentrine protease (protéase spécifique de la sentrine)
SIM	SUMO Interaction Motif (Motif d'interaction avec SUMO)
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression (Le bouillon Super Optimal avec répression des catabolites)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (Signal Transducteur et Activateurs de la Transcription)
SUMO	Small-Ubiquitin-like Modifier
TBS	Tris-Buffered saline (Solution Saline Tamponnée au Tris)
TIF1 α	Transcriptional Intermediary Factor 1 alpha (Facteur Intermédiaire Transcriptionnelle 1 alpha)
TopoIII α	Topoisomerase III α (Topoisomérase III α)
TRIM	TRIpartite Motif (motif tripartite)
Ub	Ubiquitin (Ubiquitine)
Ubc9	Ubiquitin conjugating enzyme 9 (Ubiquitine de conjugaison 9)
UBE1	Ubiquitin-activating Enzyme 1 (Enzyme 1 d'activation de l'ubiquitine)
USPL1	Ubiquitin Specific Protease-Like 1 (Protéase-Like 1 Spécifique à l'Ubiquitine)

VIH-1 Human Immunodeficiency Viruses 1 (Virus d'immunodéficience humaine 1)

WB Western Blotting

WCL Whole Cell Lysate (lysats totaux)

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La famille des TRIM

Les protéines TRIM sont une large famille de protéines qui se trouvent chez les champignons, les plantes, les animaux, et aussi chez l'homme. Certains membres de cette famille sont présentés à la fois chez les vertébrés et les invertébrés en formant le groupe I. D'autres membres sont présentés seulement chez les vertébrés, qui sont caractérisés par le domaine SPRY en formant le groupe II (1).

Les protéines TRIM sont souvent induites par les interférons. En effet, les interférons de type I et II (IFN α , IFN β et IFN γ) activent le signal transducteur et l'activateur de la transcription (STAT1) et le complexe STAT-IRF9 (Facteur régulateur 9 des IFN). Cette activation mène à l'induction de la transcription de nombreux gènes des TRIM, notamment TRIM5 α , TRIM8, TRIM21, TRIM22 et TRIM19(2). L'induction des protéines TRIM par les IFN peut intervenir dans l'immunité innée (3).

Les TRIM se caractérisent par des motifs TRI-partite « TRI partite Motif », nommés aussi RBCC pour RING, B-Box et Coiled-Coil (2).

Le domaine RING se situe dans l'extrémité N-terminale suivi d'un ou deux domaines B-Box et d'un domaine Coiled-Coil. Les TRIM diffèrent au niveau de leurs extrémités C-terminales d'où leur classification (4).

1.1.1 Classification des protéines TRIM

La nature de l'extrémité C-terminale des TRIM sert de base à leur classification. Certaines TRIM contiennent un domaine NHL (NCL-1/HT2A/LIN-41 repeat),

d'autres contiennent un domaine B30.2-like ou RFP (Ret Finger Protein) ou SPRY (SplA and ryanodine receptor) ou ARF (ADP-Ribosylation Factor) ou PHD (Plant HomeoDomain Finger) ou BROMO ou encore un domaine Cos (4-6). Les protéines TRIM sont ainsi classées en 11 groupes (Figure 1.1) (7,8).

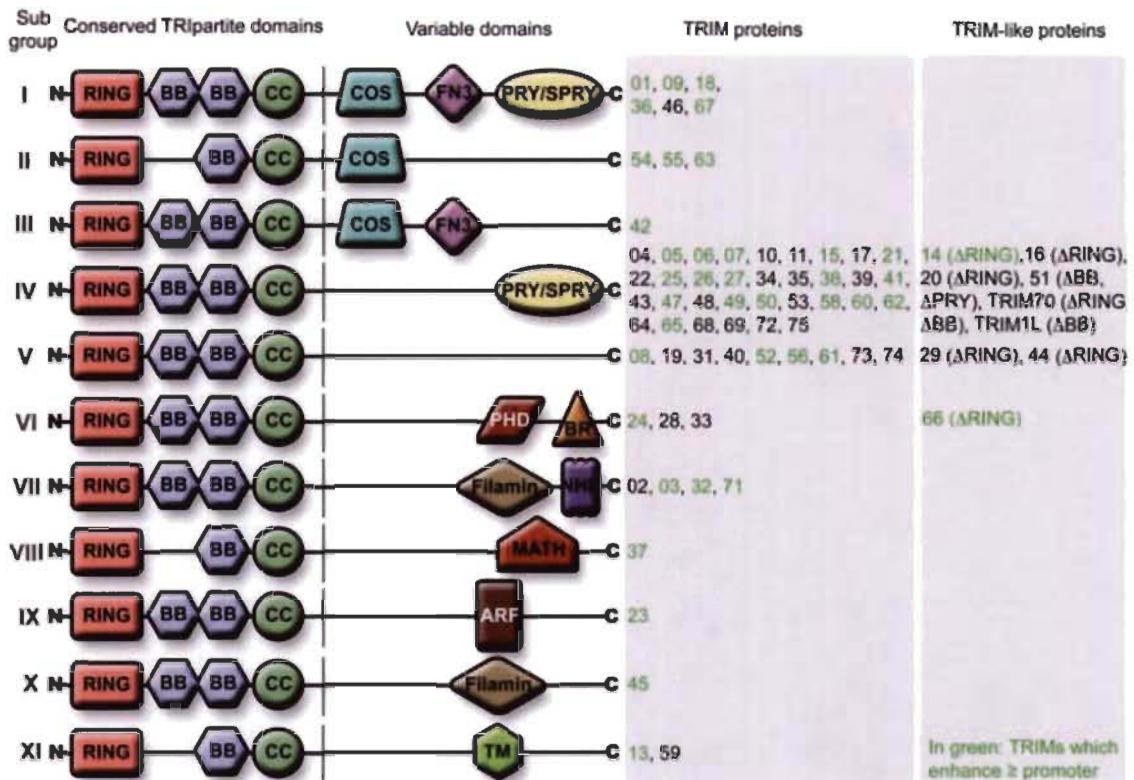


Figure 1.1 Classification des protéines TRIM.

Le domaine RING est indiqué en rouge, le B-Box en violet, Coiled-Coil en vert, et d'autres couleurs sont utilisées pour les autres différents domaines. Les protéines TRIM-like sont des protéines dépourvues d'au moins un domaine. Δ : sans le/s domaine/s. Les protéines TRIM qui sont activées par au moins un promoteur sont indiquées par des chiffres verts. Les chiffres noirs et verts indiquent l'ordre de la découverte des TRIM (8).

1.1.2 Structure des TRIM

1.1.2.1 Le domaine RING

Le domaine RING est un domaine structural de la protéine qui contient des cystéines et des histidines qui coordonnent deux atomes de zinc (6). Le RING contient une séquence consensus fortement conservée de type CX₂CX(9-39)CX(1-3)HX(2-3)C/HX₂CX(4-

48)CX2C (Figure 1.2) (9,10). Ce motif de liaison du zinc se situe à 10-20 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la protéine (Figure 1.3) (11). La coordination des histidines et des cystéines avec les deux atomes de zinc maintient la structure ou appelé la « Cross-brace » du domaine RING (12). Les protéines ayant ces domaines sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, l'apoptose et la prolifération cellulaire (13). Ce domaine confère aussi l'activité E3 ligase de l'ubiquitine des TRIM (14) et il intervient avec d'autres domaines pour maintenir la structure tridimensionnelle des protéines (3).

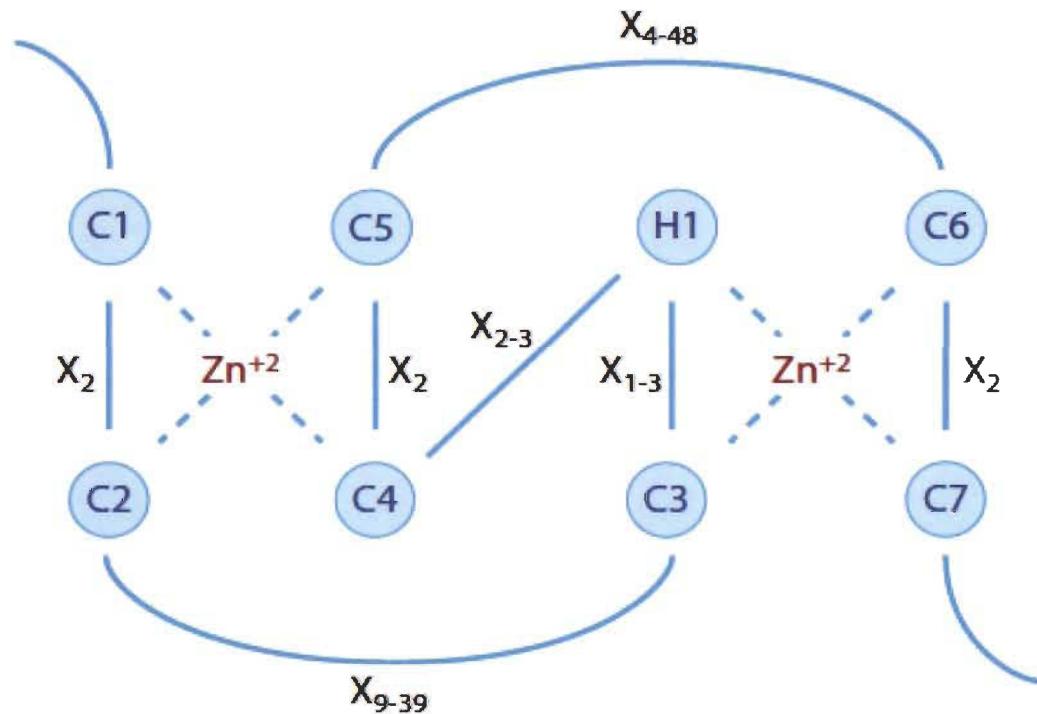


Figure 1.2 Organisation de la séquence primaire du domaine RING de type consensus, CX2CX(9-39)CX(1-3)HX(2-3)C/HX2CX(4-48)CX2C.
La première cystéine qui coordonne le zinc est appelée C1, et ainsi de suite. H1 désigne le ligand histidine. X_n est le nombre de résidus d'acides aminés dans les régions d'espacement entre les ligands de zinc (10).

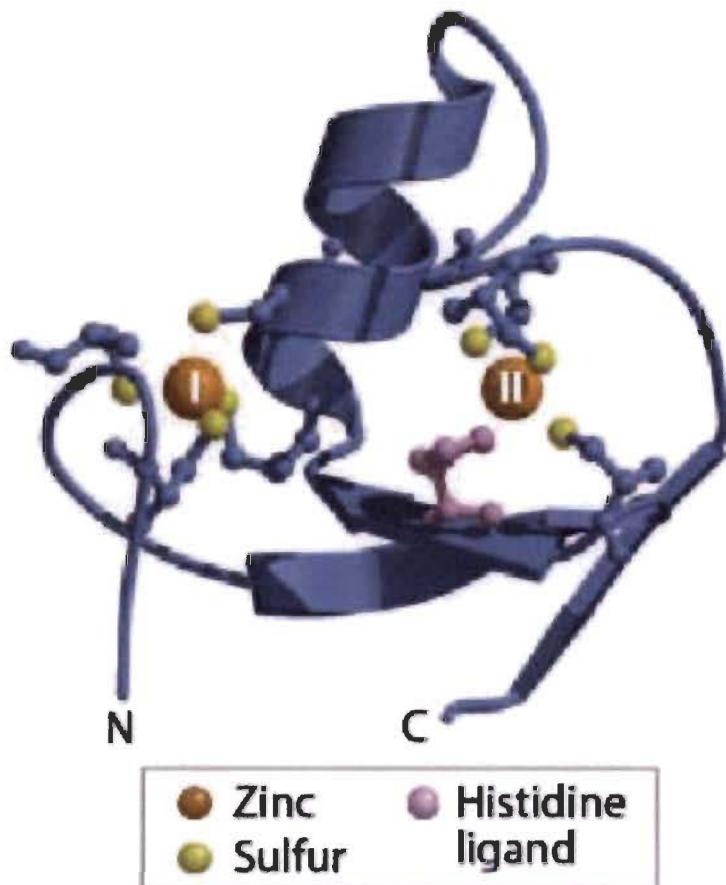


Figure 1.3 Structure tridimensionnelle du domaine RING (10).

Les cercles orange sont deux atomes de zinc. Le jaune indique les atomes de sulfures. Le violet désigne les atomes d'histidine.

1.1.2.2 Les domaines B-Box et Coiled-Coil

Le domaine B-Box est aussi un motif de liaison de zinc. Les protéines TRIM peuvent contenir un ou deux domaines B-Box (B-Box 1 et B-Box 2). Chacun de ces domaines possède un motif consensus spécifique de liaison au zinc. Comme le domaine RING, le domaine B-Box détermine la structure tridimensionnelle des protéines (3,15). Ce domaine joue un rôle important dans l’interaction protéine-protéine, particulièrement, la dimérisation des protéines TRIM (16).

Le domaine Coiled-Coil est présent dans plusieurs familles des protéines et suit toujours le domaine B-Box. Contrairement aux domaines RING et B-Box, le domaine

Coiled-Coil est plus variable (3). Ce domaine aussi est impliqué dans l'interaction protéine-protéine (16,17).

Les protéines TRIM se caractérisent par le motif RBCC, qui est un motif de liaison de zinc. Les différents domaines, RING, B-Box et Coiled-Coil sont fonctionnellement interchangeables. Par exemple, la protéine TRIM5 α est connue comme un facteur de restriction de la VIH-1. La délétion du son domaine RING diminue mais, n'abolit pas, l'activité antivirale de TRIM5 α rhésus, tandis que la suppression du son domaine B-Box élimine complètement la capacité de restriction de ce virus (18,19).

1.1.3 Origines et fonctions de certains membres des protéines TRIM

Les protéines TRIM sont présentes chez tous les eucaryotes. En particulier, 75 protéines TRIM humaines ont été découvertes jusqu'à présent (8) et la plupart de ces protéines sont induites par les interférons de type I et II (2). Quant à l'origine de ces protéines, Michael Schubert a démontré que les protéines TRIM sont apparues durant l'évolution des eucaryotes et qui sont potentiellement liées à une ubiquitine ligase de type RING-finger connue sous le nom de Facteurs associés aux récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TRAF) (1).

Chaque membre de la famille des TRIM peut s'exprimer dans des cellules particulières et il peut jouer des rôles bien déterminés. Par conséquent, les protéines TRIM sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires notamment l'immunité innée (3,11,20), les cancers et aussi dans des troubles neurologiques (6). Certaines TRIM comme TRIM20, TRIM32 et TRIM35 sont impliquées dans la mort programmée des cellules (21-23). En effet, la mutation du gène *trim20* provoque la maladie de la fièvre méditerranéenne (24), la mutation aussi de l'acide aspartique 487 en acide asparagine du gène de TRIM32 cause la dystrophie musculaire des ceintures (25).

La protéine TRIM21 nommée aussi RO52 est impliquée dans l'activation des lymphocytes T (26).

La moitié des TRIM humaines connues régulent positivement les réponses de l'immunité innée (8).

Par exemple, les protéines TRIM22 nommées aussi STAF-50 et TRIM30 nommée aussi rpt-1 sont impliquées dans la réponse immunitaire antivirale, respectivement dans la transduction des signaux induits par les IFN β , en bloquant le trafic intracellulaire de la protéine structurale virale Gag à la surface des cellules et dans l'activation des CD4 $^+$ (27-29).

De plus, TRIM5, TRIM9, TRIM50, TRIM66 et TRIM67 peuvent intervenir directement dans l'activation de l'immunité innée (8).

En cas d'infection par le virus d'encéphalomyocardite, TRIM65 favorise l'activation des IRF3 (30).

TRIM19, nommée aussi PML, agit comme un facteur de restriction contre les virus à ADN, tels que les virus de la famille de l'herpès, les adénovirus, papillomavirus et parvovirus (30). De plus, TRIM19 est un régulateur positif de l'induction des IFN durant l'infection par le virus de l'herpès simplex (31).

TRIM5 α joue aussi le rôle de facteur de restriction contre le virus d'immunodéficience humaine 1 (VIH1) (32).

Par ailleurs, TRIM18, TRIM54, TRIM55 et TRIM63 sont impliquées dans la dynamique des microtubules (33,34).

Tableau 1.1

Localisation subcellulaire et fonctions du quelques TRIM
(1,6,12,29,35-38)

Nom des protéines	Groupes	Localisation subcellulaire	Fonction
TRIM1 ou MJD2	1	Cytoplasme, microtubules	Facteur de restriction de N-MLV
TRIM18 ou MID1	1	Cytoplasme, microtubules	Régulation de la dynamique des microtubules
TRIM-63 ou MURF-1	2	Noyau, cytoplasme	Régulation de la dynamique des microtubules
TRIM5	4	Cytoplasme	Facteur de restriction de VIH-1. Bloque la liaison avec la capsid de VIH-1.
TRIM11	4	Cytoplasme, noyau	Neuroprotection
TRIM20 ou MEFV	4	Cytoplasme, microtubules, noyau	Apoptose
TRIM21 ou RO52	4	Noyau	Activation des cellules T
TRIM22 ou STAF50	4	Noyau	Apoptose, facteur de restriction de VIH. Inhibe la transcription du promoteur LTR.
TRIM27	4	Cytoplasme, noyau	Gene-silencing
TRIM19 ou PML	5	Noyau	Apoptose, senescence, formation des NB-PML
TRIM28 ou TIF1B	6	Noyau	Contrôle épigénétique de la transcription
TRIM32 ou HT2A	7	-	Apoptose
TRIM37	8	Peroxyosome	Une cible spécifique pour la répression transcriptionnelle épigénétique
TRIM45	10	Noyau, cytoplasme	Contrôle la transcription
TRIM13	11	Réticulum endoplasmique	Stimule l'activité de NF-KB dans la voie de signalisation de TLR2. Supresseur des tumeurs

Les différents membres de la famille des TRIM partagent entre eux le domaine RBCC et ils se diffèrent au niveau de leurs extrémités C-terminales. Les protéines TRIM se diversifient aussi dans leurs fonctions mêmes pour les membres des mêmes groupes.

1.1.4 Les Muscles RING Finger (MURF)

Les MURF sont le deuxième groupe des protéines TRIM contenant trois protéines qui sont : TRIM54 ou MURF-3, TRIM55 ou MURF-2 et TRIM63 ou MURF-1 (4,7). Ce groupe se caractérise par le domaine Cos qui est impliqué dans la dynamique des microtubules (4).

Les MURF sont spécifiquement exprimées dans les tissus des muscles striés (39). Tout d'abord, les fonctions des muscles striées dépendent aux activités et des réseaux cytosquelettiques incluant les myofibrilles, les microtubules et les filaments. Les MURF présentent récemment une excellente famille de protéine qui peut créer des interactions avec les composants de la myofibrille, incluant l'interaction de la titine avec les microtubules (Figure 1.4) (40).

TRIM54 (MURF-3) et TRIM55 (MURF-2) interviennent dans la glutamylation des microtubules et dans l'organisation des filaments des myosines. D'un autre côté, toutes les MURF s'associent avec les différents compartiments cytosquelettiques notamment, les microtubules, les deux stries M et Z des sarcomères (41).

Les MURF sont spécifiquement exprimées aussi dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques. De plus, leur expression joue un rôle important dans la différenciation des myoblastes squelettiques (42).

Les MURF sont identifiées aussi comme des régulateurs myogéniques des microtubules des cellules musculaires striées, ce qui explique la relation entre l'organisation des microtubules et la myogenèse (43). Kieran M. Short and Timothy C. Cox ont démontré que le domaine Cos n'est pas nécessaire dans la dimérisation (4). De l'autre part, le domaine Cos ainsi que le domaine Coiled-Coil des MURF-3 jouent un rôle important dans l'association avec les microtubules et l'homodimérisation (43).

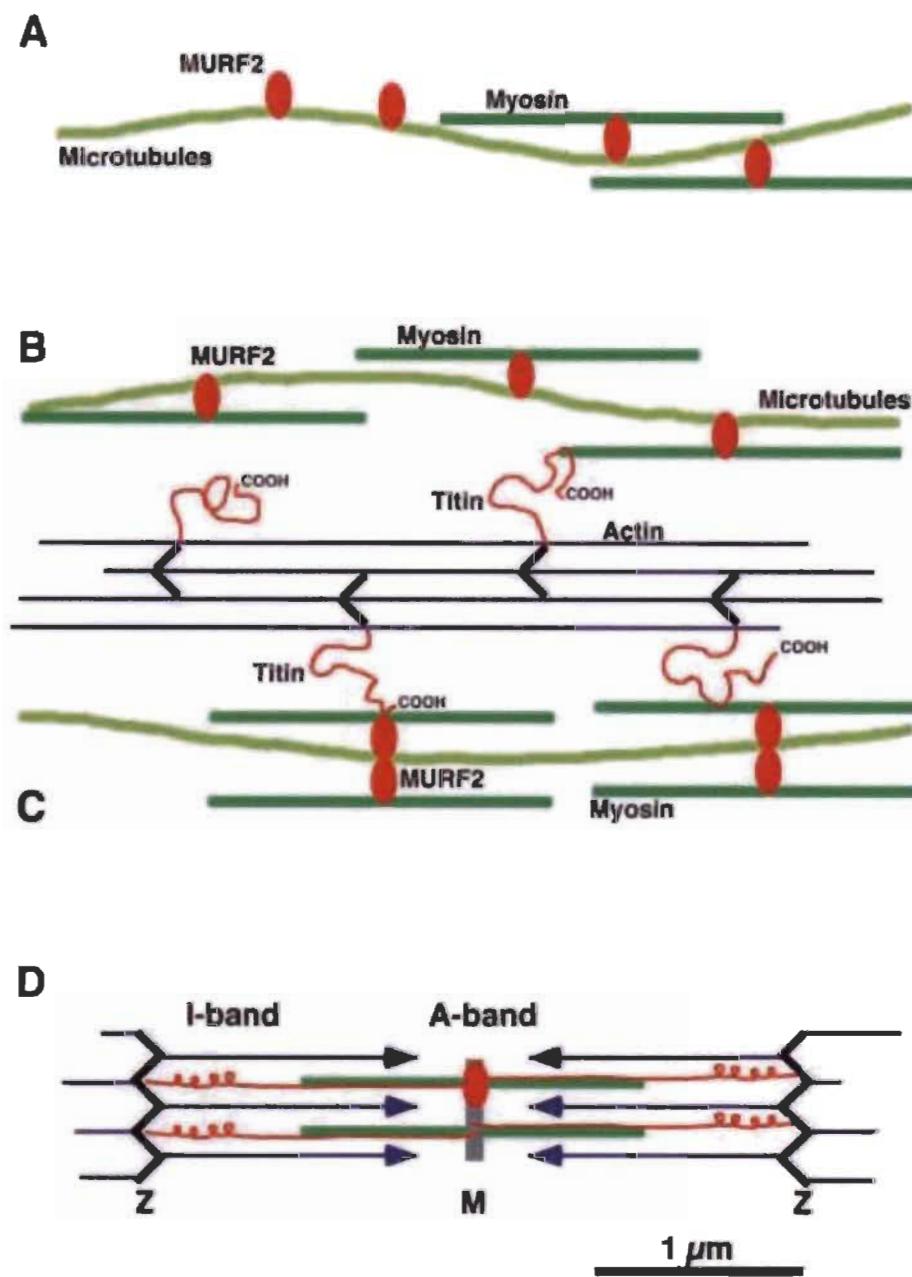


Figure 1.4 Relation de TRIM55 (MURF2) avec la titine, myosine, les filaments de l'actine et les microtubules durant la formation de sarcomère.

(A) Les premières étapes de l'assemblage des myofibrilles, MURF2 (ovale rouge) s'associent avec les microtubules (vert claire). La myosine (vert foncé) s'associe avec MURF2-microtubule. (B) Les titines (chaînes rouges) interagissent avec les actines (lignes bleues). Cette interaction se co-localise avec MURF2-microtubule-myosine. (C) MURF2 et la myosine se co-localisent dans les myofibrilles striées durant la formation des stries Z-Z. (D) Chez la myofibrille mature, la myosine et l'actine sont disposées d'une façon croisée. La molécule de la titine est étendue, l'extrémité N-terminale reste dans la strie Z et la partie C-terminale est intégré avec la strie M (44).

1.1.4.1 Isoformes et fonctions de chaque membre des MURF

L'utilisation de la base des données des séquences des protéines « UniProt » montre que les MURF présentent différentes isoformes.

TRIM54 ou MURF-3 a deux isoformes :

- a) **Isoforme 1** à 348 acides aminés
- b) **Isoforme 2** à 400 acides aminés

TRIM54 s'associe aux microtubules et elle maintient leur stabilité en créant un réseau résistant à la dépolymérisation. Cette association joue un rôle important dans l'assemblage des sarcomères, l'initiation de la myogenèse et la différenciation des muscles. L'association du TRIM54 avec les microtubules, les stries M et Z des sarcomères requiert la stabilité des microtubules (42,45).

– TRIM55 ou MURF-2 a quatre isoformes :

- a) **Isoforme 1** à 548 acides aminés
- b) **Isoforme 2** à 452 acides aminés
- c) **Isoforme 3** à 540 acides aminés
- d) **Isoforme 4** à 241 acides aminés

TRIM55 s'associe transitoirement avec les microtubules, les protéines titines et les myosines, ce qui lui permet d'être impliquée dans la formation de sarcomères. En effet, elle s'accumule à la fois dans la région M du sarcomère dans les microtubules (42,45). TRIM55 intervient ainsi dans la transduction de signal dans les cardiomyocytes qui est lié au déplacement nucléaire de TRIM55, tout en provoquant une réduction du facteur de transcription SRF (42,46).

– TRIM63 ou MURF-1 a deux isoformes :

- a) **Isoforme 1** à 353 acides aminés
- b) **Isoforme 2** à 325 acides aminés

TRIM63 est impliquée dans l'atrophie musculaire squelettique et l'hypertrophie cardiaque (42), ce qui semble associé à son rôle dans le maintien de l'intégrité de la titine M (45).

1.1.4.2 Structures des MURF

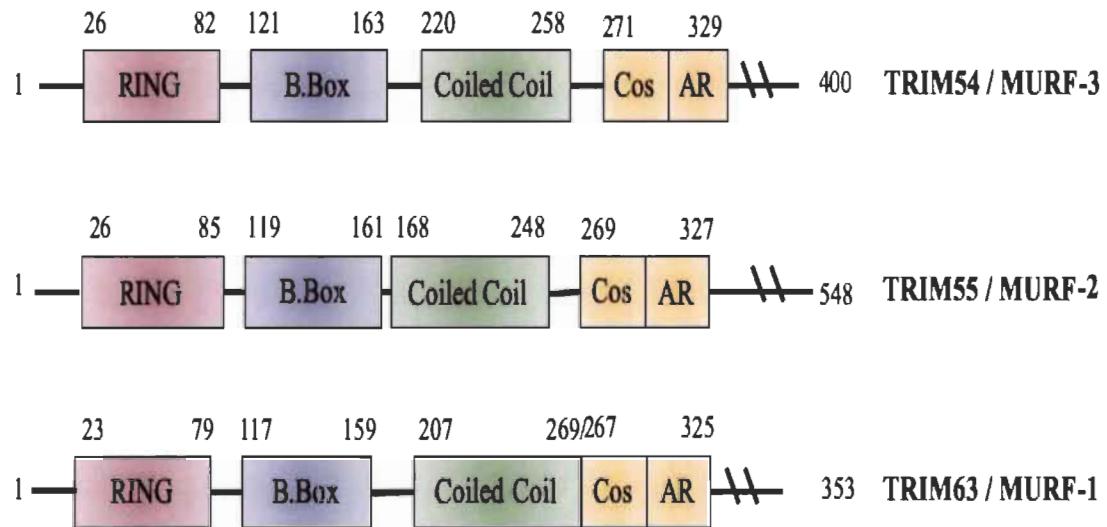


Figure 1.5 Structures des MURF.

1.1.4.3 Localisation des MURF

Comme il est mentionné précédemment que durant l'assemblage des sarcomères, TRIM55 s'associe aux myosines, titines et avec les microtubules d'une manière transitoire (Figure 1.6) (44). TRIM63 aussi co-localise avec les microtubules (Figure 1.7) (47).

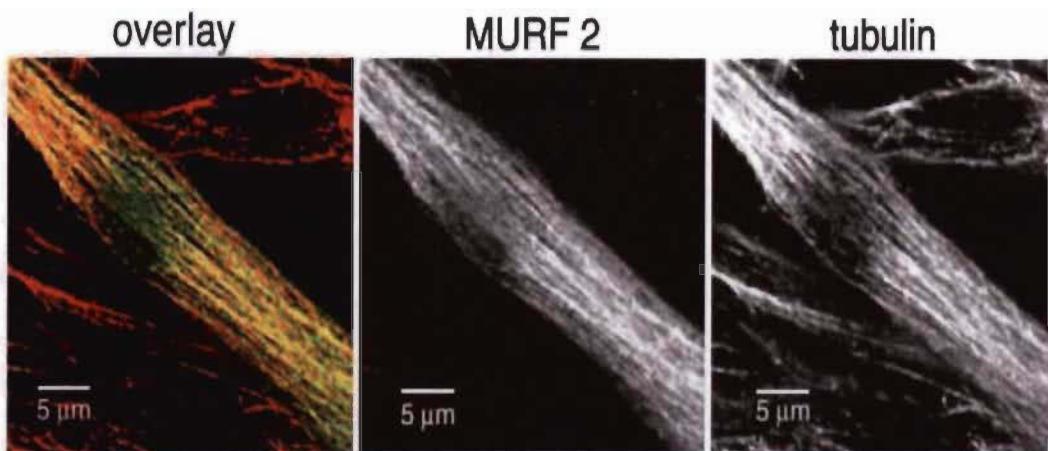


Figure 1.6 Co-Localisation de TRIM55 avec les microtubules.

Une double immunofluorescence est effectuée en utilisant des anticorps anti-MURF-2 (vert) et anti-tubuline (rouge). La co-localisation de MURF-2 endogène avec les microtubules dans les cellules différencierées C47 est identifiée par la couleur jaune (44).

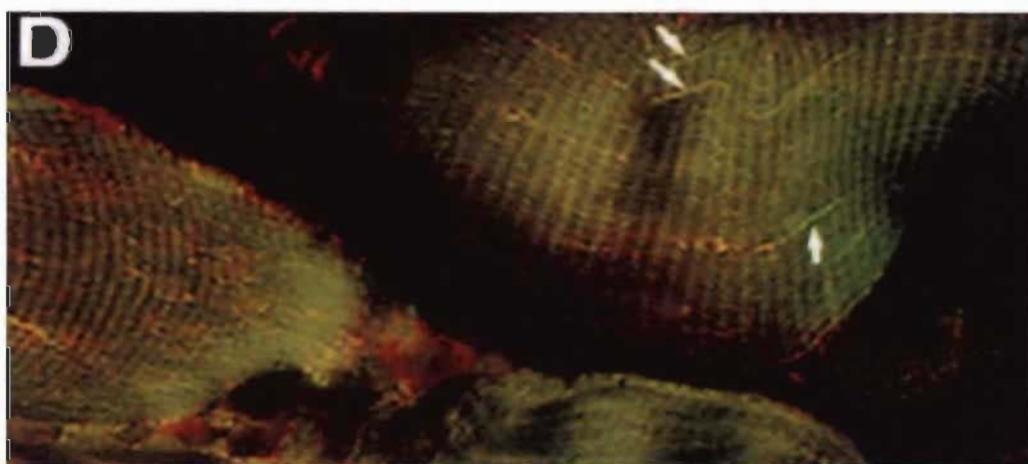


Figure 1.7 Co-localisation de TRIM63 avec les microtubules.

Une immunofluorescence est effectuée en utilisant un anticorps anti-MURF (vert). La co-localisation de TRIM63 endogène (vert) avec les microtubules (rouge) dans le muscle squelettique est identifiée par les flèches blanches (47).

Le domaine cos caractérise les trois membres du deuxième groupe des TRIM « MURF », qui est impliqué dans la dynamique des microtubules. Chaque MURF présente plusieurs isoformes, qui se distinguent au niveau de leurs séquences consensus et aussi dans leurs expressions cellulaires. Ce groupe des protéines joue un rôle important dans la formation de sarcomères.

1.2 Les modifications post-traductionnelles

1.2.1 La SUMOylation

La modification post-traductionnelle par la protéine SUMO a été identifiée en 1996. La SUMOylation est un processus très dynamique et réversible qui consiste en la fixation d'une petite protéine, SUMO, sur le groupe ϵ -aminé de la lysine de substrat. Cette modification est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la réparation du génome, la réPLICATION d'ADN, la transcription et la régulation du cycle cellulaire (48) (49) (50).

La SUMOylation est un processus enzymatique qui nécessite l'intervention de trois enzymes : une enzyme d'activation (E1), une enzyme de conjugaison (E2) et une enzyme de ligase de SUMO (E3) (51). Le précurseur de protéine SUMO est immature, et nécessite une étape de maturation consistant au clivage de son extrémité C-terminale par les SENtrines Protéases (SENP) (tout en libérant un motif di-glycine).

Par la suite, SUMO mature est activée par une adénylation accompagnée d'une liaison thioester entre l'extrémité C-terminale de SUMO mature et la cystéine catalytique de la deuxième sous-unité de l'enzyme d'activation. Puis, SUMO sera transférée de la cystéine catalytique de l'enzyme E1 à la cystéine catalytique de l'enzyme de conjugaison (E2, Ubc9) via une liaison thioester également. Cette enzyme peut interagir directement avec la lysine du motif consensus de SUMO, mais cette interaction est insuffisante pour efficacement transférer SUMO. À cette raison elle nécessite une autre interaction pour maintenir sa stabilité. Par conséquent, SUMO sera transférée soit sur la lysine de l'enzyme d'E3 ligase de SUMO ou elle interagit avec une deuxième enzyme de conjugaison (Ubc9). L'enzyme E3 ligase catalyse SUMO conjuguée au substrat en créant une liaison isopeptidique. Comme il est mentionné précédemment, la SUMOylation est un processus réversible, et les SENP peuvent intervenir à nouveau pour cliver la liaison SUMO-substrat en maintenant un équilibre entre SUMO libre et SUMO conjuguée (Figure 1.8) (51) (52) (53). La protéine 1 d'activation de la GTPase Ran (RanGAP1) est le premier substrat SUMOylé identifié (54).

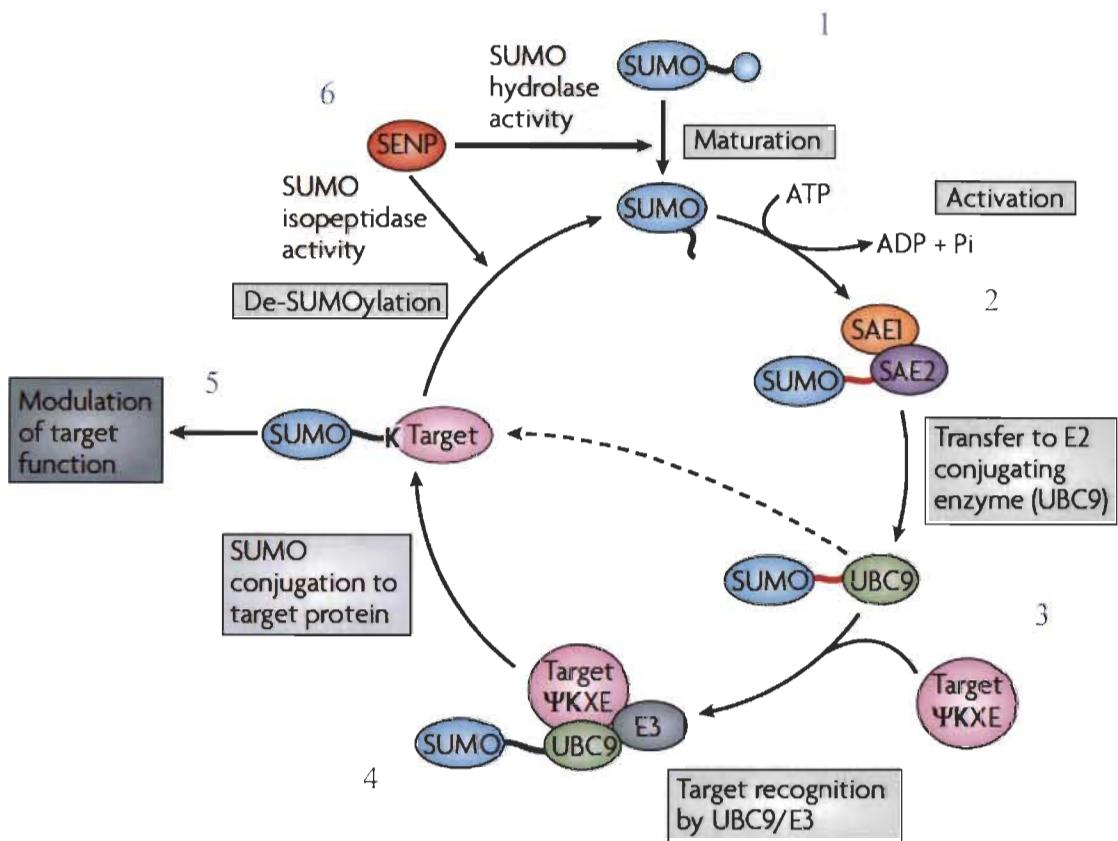


Figure 1.8 La voie de la SUMOylation (52).

1) Étape de maturation de la protéine SUMO. 2) Étape d'activation de SUMO. 3) Étape de conjugaison de SUMO. 4) Reconnaissance SUMO-ubc9 et l'enzyme E3 ligase. 5) Fixation SUMO-substrat via une liaison isopeptidique. 6) Étape de déSUMOylation.

1.2.1.1 Paralogues et structure de SUMO

Dans le génome humain, il existe trois gènes fonctionnels de *SUMO* codant SUMO-1/2/3 dont SUMO-2 et SUMO-3 qui partagent 97 % d'identité entre eux et ne partagent que 50 % d'identité avec SUMO-1 (55). Les trois peptides de SUMO présentent des structures tridimensionnelles qui sont à peu près similaires, caractérisées par une hélice α entourée par des feuillets β en créant une forme globulaire (Figure 1.9) (56,57). La différence est vraiment observée sur le deuxième feuillet β et l'hélice α des SUMO-1 et SUMO-2. La structure de SUMO-2 a été déterminée par cristallisation de la protéine et indique qu'elle présente une forme globulaire de type $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ (58).

Les trois paralogues partagent le motif di-glycine (– GG) qui leur permet d’interagir avec la ou les lysine (s) des sites de SUMOylation des substrats via une liaison covalente. Les protéines SUMO diffèrent dans leurs extrémités N-terminales. En effet, SUMO-2 et SUMO-3 contiennent des sites de SUMOylation dans ces extrémités, qui sont responsables à la forme poly-SUMOylée des protéines modifiées. Par contre, SUMO-1 est dépourvu de ces sites, ce qui explique son implication seulement soit dans la mono-SUMOylation ou aussi pour arrêter les branchements (Figure 1.9) (56,59).

Quant à la voie de la conjugaison, la protéine SUMO2/3 présente des formes libres et des formes non conjuguées plus que celle de SUMO-1 (60).

1.2.1.2 *Localisation de SUMO*

Les différences entre les trois paralogues de SUMO ne s’arrêtent pas seulement dans la structure et la séquence, mais aussi dans leurs distributions cellulaires.

Par exemple, une étude a conclu que SUMO-1 se situe principalement dans le nucléole et l’enveloppe nucléaire alors que SUMO2/3 s’accumule plutôt au niveau des chromosomes (61).

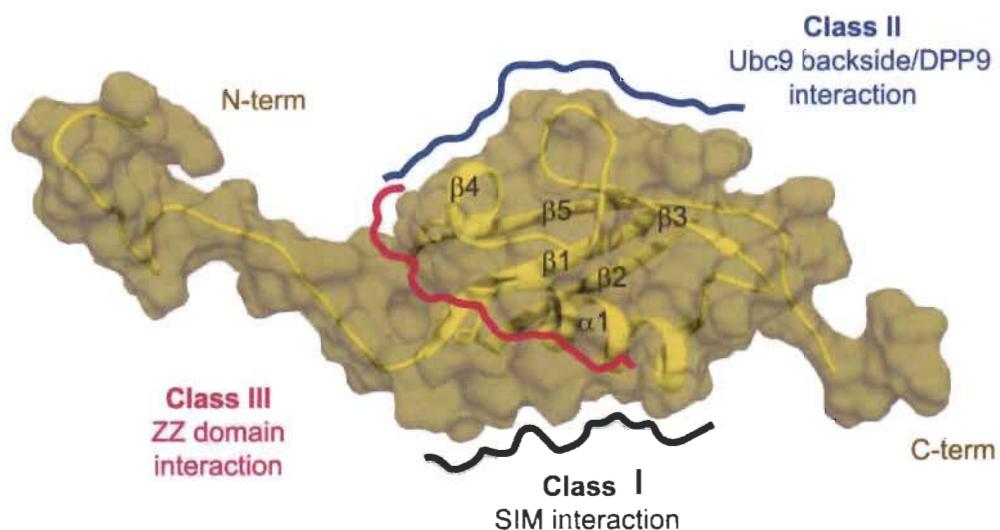


Figure 1.9 Structure de la protéine SUMO (62).

1.2.1.3 Différentes formes de SUMOylation

Les protéines SUMOylées peuvent être observées sous la forme de mono-SUMOylation, suite à la fixation de la protéine SUMO-1 sur la lysine des substrats. Elles peuvent être présentées aussi sous la forme de chaînes de SUMOylation nommées ainsi des branchements ou de poly-SUMOylation. Cette forme est obtenue par la fixation des SUMO-2/3 sur le substrat. En effet, la forme poly-SUMOylée se poursuit jusqu'à la fixation de SUMO-1.

Les protéines modifiées par SUMO peuvent aussi se trouver sous la forme de multi-SUMOylation suite à la fixation de nombreux SUMO sur le même substrat autrement dit sur plusieurs lysines des sites consensus du même substrat (Figure 1.10) (53).

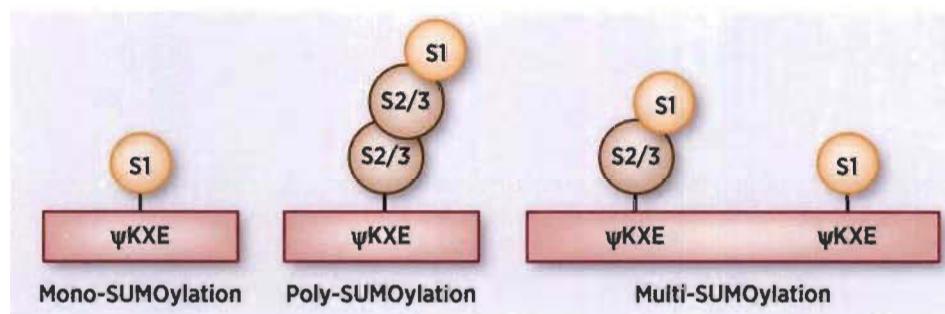


Figure 1.10 Les différentes formes de la SUMOylation (53).

1.2.1.4 Les sites de SUMOylation

La lysine accepteuse de SUMO qui est responsable de la SUMOylation se situe dans des sites de SUMOylation. La séquence la plus connue et la plus répandue est le motif consensus $\Psi KxE/D$, où Ψ est un acide aminé hydrophobe, K est une lysine, x est n'importe quel acide aminé et E ou D est un acide aminé acide (63,64).

L'enzyme de conjugaison Ubc9 peut interagir directement avec ce motif en induisant sa SUMOylation *in vitro* (63). Par contre, les protéines qui contiennent un ou des motifs consensus ne signifient pas forcément qu'elles sont SUMOylées (65), ce qui prouve que la SUMOylation dépend des substrats.

Cependant, les enzymes d'E3 ligase de SUMO facilitent la spécificité et l'efficacité de cette modification post-traductionnelle (66,67).

Les lysines SUMOylées de ce motif consensus se trouvent d'une façon immédiate et spécifique en amont de résidus hydrophobes (68).

Un autre sous-groupe des sites de SUMOylation a été déterminé. Il contient des résidus acides trouvant à deux ou trois résidus en aval des motifs consensus $\Psi KxE/D$ pour former un motif de SUMOylation dépendant des acides aminés chargés négativement (NDSM), $\Psi KxE/Dxx$ (E/D)_n où Ψ est un acide aminé hydrophobe, K est la lysine, x est n'importe quel acide aminé, E (acide glutamique) ou D (acide aspartique) est un acide aminé acide et n est le nombre de répétitions (69,70). Cette charge négative améliore l'affinité pour l'enzyme de conjugaison Ubc9 qui contient un motif consensus chargé positivement (71).

Le motif de SUMOylation dépendant de la phosphorylation (PDSM) est un autre sous-groupe des sites de SUMOylation de type $\Psi KxE/xx-SP$, avec S est une sérine et P est une proline (72). La phosphorylation de la sérine favorise la conjugaison de SUMO (73). Les PDSM sont identifiés dans de nombreux facteurs de transcription notamment les facteurs de choc thermique (HSF), facteur d'amélioration des myocytes 2 (MEF2) et les récepteurs liés aux œstrogènes (ERR) (72,74,75).

L'augmentation de l'affinité pour l'enzyme Ubc9 est liée aux motifs NDSM et PDSM, mais elle peut être maintenue aussi par un autre motif riche en résidus hydrophobes dans leur extrémité N-terminale de type $(\Psi)_nKxE/D$, nommé le motif de SUMOylation des noyaux hydrophobes (HCM).

D'un autre côté, il existe un autre sous-groupe des sites de SUMOylation qui est connu sous le nom d'un site de SUMOylation consensus inversé (ISM), caractérisé par la structure suivante E/DxK Ψ (68).

1.2.1.5 Interaction non covalente avec SUMO via des motifs d'interaction avec SUMO (SIM)

La protéine SUMO reconnaît et interagit avec les protéines sur des motifs spécifiques et bien déterminés, nommés des motifs d'interaction avec SUMO par une liaison non covalente (Figure 1.9) (62). Tout d'abord, les SIM sont impliqués dans l'interaction non covalente avec SUMO libre (76) et aussi avec des protéines SUMOylées (77). Les SIM se caractérisent par une courte séquence d'acides aminés riche en résidus hydrophobes (76), qui sont responsables de l'interaction non covalente. Les résidus hydrophobes sont accolés par des acides aminés acides (E /D), cette propriété favorise l'association et l'interaction SIM-SUMO (78) (60). Dans des études récentes, il a été démontré que la modification d'un acide aminé hydrophobe diminue la capacité des SIM à interagir avec SUMO (78).

Une autre étude a démontré que SIM présente un feuillet β qui peut interagir d'une façon parallèle ou antiparallèle avec le feuillet $\beta 2$ de SUMO (60,79).

1.2.1.6 Différents types des SIM

Comme les sites de SUMOylation, il existe plusieurs types des motifs d'interaction avec SUMO qui se caractérisent par une séquence consensus des résidus hydrophobes.

La séquence la plus répandue présente les motifs suivants : [V/I] — [x] — [V/I] — [V/I] ou [V/I] — [V/I] — [x] — [V/I] avec V est une valine, I est une isoleucine, x est n'importe quel acide aminé et L est une leucine (80). En addition, les SIM sont essentiellement regroupés en sept types (Tableau 1.2).

Tableau 1.2
Les différents types des SIM

	Séquence
Type 1	[Ψ] [Ψ] [x] [Ψ]
Type 2	[Ψ] [x] [Ψ] [Ψ]
Type 3	[Ψ] [Ψ] [Ψ] [Ψ]
Type 4	[x] [Ψ] [Ψ] [Ψ]
Type 5	[Ψ] [a] [Ψ] [a] [Ψ]
Type a	[V/I] [x] [V/I] [V/I]
Type b	[V/I] [V/I] [x] [V/I/L]

D'où Ψ est une valine (V) ou leucine (L) ou isoleucine (I), x est n'importe quel acide aminé, a soit un acide aspartique ou un acide glutamique (81-83).

1.2.2 Moyen de prédition des sites de SUMOylation et/ou des motifs d'interaction avec SUMO

GPS-SUMO est un outil informatique qui prédit les sites de SUMOylation et les interactions non covalentes avec SUMO. La séquence de la protéine avec le format FASTA est analysée avec cet outil. Par la suite, l'analyse informatique obtenue présente une prédition des sites ou des SIM en indiquant leurs positions sur la séquence de la protéine analysée. GPS-SUMO a été développé en utilisant 1059 sites de SUMOylation dans 594 protéines et 151 SIM dans 88 protéines (84).

1.2.3 Les protéines TRIM et la voie de la SUMOylation

1.2.3.1 *TRIM19 ou PML*

TRIM19, appelée aussi PML, est l'un des membres du cinquième groupe des protéines TRIM (7), et joue un rôle en tant que suppresseur de tumeur (85). PML a été découverte au cours des travaux sur la maladie de la leucémie aiguë (86). Elle présente sept isoformes qui partagent entre eux la région N-terminale. En raison de l'épissage

alternatif des exons 4-9, ces isoformes diffèrent au niveau de leurs extrémités C-terminales (Figure 1.11).

Par conséquent, ils possèdent des tailles différentes, une localisation subcellulaire et des fonctions différentes aussi. En effet, six isoformes parmi les sept se localisent dans le noyau, ce sont les PML du I à VI. Le septième isoforme, PML VII, se trouve dans le cytoplasme (85). PML présente le composant structural et l'organisateur de la formation des corps nucléaires de PML, NB-PML (87).

En relation avec la voie de la SUMOylation, TRIM19 est l'un des substrats les plus SUMOylés et les plus étudiés. En effet, cette protéine contient trois lysines accepteuses majeures de SUMO, K65, K164 et K490, situées dans des sites de SUMOylation respectivement dans le domaine RING, le domaine B-Box1 et le domaine de signal de localisation nucléaire.

De plus, les isoformes PML I à PML VI contiennent un motif d'interaction avec SUMO dans leurs extrémités C-terminales grâce à leurs longues séquences. Par contre, l'isoforme PML VII est dépourvu de ce motif à cause de sa courte séquence (Figure 1.11) (88,89).

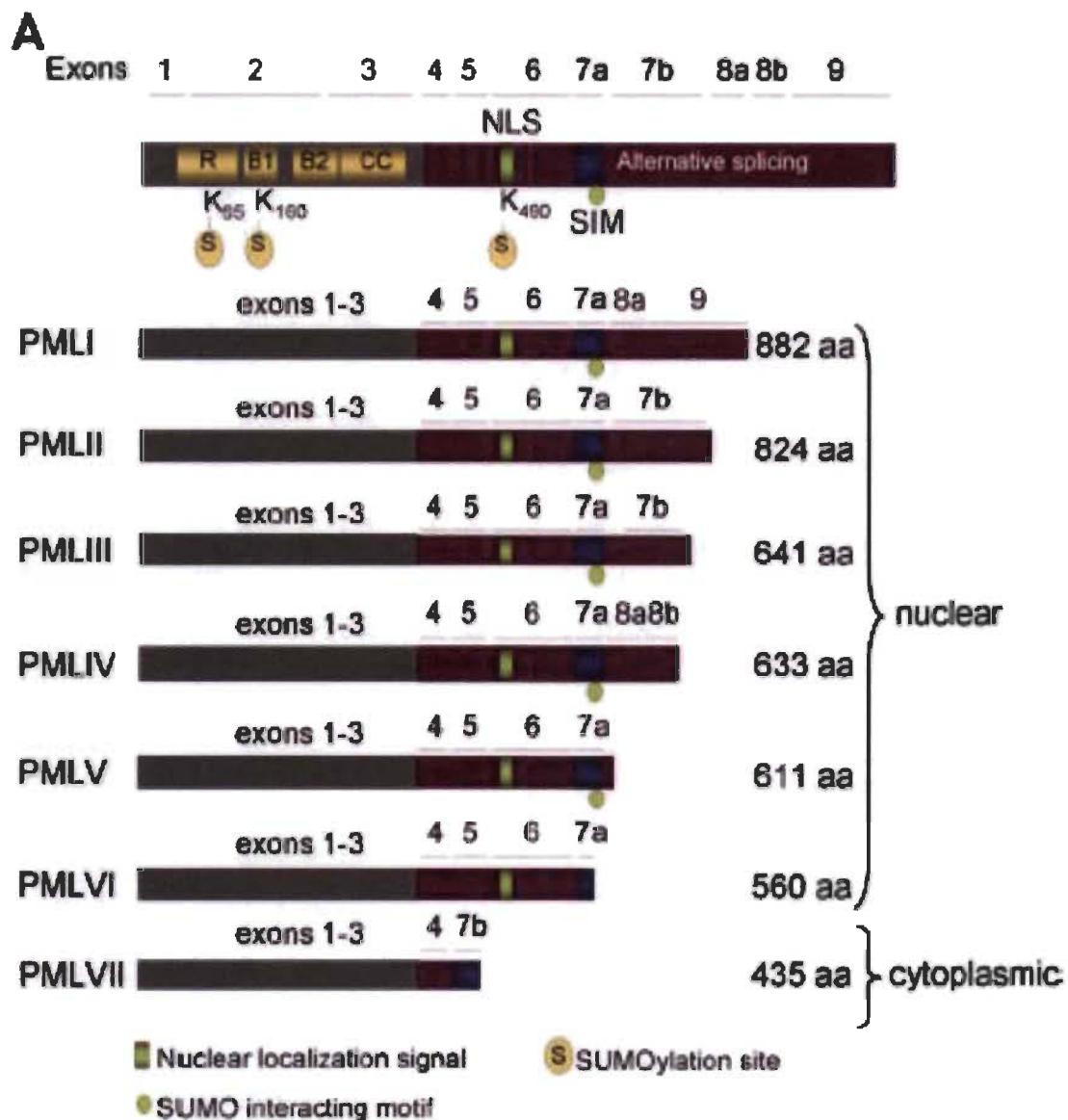


Figure 1.11 Les différentes isoformes de PML (88).

Toutes les isoformes (PML I – PML VII) sont modifiées par SUMO-1 sur les trois lysines, qui sont mentionnées précédemment. Cette modification post-traductionnelle peut réguler spécifiquement les interactions protéine-protéine, notamment l’interaction de PML IV avec la protéine des tumeurs, p53 (90). Cette protéine joue le rôle d’un suppresseur des tumeurs et elle est SUMOylée par SUMO-1 également. Yaya Chu et Xiaolu Yang ont démontré que l’expression de p53, SUMO-1 et PML isoforme IV dans les cellules MEF provoque une interaction directe entre p53 et l’isoforme PML IV (91).

Lorsque l'isoforme PML IV est SUMOylée par SUMO-1, ce qui induit la relocalisation de p53 aux corps nucléaires de PML en favorisant spécifiquement la transactivation de p53 au promoteur. Ce qui suggère aussi que PML joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle (90).

Le trioxyde d'arsenic est l'un des agents thérapeutiques les plus efficaces de la maladie de la leucémie aiguë. Il interagit directement sur les cystéines du motif RBCC de la protéine de fusion PML-RAR α en favorisant sa SUMOylation et sa dégradation (92).

En présence de cet agent thérapeutique, les trois paralogues de SUMO1/2/3 co-localisent dans les corps nucléaires de PML (93). La SUMOylation de PML et son interaction non covalente avec SUMO via son SIM induit la formation de ces corps nucléaires NB-PML. Ces derniers sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires telles que l'apoptose, la sénescence, la dégradation des protéines et la réponse antivirale (85). La dégradation de PML est liée à la protéine RING Finger 4 (RNF4). Cette nouvelle protéine joue le rôle de E3 ligase de l'ubiquitine. Elle contient aussi quatre SIM, qui lui permet d'interagir spécifiquement et fortement avec les branchements de PML poly-SUMOylée. À la suite de cette interaction non covalente, la protéine RNF4 déclenche l'ubiquitination de PML et donc sa dégradation (Figure 1.12) (85,93).

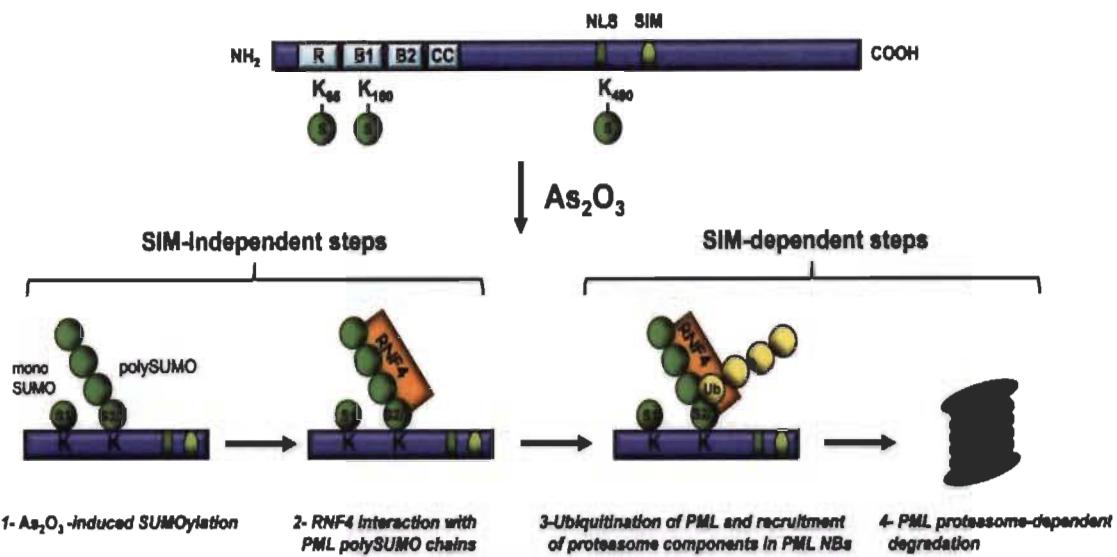


Figure 1.12 Dégradation de PML (93).

Les lysines K₆₅, K₁₆₀, K₄₉₀ sont des lysines acceptrices de la protéine SUMO. AS₂O₃ est agent thérapeutique contre la maladie de leucémie aigüe. 1) AS₂O₃ induit la SUMOylation de PML. 2) RNF4 interagit avec PML poly-SUMOylée via leurs SIM. 3) L’interaction RNF4-PML poly-SUMOylée induit l’ubiquitination de PML. 4) Dégradation de PML via la voie protéasomique.

1.2.3.2 TRIM 24

La protéine TRIM24 est l’une des membres du sixième groupe des protéines TRIM qui se caractérise par le domaine PHD-bromodomaine (7). TRIM24 est connue sous le nom de facteur intermédiaire transcriptionnel 1 alpha (TIF1 α) et a un rôle de corégulateur transcriptionnel de nombreuses protéines nucléaires, notamment le récepteur d'estrogène (ER α). La protéine TRIM24 peut réguler négativement la prolifération et la croissance cellulaire grâce à son association à la bromodomaine 7. Cette protéine s’associe avec les chromatines via son domaine PHD-bromodomaine. Cette association est contribuée à travers les interactions entre le bromodomaine-ADN et le bromodomaine-Nucléosome. D’autre part, TRIM24 est surexprimée dans certains cancers notamment le cancer de la prostate et le cancer du sein (94,95). Srikanth Appikonda et ses collègues ont démontré que TRIM24 est SUMOylée sur la lysine 723 et la lysine 741 par SUMO-1 et SUMO-2/3. Ils ont démontré ainsi que l’association de TRIM24 avec les chromatines est préalable à cette modification post-traductionnelle. Le domaine PHD-bromodomaine de la protéine

TRIM24 reconnaît la lysine 4 non méthylée et la lysine 23 acétylée de l'histone 3. L'association de TRIM24 avec les chromatines via ce domaine conduit à sa SUMOylation. Le « Cross-talk » entre l'acétylation de l'histone 3 et la SUMOylation de TRIM24 maintient donc la fonction oncogénique de TRIM24 (95).

1.2.3.3 *TRIM5 α*

La protéine TRIM5 est l'un des membres du quatrième groupe de protéines TRIM qui se caractérise par le domaine SPRY (7). La protéine TRIM5 α du singe Rhésus a été la première protéine identifiée comme un facteur de restriction de VIH-1 (96). Elle reconnaît spécifiquement la capsid de ce virus (65). Cette protéine se localise essentiellement dans le cytoplasme en formant des corps cytoplasmiques (32), mais est également trouvée dans le noyau. En présence de LMB, TRIM5 α co-localise avec les corps nucléaires de PML en formant aussi des corps nucléaires (97).

TRIM5 α contient aussi un site consensus de SUMOylation qui joue un rôle important dans l'immunité innée induite par elle. Cette induction contrôle l'activation des deux facteurs de transcription, NF- κ B et AP-1 (65). Il a aussi été démontré que TRIM5 α contient quatre motifs d'interaction avec SUMO et la mutation de SIM4 empêche sa reconnaissance à la capsid de VIH-1 ce qui provoque son incapacité de restreindre ce virus. Cette mutation aussi empêche l'activation des deux facteurs de transcription; NF- κ B et AP-1 et elle réduit ainsi la co-localisation nucléaire de TRIM5 α (97).

1.2.4 Les enzymes E3 ligase de SUMO

La réaction de la SUMOylation ne nécessite pas forcément l'intervention des enzymes E3 ligase de SUMO, puisque sa spécificité se détermine par les substrats. En revanche, la présence de ces enzymes favorise son efficacité.

À cette raison, dans la voie de la SUMOylation, quelques familles des E3 ligase de SUMO ont été identifiées et décrites.

En effet, les « Proteins Inhibitors of Activated STAT » sont la famille la plus connue.

1.2.4.1 Protein Inhibitor of Activated STAT

Les « protein inhibitor of activated STAT » sont présentes chez tous les eucaryotes. Dans les mammifères, elles sont exprimées sous sept isoformes :

- PIAS1
- PIAS2 ou nommée aussi PIASx avec les isoformes PIASx α et PIASx β
- PIAS3 et PIAS3 β
- PIAS4 ou nommée aussi PIAS γ et PIAS γ 6 -

Les PIAS conservent leurs extrémités N-terminales qui se caractérisent par un domaine SAP, un domaine PINIT et un domaine RING. Elles diffèrent au niveau de leurs extrémités C-terminales.

En effet, le domaine SAP se lie aux séquences d'ADN riches en adénosines et thymidines, et aux co-régulateurs transcriptionnels.

Le domaine PINIT détermine la localisation nucléaire des PIAS, et le domaine RING maintient son activité E3 ligase. La partie C-terminale se caractérise par une région acide nommée AD et d'une région riche en sérine et thréonine S/T. Les PIAS contiennent un motif d'interaction avec SUMO dans leurs régions acides AD (Figure 1.13) (53,98)

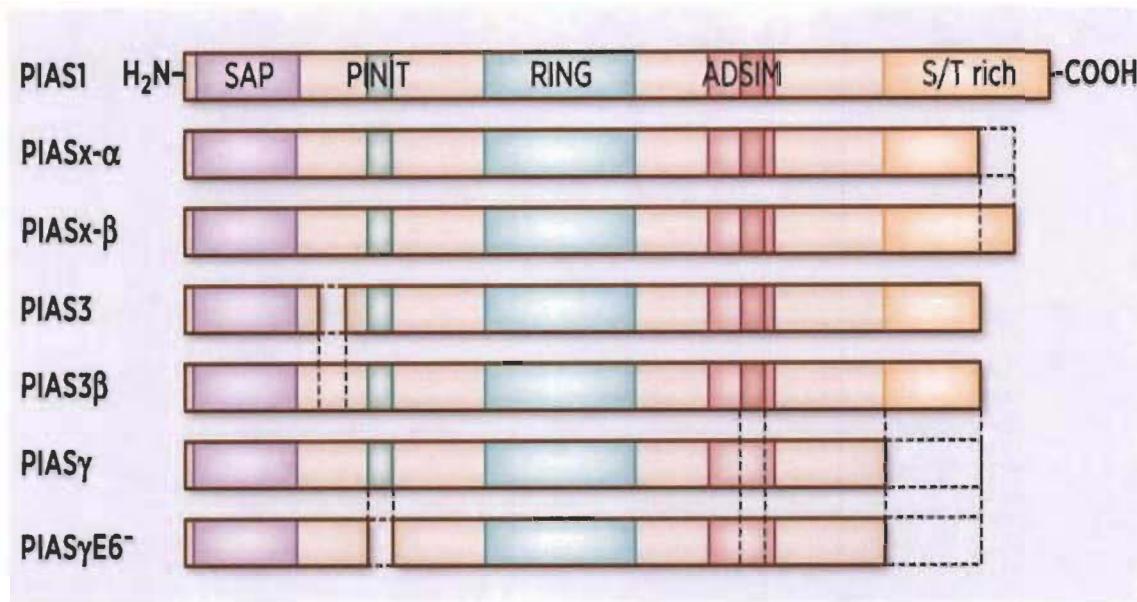


Figure 1.13 Structure des PIAS (53).

Les PIAS sont identifiées comme des co-régulateurs transcriptionnels, ainsi elles jouent un rôle dans la régulation de la stabilité des protéines. De plus, les PIAS sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose et le développement des cancers (99). En particulier, les PIAS interagissent avec des protéines nucléaires notamment le suppresseur des tumeurs p53.

En relation avec la SUMOylation, les PIAS peuvent interagir efficacement avec SUMO-1 et avec l'enzyme de conjugaison Ubc9. Dans une étude, Noora Kotaja et ses collègues ont démontré la capacité de PIAS1,2 et 3 à être auto-SUMOylées par SUMO-1 et aussi d'interagir avec d'autres protéines SUMOylées grâce à leurs SIM. Ils ont démontré aussi que PIASx α favorise la SUMOylation de la protéine AR et de la protéine c-Jun in vitro. Ce qui prouve que PIASx α fonctionne comme une enzyme de ligase avec SUMO (100).

PIASy aussi joue un rôle important dans la SUMOylation des deux protéines mitotiques; la TopoII α et la protéine PARP1 par SUMO-2/3. Kawaljit Kaur et ses collègues ont démontré par la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire,

que PIAS γ contient un nouveau SIM dans l'extrémité C-terminale. Par une analyse *in vitro*, ils ont démontré que les deux substrats TopoII α et RARP1 sont SUMOylés par SUMO-2/3 en présence de PIAS γ WT. Cette étude prouve que les SIM sont essentiels pour l'activité E3 ligase de SUMO (101).

1.2.4.2 PML et TRM27

Comme il est mentionné au début de ma mémoire, toutes les protéines TRIM jouent le rôle d'E3 ligase de l'ubiquitine grâce à leurs domaines RING; mais certains membres des TRIM peuvent aussi jouer le rôle d'E3 ligase de SUMO.

TRIM19 est un substrat hyper-SUMOylé ce qui conduit à la formation de chaînes de SUMOylation. Basé sur cette observation, Yaya Chu et Xiaolu Yang ont suggéré que TRIM19 était une E3 ligase de SUMO. À cette raison, ils ont testé la capacité de la protéine suppresseur de tumeur p53, la protéine ligase de l'ubiquitine Mdm2, le facteur de transcription c-Jun et le facteur de transcription I κ B α à être SUMOylés *in vitro*. Avec cette analyse, ils ont démontré que PML fonctionne comme une enzyme E3 ligase de SUMO pour p53, Mdm2 et c-Jun en présence de SUMO-1 et SUMO-2, ce qui signifie que PML favorise la SUMOylation des protéines nucléaires. De plus, ils ont démontré que TRIM27 favorise aussi la SUMOylation *in vitro* de Mdm2 par SUMO-1. En conclusion, cette étude démontre que l'activité E3 ligase de SUMO de TRIM19 et TRIM27 est faible par rapport à celle induite par PIAS γ (91).

1.2.5 Les inhibiteurs de la dé-SUMOylation

Le N-éthylmaléimide (NEM) est l'un des inhibiteurs de la dé-SUMOylation (102). Il réagit spécifiquement avec les groupements sulfhydryles des protéines. Le NEM agit fonctionnellement avec les autres groupes sulfhydryles notamment le groupement α -amino-acide des peptides et le groupe ϵ -aminé des lysines (103).

Toshiaki Suzuki et ses collègues ont démontré que N-éthylmaléimide bloque l'activité hydrolase de la protéine SUMO-1 (104). En effet, le N éthylmaléimide inhibe complètement l'activité hydrolase des SENP et il agit comme des inhibiteurs de l'activité isopeptidase (102).

1.2.6 Ubiquitination

L'ubiquitination est une autre modification post-traductionnelle qui consiste en une fixation d'une petite protéine appelée ubiquitine sur la lysine des substrats via une liaison isopeptidique. L'ubiquitination est un processus dynamique et réversible. Elle nécessite l'intervention de trois enzymes; une enzyme d'activation UBE1, une enzyme de conjugaison et une enzyme de ligation E3 ligase de l'ubiquitine. Contrairement à la SUMOylation, l'ubiquitination implique une enzyme d'activation monomère, une dizaine d'enzymes E2 et des centaines d'enzymes de ligase (105).

En effet, l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine s'associe à la cystéine de l'enzyme E1 via une liaison thioester. Puis, l'ubiquitine sera transférée sur l'enzyme de conjugaison E2 via une liaison thioester aussi. Par la suite, l'enzyme E3 ligase de l'ubiquitine intervient pour créer une liaison isopeptidique entre la glycine de l'ubiquitine et la lysine du substrat (Figure 1.14).

Contrairement à la SUMOylation, l'enzyme E3 ligase de l'ubiquitine détermine la spécificité de cette modification post-traductionnelle. En effet, avec les enzymes E3 ligase de l'ubiquitine qui possèdent un domaine RING ou un domaine U Box, l'ubiquitination nécessite un complexe intermédiaire E3-E2~Ub pour transférer l'ubiquitine aux substrats.

Par contre, pour les E3 ligase de l'ubiquitine de type RBR et HECT, l'ubiquitine conjuguée (E2~Ub) sera dans ce cas transférée au cystéinyle sulfhydryle avant de la transférer aux substrats (106,107). L'ubiquitine peut être elle-même modifiée par une autre ubiquitine, lorsque les lysines accepteuses des ubiquitines se fixent sur l'extrémité C-terminale d'une autre ubiquitine via une liaison isopeptidique. En effet, l'ubiquitine

contient dans sa séquence sept lysines accepteuses pour l'ubiquitination, qui sont K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K68.

Comme la SUMOylation, l'ubiquitination peut se présenter sous forme d'une mono-ubiquitination suite à la fixation d'une seule ubiquitine sur le substrat, une multi-ubiquitination suite à la fixation de nombreuses ubiquitines sur le même substrat ou aussi des chaînes d'ubiquitination ou nommées aussi des poly-ubiquitination. Bien que la voie de la SUMOylation est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, la fonction majeure de l'ubiquitination est la dégradation protéasomique. Cette fonction est liée à la lysine 48 et à la lysine 11 tout en induisant des chaînes d'ubiquitination.

L'ubiquitination est impliquée aussi dans la signalisation cellulaire par les poly-ubiquitination liée à la lysine 63 (Figure 1.14) (108,109).

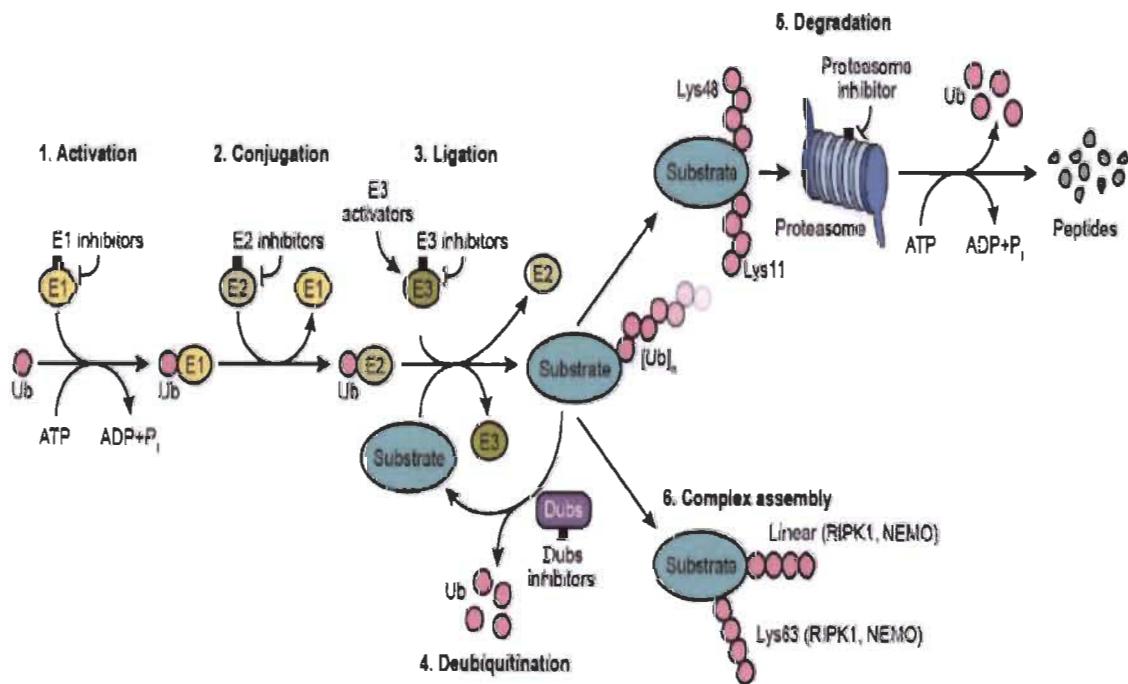


Figure 1.14 La voie de l'ubiquitination (109).

1.2.6.1 Les enzymes E3 ligase de l'ubiquitine

Dans l'ubiquitination, il existe environ 700 enzymes qui jouent le rôle de E3 ligase de l'ubiquitine. Ces enzymes sont classées en trois familles; HECT, RING et RBR (109).

- **E3 ligase de l'ubiquitine de type HECT :** HECT est une large famille de protéines monomérique qui contiennent un site de liaison avec l'ubiquitine activée et un site de liaison avec l'ubiquitine conjuguée. De plus, elle contient un domaine d'interaction protéine-protéine. Les E3 ligase HECT forment une liaison covalente avec l'ubiquitine avant de la transférer sur les lysines des substrats (107).
- **E3 ligase de l'ubiquitine de type RING :** Les domaines RING des enzymes E3 ligase de l'ubiquitine contiennent des acides aminés hydrophobes, des cystéines et des histidines. Ces enzymes peuvent être sous forme monomérique ou aussi sous forme de multi-unités. Les E3 ligase de l'ubiquitine de type RING interviennent pour rapprocher les ubiquitines conjuguées aux substrats (110).
- **E3 ligase de l'ubiquitine de type RBR :** Les enzymes E3 ligase de l'ubiquitine de type RBR présentent une combinaison entre les E3 ligase de type RING et HECT. Elles interagissent avec l'ubiquitine conjuguée puis elles transfèrent l'ubiquitine au résidu cystéinyle du domaine RBR (106).

1.2.6.2 Exemples des E3 ligase de l'ubiquitine

Les protéines TRIM contiennent le domaine RING qui confère l'activité E3 ligase de l'ubiquitine. Certaines TRIM peuvent être auto-ubiquitinées, c'est-à-dire qu'elles utilisent leurs propres domaines RING pour l'ubiquitination notamment TRIM5 α .

En effet, TRIM5 α nécessite son domaine RING pour créer des chaînes d'ubiquitination liée à la lysine 63. Ces branchements sont importants pour l'activation de ces deux facteurs de transcription NF- κ b et AP-1 (97,111,112).

TRIM32 joue aussi le rôle de E3 ligase de l'ubiquitine et la mutation de la région C-terminale de cette protéine provoque des maladies musculaires. En effet, cette mutation affecte la capacité de protéines musculaires à être dégradées par la voie protéasomique qui est liée à la lysine 48 (113).

La topoisomérase I contient aussi le domaine RING (110), cette protéine joue à la fois le rôle d'une enzyme de E3 ligase de l'ubiquitine et E3 ligase de la SUMOylation pour la protéine p53 (111).

CHAPITRE II

PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS

Comme il est mentionné précédemment, la voie de la SUMOylation peut influencer la stabilité ainsi que les fonctions des substrats tels que les protéines TRIM. En effet, dans notre laboratoire, Nepveu-Traversy, Marie-Édith a démontré que la mutation du motif 4 d'interaction avec SUMO (SIM4) de TRIM5 rhésus empêche sa reconnaissance et son interaction avec la capsid de VIH-1, ce qui induit son échec à le restreindre (90). De plus, elle a démontré que la mutation de la lysine 10 du site de la SUMOylation potentiel de TRIM5 rhésus modifie la spécificité de l'activité E3 ligase de l'ubiquitine du domaine RING tout en favorisant l'ubiquitination lié à la lysine 10 plutôt qu'à la lysine 63 (53).

Cependant, l'effet de la voie de la SUMOylation sur la fonction des protéines TRIM n'avait été étudié que sur un petit nombre de protéines de cette famille. Par conséquent, notre laboratoire a amorcé un effort pour élucider ces interactions fonctionnelles pour toutes les protéines TRIM.

Dans ce contexte, mon projet de maîtrise vise à déchiffrer les relations fonctionnelles entre la voie de la SUMOylation et les MURF, un des groupes de TRIM les moins étudiés. Nous sommes parvenus alors à l'hypothèse suivante : les sites de SUMOylation et/ou les motifs d'interaction avec SUMO jouent un rôle dans les fonctions des MURF.

Pour ce faire, nous devons réaliser les objectifs spécifiques suivants :

- 1) Étudier la capacité des MURF à être SUMOylées et/ou à interagir avec SUMO.
- 2) Identifier les sites de SUMOylation et/ou les motifs d'interaction avec SUMO (SIM).

- 3) Étudier le rôle de la voie de la SUMOylation dans les fonctions des MURF en examinant les rôles des SIM potentiels dans la stabilité, la localisation subcellulaire et dans l'activité E3 ligase de l'ubiquitine.

Grâce à ce travail de recherche, nous serons capables de bien caractériser les MURF, d'éclaircir leurs relations vis-à-vis la voie de la SUMOylation et d'enrichir les connaissances scientifiques.

CHAPITRE III

MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Culture cellulaire

Les cellules humaines embryonnaires de rein 293T et les cellules humaines cancéreuses HeLa sont exprimées et cultivées dans du milieu DMEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 100 unités/mL pénicilline et 100 µg/mL streptomycine, à 37 °C, dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Ces deux lignées cellulaires sont des cellules adhérentes qui peuvent pousser facilement dans le milieu DMEM ou aussi dans le milieu RPMI.

3.2 Plasmides utilisés

Les plasmides utilisés dans mon projet de maîtrise sont : SRa-HA-SUMO-1 (NO. Ref 17359), pcDNA3-HA-SUMO-3 (NO. Ref 17361) et pcDNA3.1+ (NO. Ref V790-20). Ces plasmides sont achetés chez ADDGENE.

Les plasmides pcDNA3.1+ contenant les inserts TRIM54-FLAG ou TRIM55-FLAG ou TRIM63-FLAG ou TRIM19/PML-FLAG sont utilisés pour réaliser les objectifs de travail. Les ADN codant pour des TRIM55 (OHu29713D), TRIM54 (OHu55662), TRIM63 (OHu26876) et TRIM19 (OHu25484) ont été obtenus chez Genscript.

Les plasmides pcDNA3.1+TRIM19, pcDNA3.1+TRIM54, pcDNA3.1+TRIM55 et pcDNA3.1+TRIM63 sont marqués par le tag FLAG qui est inséré aux extrémités C-terminales.

3.3 Transfection et lyse cellulaire

Les cellules 293T sont mises en culture dans des boîtes de pétri de 10 cm, puis elles sont transfectées à une confluence de 50-60 % en monocouche en utilisant l'agent chimique Polyéthylénimine (PEI) (Polyscience) avec une concentration finale égale à 4,5 ng/ μ l (114).

Pour chaque plasmide transfecté, 10 μ g ont été dilués dans 1 mL de DMEM sans sérum dans un eppendorf de 1,5 mL puis 45 μ l de PEI sont ajoutés suivis d'un vortex. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, la solution est ajoutée délicatement aux cellules 293T. Par la suite, le milieu des cellules est remplacé après 6 heures de la transfection afin d'éviter la toxicité des cellules.

Après 48 heures de la transfection, les boîtes de pétri sont mises en place sur la glace et le surnageant des cellules est aspiré. Les cellules ensuite sont décollées en faisant des up-and-down avec environ 1 mL de PBS froid et elles sont transférées dans un nouveau tube froid. Puis, une centrifugation à 2000 rpm pendant 3 minutes à 4 °C est réalisée et le surnageant est ensuite aspiré. Les cellules sont lysées par 1 mL de tampon de lyse RIPA buffer supplémenté par un inhibiteur de protéase 1X (Thermo Scientific) et d'un inhibiteur de la déSUMOylation (NEM) (Thermo Scientific) avec une concentration finale égale à 10 mM. Puis, l'ADN est détruit jusqu'à la perte de viscosité par sonication. Finalement, 25 μ L de la solution de dépôt (PSB) 5X sont ajoutés pour 100 μ L des lysats totaux suivis d'un chauffage à 95 °C pendant 7 minutes.

3.4 Immunoprécipitation

Afin de purifier les TRIM, une préparation des billes magnétiques anti-FLAG (Sigma) est réalisée. En première étape, les billes magnétiques anti-FLAG ont été équilibrées par 3 lavages avec 5 « packed gel volumes » de Buffer TBS froid. Puis, les tubes sont mis en place sur un support magnétique pour aspirer le surnageant. Les billes magnétiques anti-FLAG sont ensuite resuspendues dans du TBS froid (quantité

devra être calculée). Par la suite, 20 µL de billes (10 packed gel volume) sont ajoutés à chaque 900 µL des lysats, suivis d'une incubation toute la nuit à 4 °C sur un rotateur. Le lendemain, le tube a été mis en place sur un support magnétique pendant 10 secondes afin de retirer le surnageant. Les billes sont nettoyées ensuite 3 fois par 500 µL de TBS froid en retirant le surnageant. Les protéines FLAG-TRIM sont élues avec 50 µL de la solution de dépôt (PSB) 1X suivi d'une étape de chauffage à 95 °C pendant 7 minutes et elles sont remis sur la glace. Sur un support magnétique, le surnageant est transféré dans un nouveau tube qui est prêt pour une analyse d'immunoblotting.

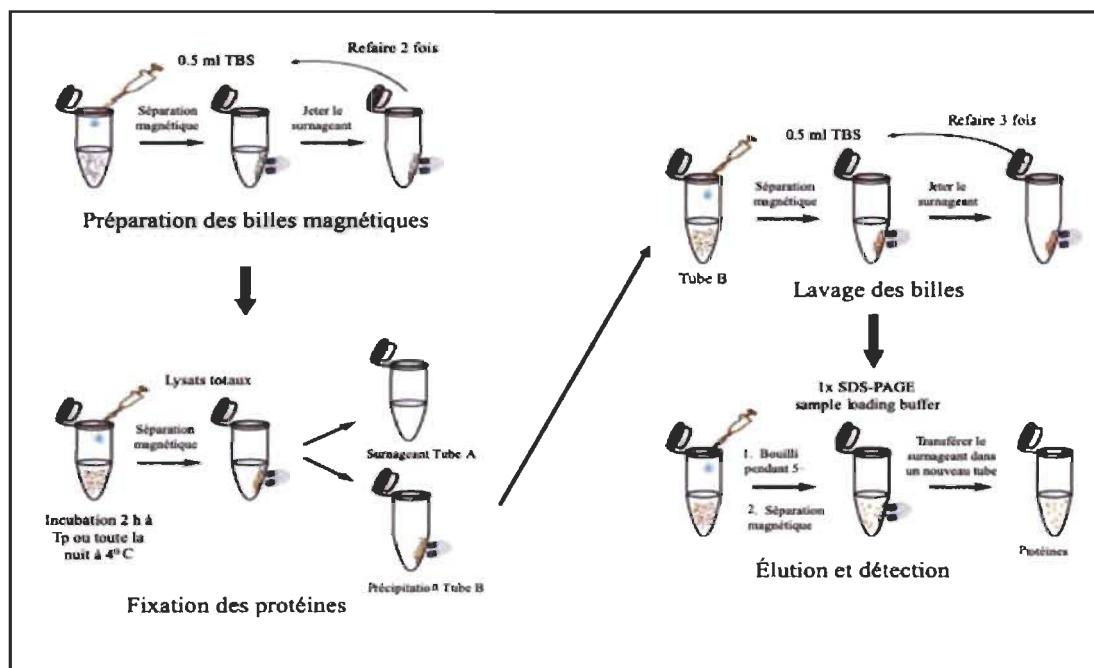


Figure 3.1 Schéma explicatif de l'immunoprécipitation.
 (Anti-FLAG magnetic beads. 2020.
<https://www.bimake.com/product/anti-flag-magnetic-beads.html>).

3.5 Western Blot

Les protéines contenues dans les lysats totaux et dans les lysats d'immunoprécipitations sont séparées en fonction de leurs poids moléculaires sur un gel polyacrylamide dénaturant SDS-PAGE en utilisant un courant électrique de 100 volts. Puis les protéines migrées sont transférées sur des membranes de nitrocellulose par un transfert mouillé pendant 3 heures à 300 mA (une seule cuve). Ces dernières sont saturées

par une étape de blocage pendant 1 heure par une solution riche et concentrée en protéines (5 % lait ou 5 % BSA) à température ambiante afin de favoriser la spécificité des Ac.

Par la suite, chaque membrane est incubée toute la nuit à 4 °C avec l'un des anticorps primaires suivants; un anticorps de souris anti-FLAG (Sigma Aldrich 1:1000) ou un anticorps de lapin anti-HA (Cell Signaling 1:1000) ou un anticorps de souris anti-myc (Santa Cruz 1:500). Après 16 heures, les membranes ont été lavées 3 fois par TBST pendant 10 minutes suivi d'une incubation pendant 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires suivants; un anticorps de chèvre anti-souris IgG-HRP (Cell Signaling 1:2000) ou un anticorps de chèvre anti-lapin IgG-HRP (Bio Rad 1:2000). Par la suite, les membranes sont révélées avec une solution de révélation (Clarity Bio Rad). Les images ont été enregistrées sur un système d'imagerie ECP UVP (Upland, Californie).

3.6 Test de stabilité

Les cellules 293T sont mises en culture dans des plaques de 6 trous, puis elles sont co-transférées avec 2 µg des plasmides pcDNA3-FLAG-TRIM55 et Sra-HA-SUMO-1 ou pcDNA3-HA-SUMO-3. Après 44 heures de la transfection, les cellules sont traitées par les inhibiteurs protéasomique et lysosomial qui sont respectivement MG132 et bafilomycine pendant 4 heures.

Les deux agents chimiques MG132 (Sigma Aldrich) et la baflomycine (Sigma Aldrich) sont dilués respectivement dans du DMSO et l'éthanol et sont utilisés à des concentrations finales égales à 10 µM et 1 µM.

3.7 Mutation des motifs d'interaction avec SUMO (SIM)

Dans le but de déterminer l'effet des SIM dans la stabilité, la localisation subcellulaire et dans l'ubiquitination de TRIM55, leurs noyaux hydrophobes ont été mutés en alanine par PCR, en utilisant les amorces suivantes :

TRIM55-EcoRV-Forward

5' GAGAGATATCATGAGCGCATCTCTGAAT 3'

TRIM55-SIM1mut-Forward

5' CCTGC GGCGGCTCTCCCTTGT CAGCACAAC 3'

TRIM55-SIM1 mut-Reverse

5' AGGGAGAGGCCGCCGCAGGTTCGTGAACATCTC 3'

TRIM55-SIM2mut-Forward

5' AATGCCGCTGACGCCTACAAGCAGGAGTCCAC 3'

TRIM55-SIM2mut-Reverse

5' GTAGGCGTCAGCGGCATTTCCACCAGCAGGTT 3'

TRIM55-XhoI-Reverse

5' GAGACTCGAGTCACTTATCGTCGTCACTC 3'

Tableau 3.1

Conditions des PCR 1

	Température (°C)	Temps (secondes)
Dénaturation initiale	98	120
Dénaturation	98	30
Hybridation	55	30
Élongation	72	120
Élongation finale	72	300
Fin	4	
Nombre de cycles		20

PCR 1 est réalisée pour créer les mutations de SIM1 ou SIM2 en utilisant l'enzyme « Velocity ».

Tableau 3.2
Conditions des PCR 2

	Température (°C)	Temps (secondes)
Dénaturation initiale	98	120
Dénaturation	98	30
Hybridation	50	30
Élongation	72	120
Élongation finale	72	300
Fin	4	
Nombre de cycles		25

PCR 2 est réalisée pour obtenir tout le fragment de TRIM55 avec SIM1 ou SIM2 en utilisant l'enzyme « Velocity ».

Par la suite, les deux fragments entiers obtenus, TRIM55 SIM1mut et TRIM55 SIM2mut, ainsi que le vecteur pcDNA3.1+ ont été digérés par les deux enzymes de restriction EcoRV et Xhol. Les deux inserts sont ensuite ligués avec ce vecteur.

Tableau 3.3
Réaction de ligation avec le T4 ligase (NEB)

	Température (°C)	Temps (minutes)
Étape 1	16	960
Étape 2	56	10

Ligation de TRIM55 SIM1mut ou TRIM55 SIM2mut avec pcDNA3.1+.

Après 16 heures de ligation, les produits de la réaction obtenus sont transformés dans les bactéries *E.Coli* DH5α. Puis les colonies sélectionnées sont purifiées et digérées aussi avec EcoRV et Xhol afin de vérifier la ligation.

Les mutations sont ensuite vérifiées par un séquençage chez le centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.

3.8 Microscopie à immunofluorescence

Les cellules HeLa ont été étalées sur des lamelles en verre de microscope (Fisherbrand) dans des plaques à 6 trous. Puis, elles sont co-transférées avec les plasmides pcDNA3-FLAG-TRIM55 WT ou mutées avec SUMO. Par la suite, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec 1 mL de la solution de fixation et de perméabilisation pendant 10 minutes. Ensuite, les cellules ont été lavées quatre fois avec 1 mL de PBS. Les cellules sont traitées par 1 mL de PBS avec 10 % de FBS pendant une heure à température ambiante. Cette étape de blocage a été suivie d'une incubation toute la nuit à 4°C avec 20 µL d'anticorps polyclonal anti-FLAG de souris (Sigma Aldrich, 1:200) ou avec 20 µL d'anticorps polyclonal anti-HA de lapin (Cell Signaling, 1:800) ou avec 20 µL d'anticorps polyclonal anti-alpha-tubuline de lapin.

La coloration fluorescente a été effectuée par une incubation pendant une heure à l'obscurité avec 20 µL d'anticorps de chèvre conjugué anti-lapin (Invitrogen Alexa fluor 594, Thermo Fisher) et 20 µL d'anticorps de chèvre conjugué anti-souris (Invitrogen Alexa 488, Thermo Fisher). Chaque anticorps fluorescent est utilisé à la dilution 1:200.

Les cellules fixées ont été lavées deux fois avec du PBS puis le Hoechst33342 (0.8 µg/mL; sondes moléculaires) est ajouté avec du PBS pour révéler le noyau. Après, les lames étaient montées en ajoutant le Vectashield (Vector Laboratories, Burlington, Ontario). Par la suite, les images ont été générées à l'aide d'un microscope (Zeiss Axio observer) équipé d'un module Apotome et du logiciel Axio vision.

3.9 PyMOL

PyMOL est un logiciel qui permet de visualiser les structures des protéines de format PDB (115).

Afin de créer un modèle de la structure de TRIM55, il est nécessaire d'avoir une structure avec le format PDB comme il est mentionné précédemment. Pour ce faire,

la séquence de TRIM55 est examinée par « Swiss Model ». Par la suite et selon les cristallisations qui sont déjà connues, « Swiss Model » proposera plusieurs modèles. Dans le but d'avoir une structure acceptable et avantageuse, il est nécessaire de choisir le modèle qui présente un pourcentage d'identité maximal avec la structure à modéliser et aussi un facteur d'estimation de qualité maximal, nommé « Global Model Quality Estimation ».

Tableau 3.4
Analyse par PyMOL

Template Results ↗

Templates	Quaternary Structure	Sequence Similarity	Alignment of Selected Templates					More ▾	
↓ Sort	↓ Name	↓ Title	↓ Coverage	↓ GMQE	↓ QSQE	↓ Identity	↓ Method	↓ Oligo State	↓ Ligands
<input type="checkbox"/>	5vzv.1.A	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM23		0.39	0.12	26.51	X-ray, 1.8Å	homo-dimer	4 x ZN  
<input type="checkbox"/>	2y43.1.B	E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE RAD18		0.42	0.08	21.43	X-ray, 1.8Å	homo-dimer	4 x ZN  
<input type="checkbox"/>	2y43.1.A	E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE RAD18		0.42	0.08	21.43	X-ray, 1.8Å	homo-dimer	4 x ZN  
<input checked="" type="checkbox"/>	6fga.1.B	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21		0.45	0.02	30.12	X-ray, 2.8Å	hetero-tetramer 	4 x ZN  
<input type="checkbox"/>	6fga.2.A	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21		0.44	0.01	30.12	X-ray, 2.8Å	hetero-tetramer 	4 x ZN  
<input type="checkbox"/>	2ecv.1.A	Tripartite motif-containing protein 5		0.44	-	33.33	NMR	monomer  	2 x ZN  
<input type="checkbox"/>	6fga.1.A	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21		0.44	0.01	30.12	X-ray, 2.8Å	hetero-tetramer 	4 x ZN  
<input type="checkbox"/>	5fer.1.D	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25		0.44	0.26	32.05	X-ray, 2.3Å	hetero-hexamer 	4 x ZN  
<input type="checkbox"/>	2ecw.1.A	Tripartite motif-containing protein 30		0.43	-	32.00	NMR	monomer  	2 x ZN  
<input type="checkbox"/>	5fer.1.A	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25		0.43	0.26	32.05	X-ray, 2.3Å	hetero-hexamer 	4 x ZN  
<input type="checkbox"/>	5eya.1.C	Tripartite motif-containing 25 variant		0.43	0.27	32.05	X-ray, 2.4Å	hetero-hexamer 	4 x ZN  

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Western Blotting des WCL et des IP des MURF exogènes co-transfектés avec SUMO

Afin de déterminer la capacité des MURF à être modifiées et/ou à interagir avec SUMO, les MURF sont transfixés dans des cellules humaines 293T en présence ou pas de SUMO-1 et de SUMO-3. Les lysats totaux et les TRIM immunoprécipitées par les billes magnétiques anti-FLAG sont analysés par un Western Blotting. Dans cette expérience, FLAG-TRIM19 est utilisée comme un contrôle positif. Tout d'abord, pour qu'une protéine soit SUMOylée, elle doit avoir une bande de 12 Kb plus que sa taille normale autrement dit la taille de SUMO avec la taille normale de la protéine.

La révélation avec l'Ac anti-FLAG nous a permis de détecter les bonnes tailles des TRIM étudiées; 75 kDa, 40 kDa, 35 kDa et 97 kDa respectivement pour TRIM55, TRIM54, TRIM63 et TRIM19. Avec la révélation avec l'Ac anti-HA, nous n'avons pas détecté des tailles démontrant la SUMOylation des MURF. Ce qui suggère qu'aucune MURF purifiée n'a été SUMOylée ou n'interagit avec SUMO. Cependant, nous avons observé des chaînes de SUMOylation avec notre contrôle positif TRIM19 (Figure 4.1).

D'un autre côté, nous avons observé que TRIM55 et TRIM19 purifiées sont faiblement accumulées en présence de SUMO-3 (Figure 4.1).

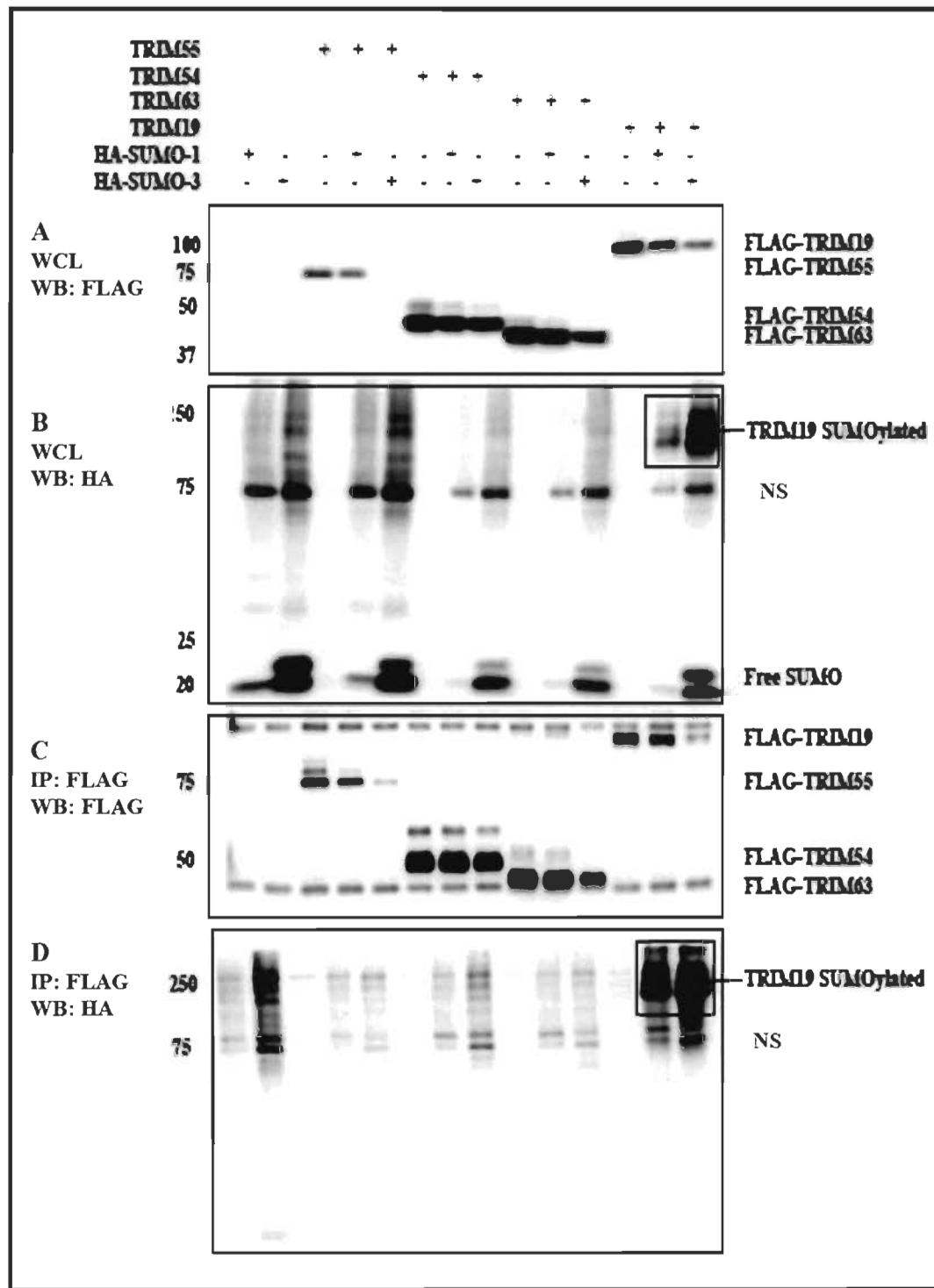


Figure 4.1 Aucune MURF n'est SUMOylée.

A et B, les protéines des lysats totaux sont analysées par un WB et sont révélées respectivement par un Ac anti-FLAG et un Ac anti-HA. C et D, les protéines immunoprecipitées par les billes magnétiques anti-FLAG sont analysées par un WB et les bandes sont révélées respectivement par un Ac anti-FLAG et un Ac anti-HA. NS pour une bande non spécifique.

4.2 Stabilité de TRIM55

Comme était mentionné précédemment, la révélation avec l'Ac anti-FLAG des lysats totaux et des IP montre une faible expression de TRIM55 et de TRIM19 co-transférées avec SUMO-3. Cependant, aucun impact n'est observé sur l'expression de TRIM54 et TRIM63.

Pour comprendre l'effet obtenu, TRIM55, TRIM19 et TRIM54 ont été co-transférés dans des cellules 293T avec des concentrations croissantes de SUMO-1 et de SUMO-3. Par la suite, les protéines des lysats totaux sont analysées par Western Blotting (Figure 4.2 A, B et C).

La révélation avec l'Ac anti-FLAG nous a permis de détecter les tailles spécifiques de chaque protéine. De plus, cette révélation a suggéré que la surexpression de SUMO influence l'expression de TRIM55 et TRIM19 (Figure 4.2 A et C). Cependant, nous n'avons pas détecté un effet sur l'expression de TRIM54 (Figure 4.2 B).

À cette raison et comme il est démontré déjà que TRIM19 peut être dégradée par la voie protéasomique, Nous avons suggéré qu'il s'agit peut-être d'une dégradation qui peut être liée à la voie protéasomique et/ou à la voie lysosomiale.

Afin de déterminer quelle voie est impliquée et quelle est l'origine de cette faible accumulation, les cellules co-transférées ou pas avec TRIM55 et SUMO-3 ont été traitées par les inhibiteurs de ces deux voies, respectivement par MG132 et bafilomycine. La révélation avec l'Ac anti-FLAG suggère que les deux voies protéasomique et lysosomiale sont impliquées dans cette dégradation (Figure 4.2 D).

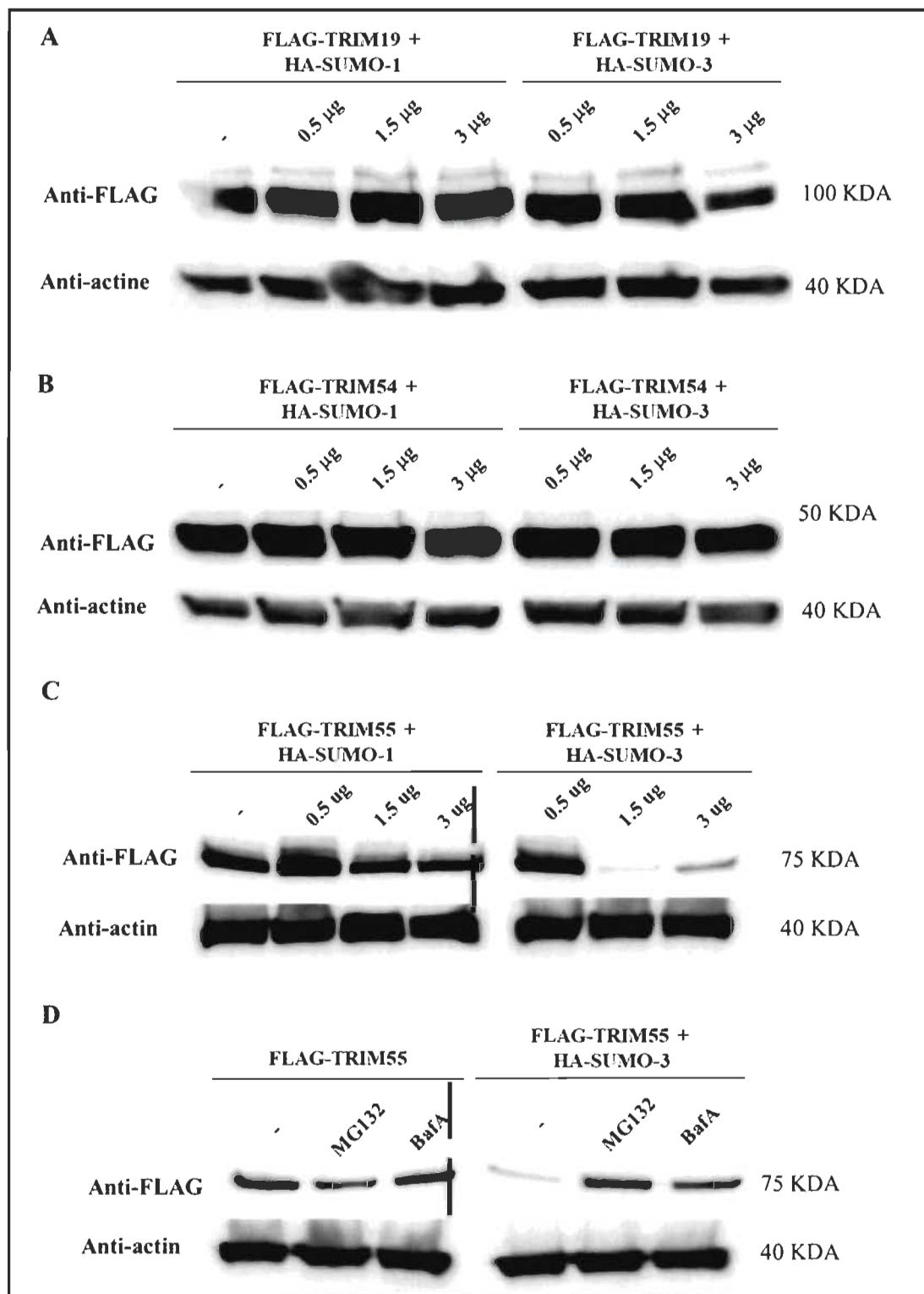


Figure 4.2 TRIM55 est dégradée par la voie protéasomique et lysosomiale en présence de SUMO-3.
A, B et C, la surexpression de SUMO-3 influence l'expression de TRIM19 et de TRIM55. **D,** les voies protéasomique et lysosomiale interviennent dans la dégradation de TRIM55.

4.3 Identification des motifs d'interaction avec SUMO

Dans le but d'identifier les motifs potentiels d'interaction avec SUMO, une analyse informatique a été réalisée en utilisant GPS-SUMO.

La séquence de TRIM55 est analysée par cet outil informatique, et cette analyse suggère que TRIM55 a deux motifs potentiels d'interaction avec SUMO (SIM) (Figure 4.3). Le premier SIM (SIM1) présente la séquence « VVILP » qui se situe entre la 37^e et la 41^e acides aminés de sa séquence. Le deuxième SIM (SIM2) présente la séquence « IIDIY » qui se trouve entre le 104^e et le 108^e acide aminé de la séquence. Nous remarquons que les SIM cités sont riches en acides aminés hydrophobes, qui sont une propriété de tous les SIM.

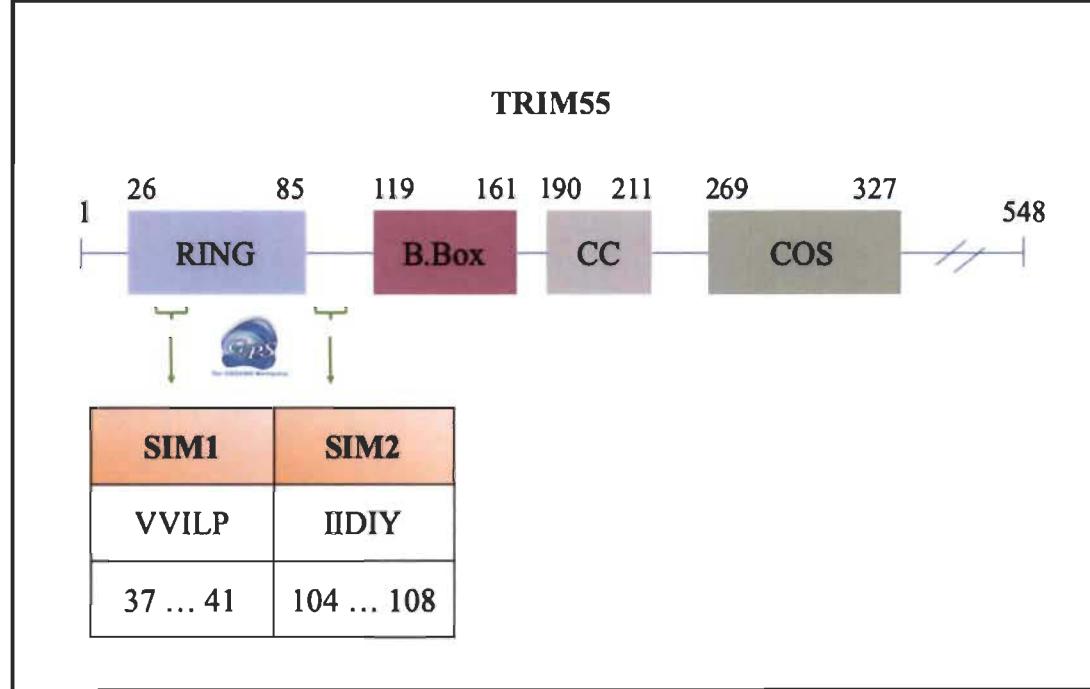


Figure 4.3 TRIM55 contient deux SIM potentiels.

Afin de déterminer la position des SIM dans la structure de TRIM55, nous avons modélisé la séquence couvrante de ces deux SIM, c'est-à-dire de la première méthionine de TRIM55 jusqu'à la première cystéine du domaine B-Box par l'application PyMOL.

Cette modélisation démontre que SIM1 se situe sur un feuillet β et qui est dans le cœur du domaine RING. Par contre, SIM2 se trouve sur une hélice α et qui est plus éloignée du domaine RING (Figure 4.4).

1 MSASLNYSFSKQQTMDNLEKQLICPICLEMFTKPVVILPCQHNLCKCASDIFQASNPYLPTRGTTMASGGRFRCPSC
RHEVVLDLDRHGKVYGLQRNLLVEN**LIDLY**QESTRPEKKSDQPMC 121

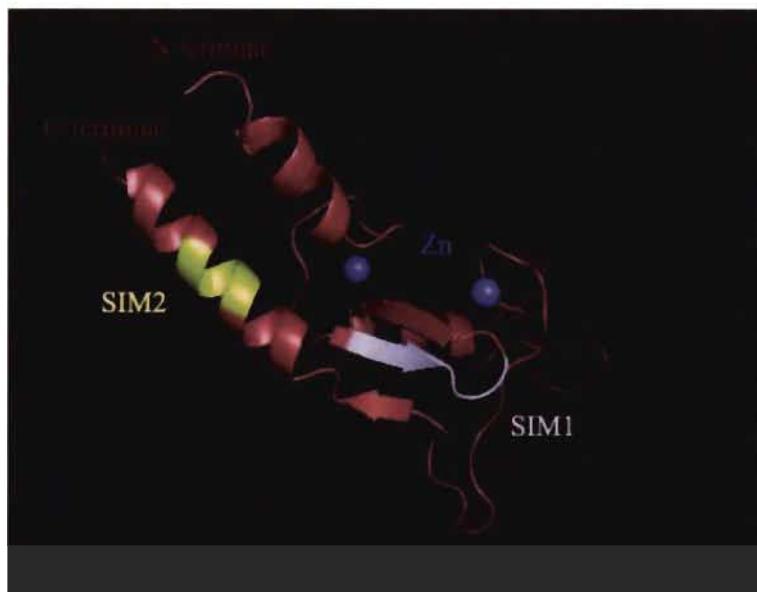


Figure 4.4 Modélisation de TRIM55.

4.4 Rôle des SIM dans la stabilité de TRIM55

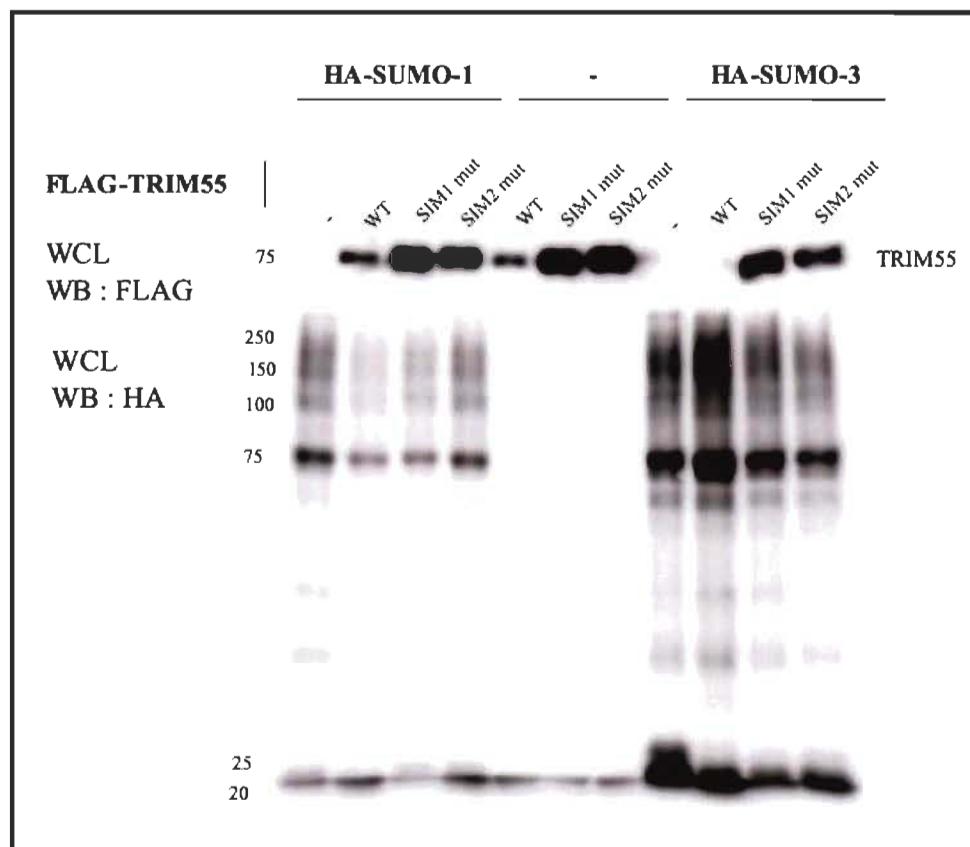
Dans le but de déterminer le rôle des SIM dans la stabilité de TRIM55, tous les acides aminés hydrophobes ont été mutés en alanine en utilisant des PCR.

Après la vérification des mutants par un séquençage, nous avons co-transfектé les cellules 293T par TRIM55 WT ou mutantes (Tableau 4.1) en présence ou pas de SUMO-1 et SUMO-3. Par la suite, les WCL ont été analysés par des WB. Avec la révélation avec l'Ac anti-FLAG, nous avons observé que TRIM55 WT est faiblement accumulées que les mutants. Ce qui nous mène à conclure que SIM1mut et SIM2mut sont plus stables que TRIM55 WT (Figure 4.5).

Tableau 4.1

Mutations des SIM

SIM1 WT	<u>VVILP</u>
SIM1MUT	AAALP
SIM2 WT	IIDIY
SIM2MUT	AADAY

**Figure 4.5** SIM1mut et SIM2mut sont plus stables que TRIM55 WT.

Comme il était suggéré précédemment que les deux voies protéasomique et lysosomiale sont impliquées dans la dégradation de TRIM55 de type sauvage, mais leurs effets sur l'expression des mutants sont inconnus.

Pour ce faire, les cellules 293T ont été co-transférées par TRIM55 WT ou mutants avec ou sans SUMO-3. Par la suite, les cellules transférées sont traitées ou pas avec MG132 et bafilomycine.

Avec la révélation avec l'Ac anti-FLAG, nous avons observé que les mutants sont plus stables que TRIM 55 WT et nous n'avons pas détecté un effet sur l'expression des SIM, ce qui peut être expliqué que SIM1 et SIM2 favorisent le roulement rapide de TRIM55 (Figure 4.6).

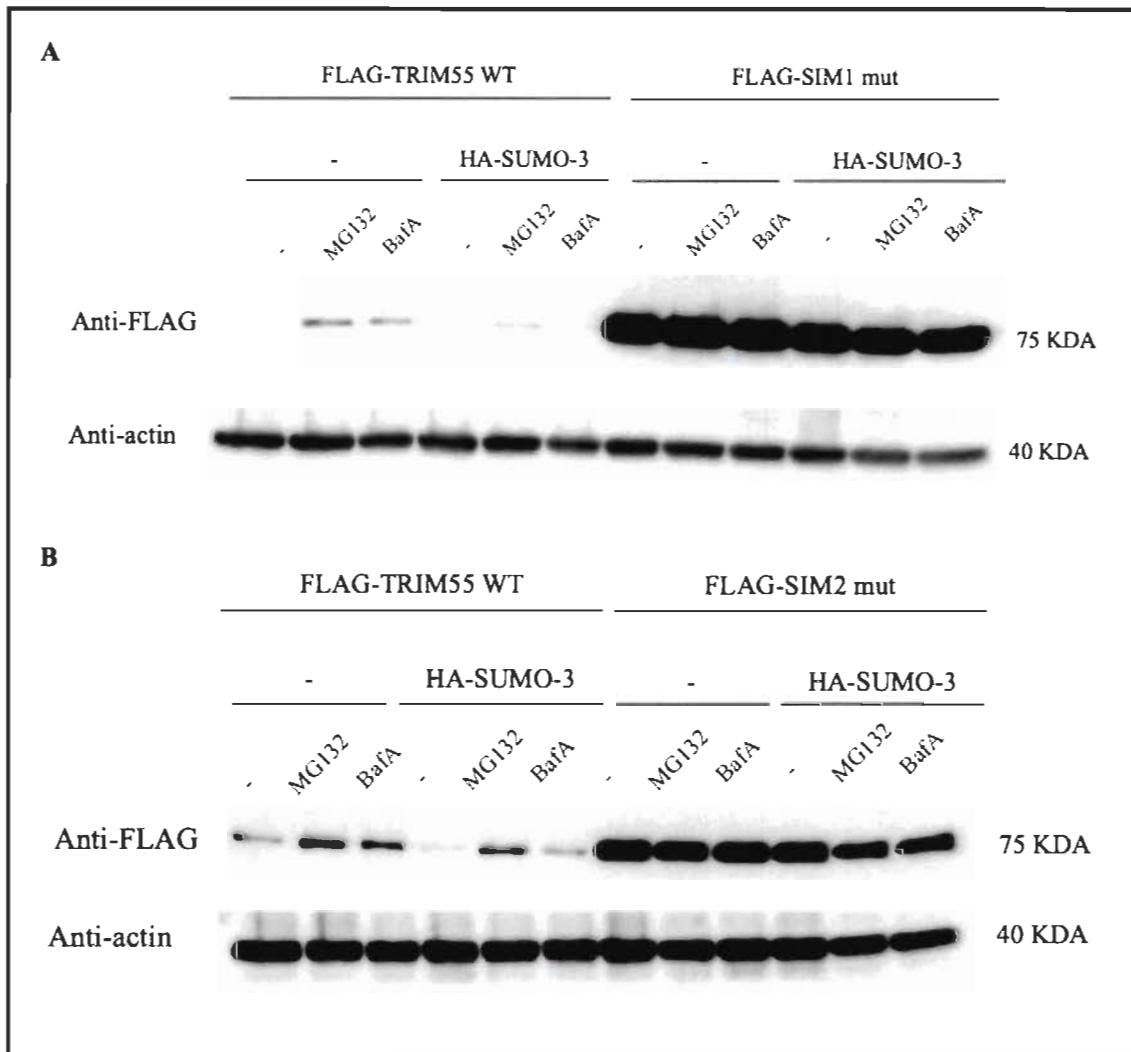
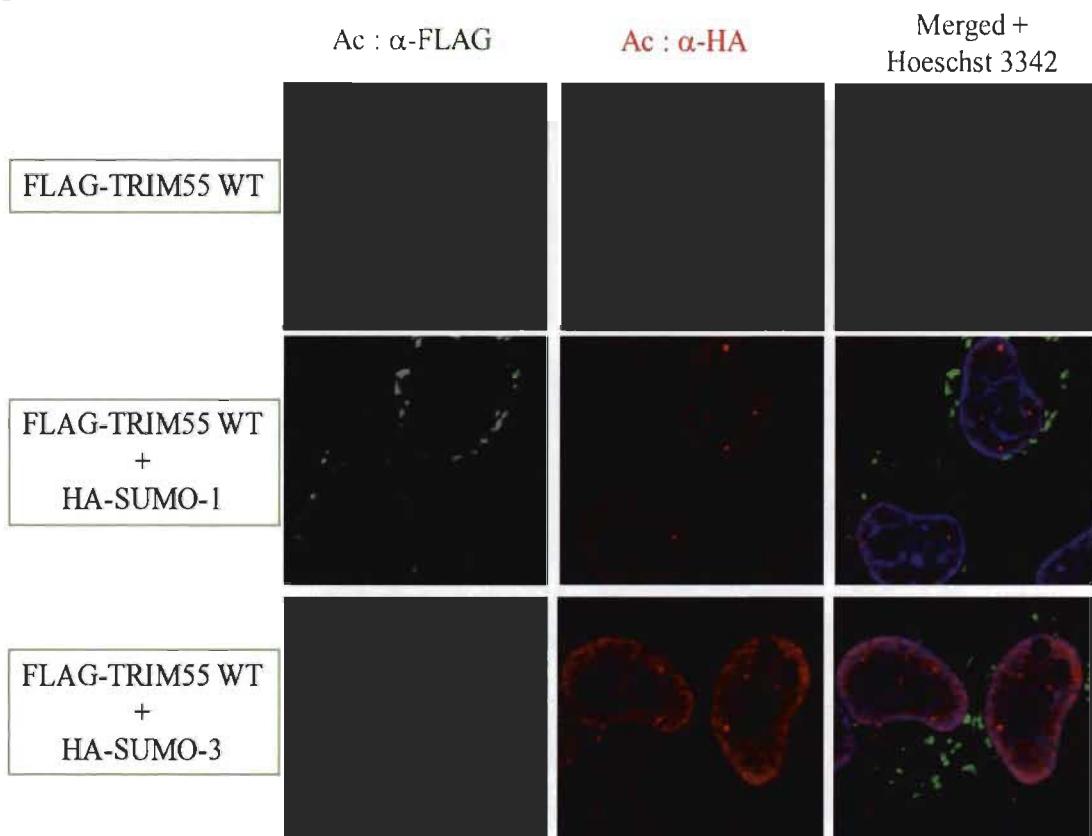
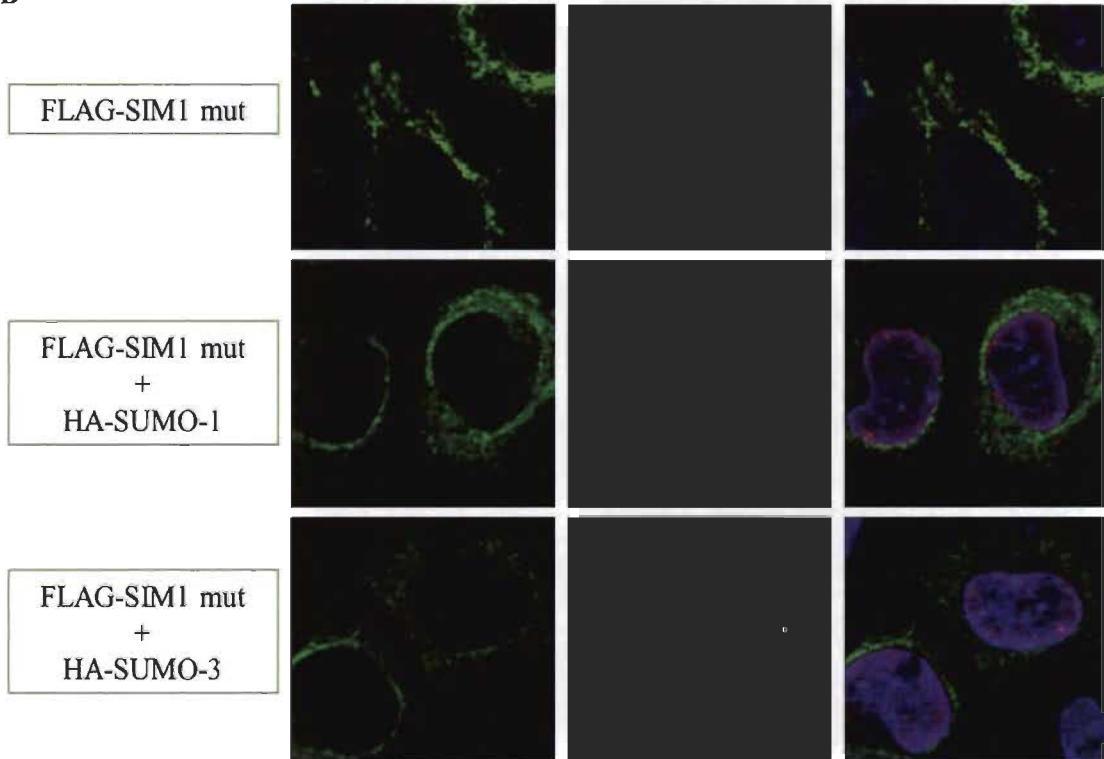


Figure 4.6 Pas d'effet des voies protéasomique et lysosomiale dans l'expression des mutants.

4.5 Rôle des SIM dans la localisation subcellulaire

Dans la littérature, il a été démontré que la voie de la SUMOylation peut affecter la localisation subcellulaire de ces cibles notamment, TRIM5 α (97).

Dans notre projet, et afin de déterminer le rôle des SIM potentiels dans la localisation subcellulaire de TRIM55, nous avons co-transfектé les cellules HeLa par FLAG-TRIM55 WT ou mutantes avec ou pas HA-SUMO-1 et HA-SUMO-3. Avec la révélation avec les anticorps fluorescents (Ac-anti-souris et Ac anti-lapin), nous avons observé que TRIM55 sauvage forme des corps cytoplasmiques (Figure 4.7 A) alors que SIM1mut et SIM2mut présentent une distribution plus diffuse tout autour du noyau (Figure 4.7 B et Figure 4.7 C).

A**B**

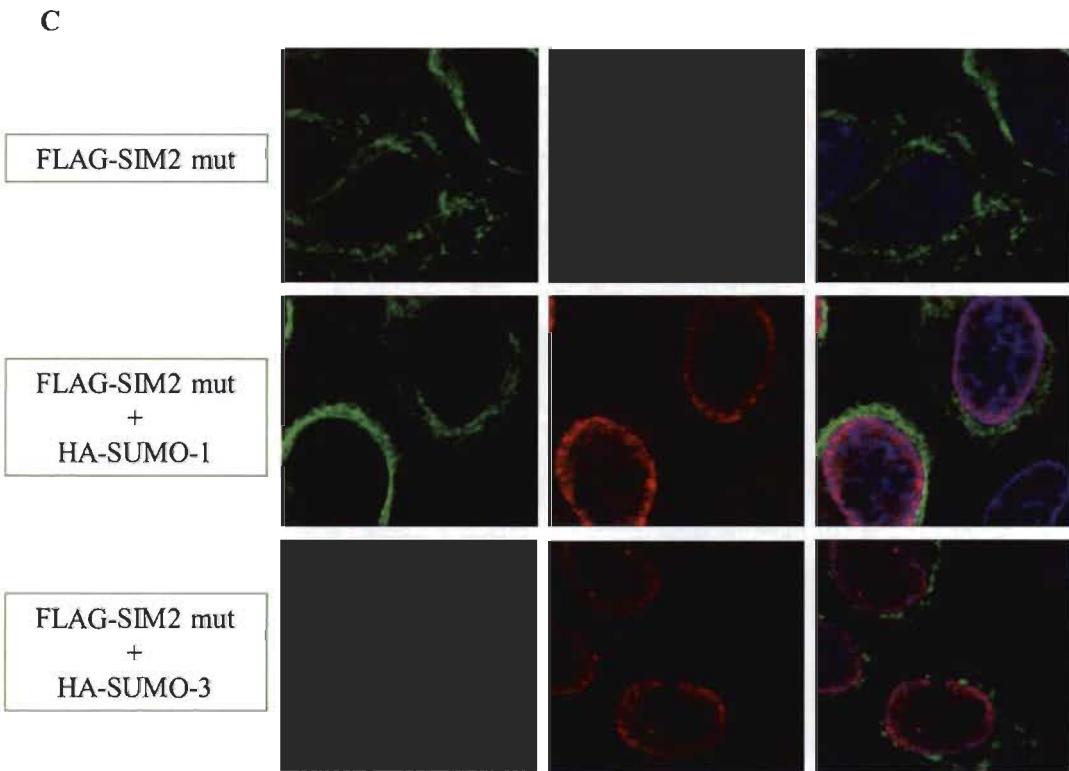


Figure 4.7 SIM1mut et SIM2mut présentent une distribution plus diffuse autour de noyau.

Dans cette expérience, SIM2mut co-transfектée avec SUMO-3 présente une distribution sous forme de corps cytoplasmiques (Figure 4.7 C), mais leurs fonctions sont encore inconnues. Comme il était mentionné précédemment, TRIM55 est impliquée dans la dynamique des microtubules. Par conséquent, la co-localisation de TRIM55 avec les microtubules a été examinée en utilisant les Ac anti-FLAG et anti alpha tubuline (Figure 4.8).



C

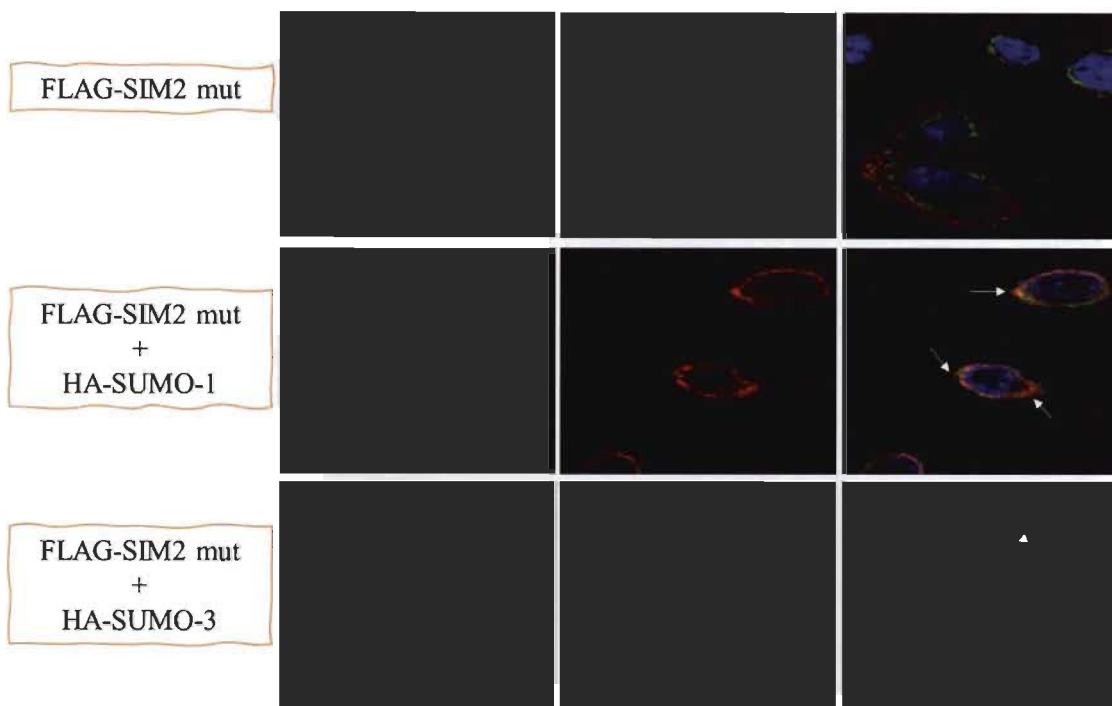


Figure 4.8 SIM1mut et SIM2mut co-transfектées avec SUMO co-localisent partiellement avec les microtubules.

Cette expérience a démontré que SIM1mut et SIM2mut co-transfектés avec SUMO-1 ou SUMO-3 présentent une co-localisation partielle avec les microtubules (flèches blanches). Cependant, ceci ne nous permet pas d'attirer des conclusions sur la dynamique des microtubules.

4.6 Rôle des SIM dans l'ubiquitination

Afin d'étudier la stabilité de TRIM55 WT, les cellules 293T ont été co-transfectée avec FLAG-TRIM55 sauvage ou mutants en présence ou pas de HA-SUMO-1 ou HA-SUMO-3 (expérience et résultat décrits dans la section 4.4). La révélation avec l'Ac anti-FLAG nous a permis de détecter une nouvelle bande de taille environ 85 kDa (indiqué par des flèches rouges). Cette bande semble être une forme ubiquitinée de TRIM55 (Figure 4.9).

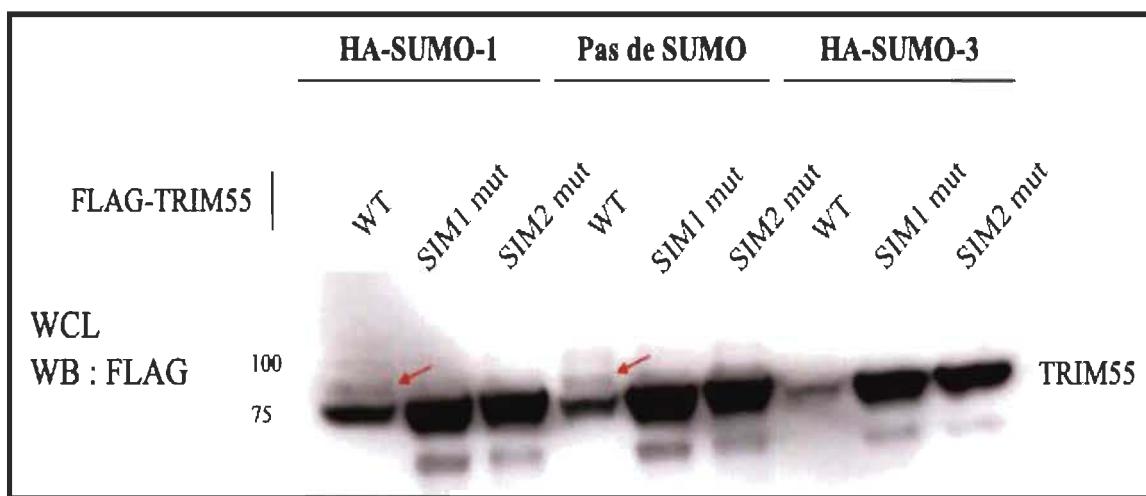


Figure 4.9 Forme ubiquitinée de TRIM55.

Pour cela, nous avons examiné le rôle des SIM dans l'ubiquitination. Dans cette expérience, les cellules 293T ont été co-transfектées avec TRIM55 sauvage et mutants en présence ou pas de l'ubiquitine de type sauvage ou ubiquitine mutée sur sa lysine 48, qui est impliquée dans la voie protéasomique. Avec la révélation d'Ac anti-Myc, nous avons observé que TRIM55WT présente des chaînes d'ubiquitination surtout en présence de Myc-Ub K48R (indiqué dans des cadres orange), mais SIM1mut et SIM2mut présentent seulement une forme mono-ubiquitinée (Figure 4.10), ce qui nous mène à conclure que les SIM maintiennent la forme poly-ubiquitinée de TRIM55.

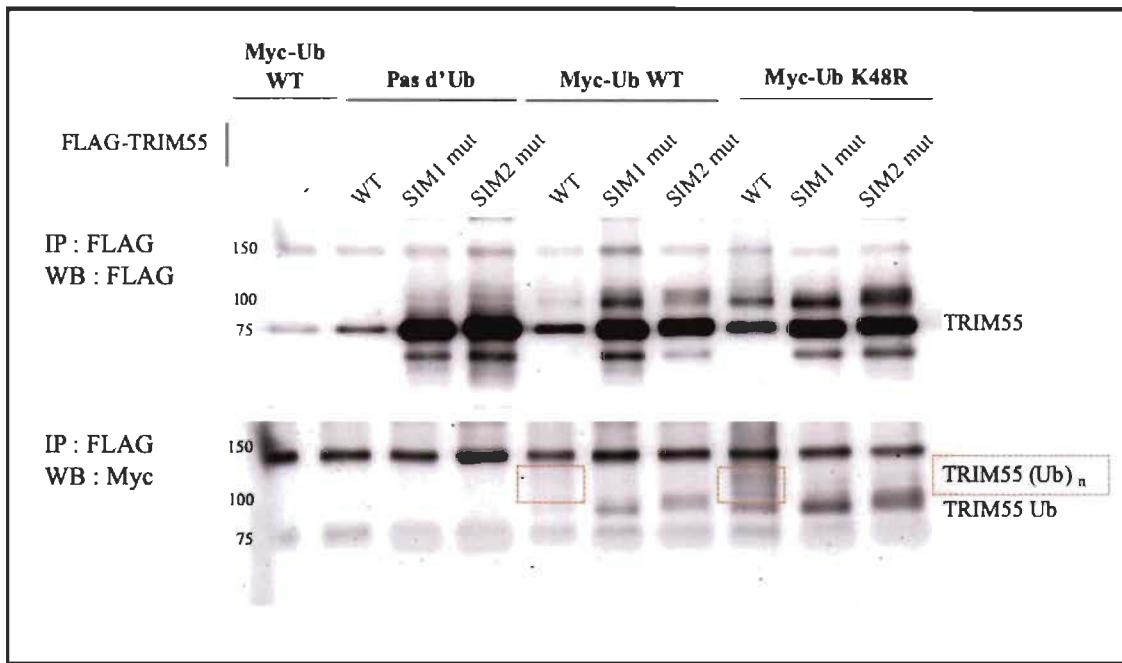


Figure 4.10 SIM1mut ou SIM2mut préviennent la forme poly-ubiquitinée de TRIM55.

CHAPITRE V

DISCUSSION

La modification post-traductionnelle par la protéine SUMO (SUMOylation) se produit à des sites « consensus » de SUMOylation, et correspond à la fixation de SUMO sur une lysine des substrats via une liaison isopeptidique (55).

La protéine SUMO peut interagir également avec des protéines via des liaisons non covalentes grâce à des motifs d'interaction avec SUMO (78).

La voie de la SUMOylation est impliquée dans de nombreux processus cellulaires notamment la transcription et la régulation du cycle cellulaire. De plus, cette modification influence la stabilité, la localisation subcellulaire et la fonction des protéines, comme TRIM19 et TRIM5 α (97,116,117).

Comme il est mentionné, les protéines TRIM sont une large famille de protéines qui peuvent être des substrats de la voie de la SUMOylation. Cette famille est regroupée en onze groupes en se basant sur leurs extrémités C-terminales (7). En relation avec la SUMOylation, quelques groupes des protéines TRIM n'ont pas été étudiés, notamment le deuxième groupe, nommé aussi les MURF.

Pour caractériser les MURF, nous avons examiné et déchiffré leurs relations fonctionnelles avec la voie de la SUMOylation par une analyse cellulaire.

Dans une première étape, les cellules 293T ont été co-transfектées avec les MURF et SUMO afin de déterminer leurs capacités à être SUMOylées et/ou à interagir avec SUMO. Avec le résultat des WB obtenu, nous n'avons pas réussi à détecter une MURF SUMOylée ou une interaction avec SUMO. Contrairement à notre contrôle positif,

TRIM19 a présenté une forme poly-SUMOylée en présence de SUMO-1 et SUMO-3 (Figure 4.1 – Chapitre IV).

Dans une autre expérience et dans le but d'examiner l'interaction des MURF avec SUMO, nous avons purifié les protéines HA-SUMO co-transférées avec FLAG-MURF en utilisant des billes magnétiques anti-HA. Par une analyse d'immunoblot, nous n'avons pas réussi à détecter une interaction entre MURF et SUMO mais, ceci n'exclut jamais son existence. Nous suggérons d'examiner encore une fois la SUMOylation et l'interaction des MURF avec SUMO en utilisant des cellules musculaires puisque ces protéines sont exprimées spécifiquement dans des cellules musculaires striées. Nous pensons que la ligne cellulaire peut affecter et changer quelques conclusions. En effet, Gabriel Heras et ses collègues ont utilisé la ligne cellulaire C2C12 et ils ont pu démontrer la SUMOylation de TRIM63 (MURF1) par SUMO-1 sur la lysine 238 (118).

Ce qui est intéressant avec les résultats des WB (Figure 4.1) que TRIM19 et TRIM55 présentent une faible accumulation en présence de SUMO-3.

Il est déjà connu dans la littérature que TRIM19 peut être dégradé par la voie protéasomique (117), mais aucune information sur TRIM55. Pour comprendre l'origine de cet effet, les cellules 293T ont été co-transférées avec TRIM55 en présence des concentrations croissantes de SUMO-1 et SUMO-3.

Avec le résultat des WB par la révélation anti-FLAG, nous avons observé qu'effectivement la surexpression de SUMO-3 surtout, influence l'expression de TRIM55. Ce faible niveau d'accumulation des protéines peut être expliqué par la dégradation protéasomique et/ou la dégradation lysosomiale. Par conséquent, les cellules ont été traitées par des inhibiteurs de ces deux voies respectivement, MG132 et bafilomycine. L'analyse des protéines nous a suggéré que les deux voies protéasomique et lysosomiale sont impliquées dans cette dégradation (Figure 4.2 D – Chapitre IV). Nous pouvons conclure alors que la surexpression de SUMO-3 favorise la dégradation de TRIM55 via la voie protéasomique et lysosomiale. Dans la littérature, il indique que la

régulation du roulement des protéines musculaires implique les deux voies protéasomique et lysosomiale. D'ailleurs, ces deux voies sont essentielles pour la maintenance des muscles. En effet, les isoformes de TRIM55 sont exprimées dans le muscle cardiaque. Cette expression est corrélée à celles des ligands liés au protéasome et l'autophagie notamment la protéine de liaison d'ubiquitine p62/ sequestosome1 SQSTM1 et « Autophagy Cargo Receptor » NBR1 (41).

L'analyse informatique de la protéine TRIM55 suggère qu'elle contient deux motifs potentiels d'interaction avec SUMO. Afin d'étudier le rôle des SIM dans la stabilité, la localisation subcellulaire et l'activité E3 ligase de l'ubiquitine, leurs noyaux hydrophobes ont été mutés en alanine (Figure 4.3 – Chapitre IV). Avec cette analyse, nous pouvons observer que SIM1mut et SIM2mut sont plus stables que TRIM55 WT (Figure 4.5 – Chapitre IV). De plus, le traitement avec MG132 et la bafilomycine n'a aucun effet sur l'expression des mutants (Figure 4.6 – Chapitre IV), ce qui peut être expliqué que les SIM favorisent le roulement rapide de la protéine TRIM55, ce qui suggère qu'ils pourraient être impliqués dans des interactions avec SUMO-3.

Cependant, en examinant le rôle de TRIM55 sauvage et mutants dans l'ubiquitination, nous avons observé que TRIM55 WT purifiée présente une forme poly-ubiquitinée essentiellement en présence de Ub-K48R. Par contre, SIM1mut et SIM2mut présentent seulement une forme mono-ubiquitinée (Figure 4.10 – Chapitre IV). Ce résultat suggère que les SIM préviennent la forme poly-ubiquitinée de TRIM55. Bien que la mutation de la lysine 48 en arginine inhibe partiellement la dégradation protéasomique mais il est important de noter que l'ubiquitine sauvage endogène existe encore. D'un autre côté, nous pouvons utiliser aussi l'inhibiteur des protéasomes au lieu de la mutation Ub-K48R pour détecter TRIM55-Ub48. Cependant, je pense qu'il est difficile de les détecter parce que je pense que c'est une inhibition partielle et que cet agent est toxique pour les cellules.

Dans notre étude, nous n'avons pas réussi à détecter une vraie interaction de TRIM55 avec SUMO mais, tout ce que nous connaissons qu'il existe une interaction

potentielle. Par conséquent, dans une autre expérience, nous avons examiné l'effet des SIM sur l'interaction avec SUMO. À cette raison, nous avons purifié SUMO en utilisant des billes d'agarose anti-HA. Par l'analyse des protéines purifiée, nous n'avions pas détecté une interaction entre SUMO-TRIM55. Cependant, ceci n'empêche pas son existence surtout lorsque nous avons observé son influence sur la poly-ubiquitination de TRIM55 (Figure 4.10). En fait, il est très difficile de détecter des protéines SUMOylées ou des interactions avec SUMO. D'ailleurs, seulement 5 % à 10 % des protéines sont démontrées SUMOylées (102).

Par une analyse microscopique, nous avons observé que TRIM55 WT forme des corps cytoplasmiques. Par contre, SIM1 et SIM2 présentent une distribution plus diffuse tout autour de noyau (Figure 4.7 – Chapitre IV). C'est vrai que dans notre étude, nous ne sommes pas arrivés à démontrer la SUMOylation ou l'interaction de TRIM55 avec SUMO, mais ceci n'élimine pas sa possibilité à influencer sa localisation subcellulaire. D'ailleurs, Nepveu-Traversy, Marie-Édith a démontré que la mutation de SIM4 de TRIM5 α rhésus réduit sa localisation nucléaire (97).

Ce qui est important ici, que SIM2 co-transfектé avec SUMO-3 reprend la formation des corps cytoplasmiques (Figure 4.7 – Chapitre IV), mais nous n'avions pas encore une explication pour cette observation. De plus, les fonctions spécifiques associées à la formation des corps cytoplasmiques de TRIM55 ne sont pas encore connues.

Comme il est mentionné précédemment, les MURF ainsi que TRIM18 (MID1) sont impliquées dans la dynamique des microtubules (119). Pour cette raison, nous avons voulu examiner la localisation subcellulaire de TRIM55 WT et mutants avec les microtubules. À cet effet, nous avons refait l'expérience précédente en utilisant un anticorps anti- α -tubuline.

Ici, nous avons observé que SIM1mut et SIM2mut co-transfектés avec SUMO présentent une faible co-localisation partielle avec les microtubules (Figure 4.8 – Chapitre IV). Il est connu aussi que TRIM55 s'associe transitoirement avec les

microtubules. Par conséquent les résultats obtenus, nous menons à conclure que les SIM et SUMO sont impliqués dans l'association de TRIM55 avec les microtubules.

Avec cette expérience, nous ne pouvons pas examiner vraiment le rôle de TRIM55 dans la dynamique des microtubules. Par contre, Sue Perera et ses collègues ont démontré que l'ablation du TRIMM55 perturbe cette dynamique et l'assemblage des myofibrilles dans des cultures cardiomyocytes (41).

Quant à l'activité E3 ligase de l'ubiquitine, Nepveu-Traversy, Marie-Édith a démontré que la lysine 10 de site de SUMOylation favorise la poly-ubiquitination de TRIM5 α liée à la lysine 63 (65). Concernant notre étude, nous ne savions pas encore si TRIM55 utilise son domaine RING comme une enzyme d'ubiquitine ligase pour son auto-ubiquitination. Nous suggérons alors cette question comme perspective. Mais, il faut noter que d'après la modélisation des SIM, nous avons observé que SIM1 se trouve dans le cœur du domaine RING (Figure 4.4 – Chapitre IV) et donc la mutation de ce SIM peut détruire complètement la fonction de ce domaine.

CHAPITRE VI

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

TRIM55 nommée aussi MURF-2 joue un rôle important dans la formation des muscles squelettique et cardiaque, mais cette protéine est faiblement étudiée vis-à-vis la voie de la SUMOylation.

Avec notre étude, nous n'avons pas réussi à démontrer que TRIM55 est SUMOylée et interagit avec SUMO. Cependant, l'analyse informatique suggère qu'elle contient deux motifs potentiels d'interaction avec SUMO. Grâce à notre étude, nous avons démontré que les motifs potentiels d'interaction avec SUMO de TRIM55 influencent sa stabilité, sa localisation subcellulaire et sa poly-ubiquitination.

Concernant notre future approche, nous devons déterminer si TRIM55 est une protéine auto-ubiquitinée. Pour ce faire, nous allons détruire la structure du domaine RING en mutant la deuxième cystéine de ce domaine afin de bloquer son activité E3 ligase de l'ubiquitine. Ce mutant sera utilisé comme un contrôle négatif.

Par la suite, nous allons co-transférer les cellules par TRIM55 WT ou mutées avec ubiquitine WT ou ubiquitine mutée sur toutes ses lysines. L'analyse par WB sera effectuée par des anticorps anti-K48 et anticorps anti-K63.

C'est vrai que nous n'avons pas détecté une interaction non covalente de TRIM55 avec SUMO par WB, mais ceci n'exclut pas son existence comme il a été mentionné précédemment. À cette raison, nous pouvons analyser et déterminer les partenaires de TRIM55 par spectrométrie de masse. Par la suite, nous pouvons examiner l'effet des SIM de TRIM55 sur ce nouveau partenaire s'il existe.

Grâce à notre étude, nous serons capables de caractériser, de cartographier les MURF et d'éclaircir leurs relations avec la voie de la SUMOylation et donc d'enrichir les connaissances scientifiques. En outre, nous participons à comprendre certaines relations et originalités des maladies musculaires.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Marín, I. (2012) Origin and diversification of TRIM ubiquitin ligases. *PLoS One* **7**, e50030
2. Carthagena, L., Bergamaschi, A., Luna, J. M., David, A., Uchil, P. D., Margottin-Goguet, F., Mothes, W., Hazan, U., Transy, C., Pancino, G., and Nisole, S. (2009) Human TRIM gene expression in response to interferons. *PLoS One* **4**, e4894
3. Ozato, K., Shin, D. M., Chang, T. H., and Morse, H. C., 3rd. (2008) TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 849-860.
4. Short, K. M., and Cox, T. C. (2006) Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J Biol Chem* **281**, 8970-8980.
5. Henry, J., Mather, I. H., McDermott, M. F., and Pontarotti, P. (1998) B30.2-like domain proteins: update and new insights into a rapidly expanding family of proteins. *Mol Biol Evol* **15**, 1696-1705.
6. Meroni, G., and Diez-Roux, G. (2005) TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* **27**, 1147-1157.
7. Patil, G., and Li, S. (2019) Tripartite motif proteins: an emerging antiviral protein family. *Future Virol* **14**, 107-122.
8. Versteeg, G. A., Rajsbaum, R., Sanchez-Aparicio, M. T., Maestre, A. M., Valdiviezo, J., Shi, M., Inn, K. S., Fernandez-Sesma, A., Jung, J., and Garcia-Sastre, A. (2013) The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity* **38**, 384-398.
9. Moududee, S. A., Jiang, Y., Gilbert, N., Xie, G., Xu, Z., Wu, J., Gong, Q., Tang, Y., and Shi, Y. (2018) Structural and functional characterization of hMEX-3C Ring finger domain as an E3 ubiquitin ligase. *Protein Sci* **27**, 1661-1669.
10. Deshaies, R. J., and Joazeiro, C. A. (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**, 399-434.

11. Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Ballabio, A. (2001) The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* **20**, 2140-2151.
12. Sardiello, M., Cairo, S., Fontanella, B., Ballabio, A., and Meroni, G. (2008) Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 225.
13. Joazeiro, C. A., and Weissman, A. M. (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**, 549-552.
14. Ikeda, K., and Inoue, S. (2012) TRIM proteins as RING finger E3 ubiquitin ligases. *Adv Exp Med Biol* **770**, 27-37.
15. Michael Anthony, M. (2019) Zinc-Binding B-Box Domains with RING Folds Serve Critical Roles in the Protein Ubiquitination Pathways in Plants and Animals.
16. Li, Y., Wu, H., Wu, W., Zhuo, W., Liu, W., Zhang, Y., Cheng, M., Chen, Y.-G., Gao, N., Yu, H., Wang, L., Li, W., and Yang, M. (2014) Structural insights into the TRIM family of ubiquitin E3 ligases. *Cell Research* **24**, 762-765.
17. Minucci, S., Maccarana, M., Cioce, M., De Luca, P., Gelmetti, V., Segalla, S., Di Croce, L., Giavara, S., Matteucci, C., Gobbi, A., Bianchini, A., Colombo, E., Schiavoni, I., Badaracco, G., Hu, X., Lazar, M. A., Landsberger, N., Nervi, C., and Pelicci, P. G. (2000) Oligomerization of RAR and AML1 transcription factors as a novel mechanism of oncogenic activation. *Mol Cell* **5**, 811-820.
18. Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Stremlau, M., Si, Z., and Sodroski, J. (2005) The Contribution of RING and B-box 2 Domains to Retroviral Restriction Mediated by Monkey TRIM5 α . *Journal of Biological Chemistry* **280**, 26933-26940.
19. Li, X., Li, Y., Stremlau, M., Yuan, W., Song, B., Perron, M., and Sodroski, J. (2006) Functional replacement of the RING, B-box 2, and coiled-coil domains of tripartite motif 5alpha (TRIM5alpha) by heterologous TRIM domains. *J Virol* **80**, 6198-6206.
20. Rajsbaum, R., Stoye, J. P., and O'Garra, A. (2008) Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. *Eur J Immunol* **38**, 619-630.

21. (1997) Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. *Cell* **90**, 797-807.
22. Horn, E. J., Albor, A., Liu, Y., El-Hizawi, S., Vanderbeek, G. E., Babcock, M., Bowden, G. T., Hennings, H., Lozano, G., Weinberg, W. C., and Kulesz-Martin, M. (2004) RING protein Trim32 associated with skin carcinogenesis has anti-apoptotic and E3-ubiquitin ligase properties. *Carcinogenesis* **25**, 157-167.
23. Kimura, F., Suzu, S., Nakamura, Y., Nakata, Y., Yamada, M., Kuwada, N., Matsumura, T., Yamashita, T., Ikeda, T., Sato, K., and Motoyoshi, K. (2003) Cloning and characterization of a novel RING-B-box-coiled-coil protein with apoptotic function. *J Biol Chem* **278**, 25046-25054.
24. Chae, J. J., Komarow, H. D., Cheng, J., Wood, G., Raben, N., Liu, P. P., and Kastner, D. L. (2003) Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell* **11**, 591-604.
25. Froesk, P., Weiler, T., Nylen, E., Sudha, T., Greenberg, C. R., Morgan, K., Fujiwara, T. M., and Wrogemann, K. (2002) Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet* **70**, 663-672.
26. Ishii, T., Ohnuma, K., Murakami, A., Takasawa, N., Yamochi, T., Iwata, S., Uchiyama, M., Dang, N. H., Tanaka, H., and Morimoto, C. (2003) SS-A/Ro52, an autoantigen involved in CD28-mediated IL-2 production. *J Immunol* **170**, 3653-3661.
27. Tissot, C., and Mechti, N. (1995) Molecular cloning of a new interferon-induced factor that represses human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat expression. *J Biol Chem* **270**, 14891-14898.
28. Patarca, R., Freeman, G. J., Schwartz, J., Singh, R. P., Kong, Q. T., Murphy, E., Anderson, Y., Sheng, F. Y., Singh, P., Johnson, K. A., and et al. (1988) rpt-1, an intracellular protein from helper/inducer T cells that regulates gene expression of interleukin 2 receptor and human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 2733-2737.
29. Barr, S. D., Smiley, J. R., and Bushman, F. D. (2008) The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. *PLoS Pathog* **4**, e1000007
30. van Gent, M., Sparrer, K. M. J., and Gack, M. U. (2018) TRIM Proteins and Their Roles in Antiviral Host Defenses. *Annu Rev Virol* **5**, 385-405.

31. Scherer, M., and Stamminger, T. (2016) Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *J Virol* **90**, 5850-5854.
32. Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004) The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**, 848-853.
33. Trockenbacher, A., Suckow, V., Foerster, J., Winter, J., Krauss, S., Ropers, H. H., Schneider, R., and Schweiger, S. (2001) MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet* **29**, 287-294.
34. Mayans, O., and Labeit, S. (2012) MuRFs: specialized members of the TRIM/RBCC family with roles in the regulation of the trophic state of muscle and its metabolism. *Adv Exp Med Biol* **770**, 119-129.
35. Huang, B., and Baek, S. H. (2017) Trim13 Potentiates Toll-Like Receptor 2-Mediated Nuclear Factor κB Activation via K29-Linked Polyubiquitination of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6. *Mol Pharmacol* **91**, 307-316.
36. Kallijärvi, J., Lahtinen, U., Hämäläinen, R., Lipsanen-Nyman, M., Palvimo, J. J., and Lehesjoki, A. E. (2005) TRIM37 defective in mulibrey nanism is a novel RING finger ubiquitin E3 ligase. *Exp Cell Res* **308**, 146-155.
37. Tomar, D., Singh, R., Singh, A. K., Pandya, C. D., and Singh, R. (2012) TRIM13 regulates ER stress induced autophagy and clonogenic ability of the cells. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 316-326.
38. Wang, Y., Li, Y., Qi, X., Yuan, W., Ai, J., Zhu, C., Cao, L., Yang, H., Liu, F., Wu, X., and Liu, M. (2004) TRIM45, a novel human RBCC/TRIM protein, inhibits transcriptional activities of Elk-1 and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 9-16.
39. Witt, S. H., Granzier, H., Witt, C. C., and Labeit, S. (2005) MURF-1 and MURF-2 Target a Specific Subset of Myofibrillar Proteins Redundantly: Towards Understanding MURF-dependent Muscle Ubiquitination. *Journal of Molecular Biology* **350**, 713-722.
40. Gregorio, C. C., Perry, C. N., and McElhinny, A. S. (2006) Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *Journal of Muscle Research & Cell Motility* **26**, 389.

41. Perera, S., Holt, M. R., Mankoo, B. S., and Gautel, M. (2011) Developmental regulation of MURF ubiquitin ligases and autophagy proteins nbr1, p62/SQSTM1 and LC3 during cardiac myofibril assembly and turnover. *Dev Biol* **351**, 46-61.
42. Lodka, D., Pahuja, A., Geers-Knörr, C., Scheibe, R. J., Nowak, M., Hamati, J., Köhncke, C., Purfürst, B., Kanashova, T., Schmidt, S., Glass, D. J., Morano, I., Heuser, A., Kraft, T., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., Dittmar, G., Sommer, T., and Fielitz, J. (2016) Muscle RING-finger 2 and 3 maintain striated-muscle structure and function. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **7**, 165-180.
43. Spencer, J. A., Eliazer, S., Ilaria, R. L., Jr., Richardson, J. A., and Olson, E. N. (2000) Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol* **150**, 771-784.
44. Pizon, V., Iakovenko, A., van der Ven, P. F. M., Kelly, R., Fatu, C., Fürst, D. O., Karsenti, E., and Gautel, M. (2002) Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *Journal of Cell Science* **115**, 4469.
45. Gregorio, C. C., Perry, C. N., and McElhinny, A. S. (2005) Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 389-400.
46. Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L. G., Hughes, S. M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edstrom, L., Ehler, E., Udd, B., and Gautel, M. (2005) The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* **308**, 1599-1603.
47. Spencer, J. A., Eliazer, S., Ilaria, R. L., Jr., Richardson, J. A., and Olson, E. N. (2000) Regulation of Microtubule Dynamics and Myogenic Differentiation by Murf, a Striated Muscle Ring-Finger Protein. *Journal of Cell Biology* **150**, 771-784.
48. Droescher, M., Chaugule, V. K., and Pichler, A. (2013) SUMO rules: regulatory concepts and their implication in neurologic functions. *Neuromolecular medicine* **15**, 639-660.
49. Nie, M., and Boddy, M. N. (2016) Cooperativity of the SUMO and ubiquitin pathways in genome stability. *Biomolecules* **6**, 14.
50. Chymkowitch, P., Nguéa P, A., and Enserink, J. M. (2015) SUMO-regulated transcription: Challenging the dogma. *BioEssays* **37**, 1095-1105.

51. Yang, W., and Paschen, W. (2015) SUMO proteomics to decipher the SUMO-modified proteome regulated by various diseases. *Proteomics* **15**, 1181-1191.
52. Martin, S., Wilkinson, K. A., Nishimune, A., and Henley, J. M. (2007) Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* **8**, 948-959.
53. Rabellino, A., Andreani, C., and Scaglioni, P. P. (2017) The Role of PIAS SUMO E3-Ligases in Cancer. *Cancer Res* **77**, 1542-1547.
54. Mahajan, R., Gerace, L., and Melchior, F. (1998) Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol* **140**, 259-270.
55. Hay, R. T. (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**, 1-12.
56. Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., and Hay, R. T. (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* **276**, 35368-35374.
57. Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of molecular biology* **280**, 275-286.
58. Huang, W. C., Ko, T. P., Li, S. S., and Wang, A. H. (2004) Crystal structures of the human SUMO-2 protein at 1.6 Å and 1.2 Å resolution: implication on the functional differences of SUMO proteins. *Eur J Biochem* **271**, 4114-4122.
59. Impens, F., Radoshevich, L., Cossart, P., and Ribet, D. (2014) Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 12432-12437.
60. Hecker, C. M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., and Dikic, I. (2006) Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* **281**, 16117-16127.
61. Ayaydin, F., and Dasso, M. (2004) Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues. *Mol Biol Cell* **15**, 5208-5218.
62. Pichler, A., Fatouros, C., Lee, H., and Eisenhardt, N. (2017) SUMO conjugation – a mechanistic view. *BioMolecular Concepts* **8**, 13-36.

63. Sampson, D. A., Wang, M., and Matunis, M. J. (2001) The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **276**, 21664-21669.
64. Gocke, C. B., Yu, H., and Kang, J. (2005) Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates. *J Biol Chem* **280**, 5004-5012.
65. Nepveu-Traversy, M. E., and Berthoux, L. (2014) The conserved sumoylation consensus site in TRIM5alpha modulates its immune activation functions. *Virus Res* **184**, 30-38.
66. Dohmen, R. J. (2004) SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 113-131.
67. Kirsh, O., Seeler, J. S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., and Dejean, A. (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J* **21**, 2682-2691.
68. Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I. A., van Santen, M. A., van de Rijke, F., van Dam, H., Gnad, F., Mann, M., and Vertegaal, A. C. (2010) Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol Cell* **39**, 641-652.
69. Yang, X. J., and Chiang, C. M. (2013) Sumoylation in gene regulation, human disease, and therapeutic action. *F1000Prime Rep* **5**, 45.
70. Yang, S. H., Galanis, A., Witty, J., and Sharrocks, A. D. (2006) An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J* **25**, 5083-5093.
71. Mohideen, F., Capili, A. D., Bilimoria, P. M., Yamada, T., Bonni, A., and Lima, C. D. (2009) A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 945-952.
72. Kang, J., Gocke, C. B., and Yu, H. (2006) Phosphorylation-facilitated sumoylation of MEF2C negatively regulates its transcriptional activity. *BMC Biochem* **7**, 5.
73. Yang, X. J., and Gregoire, S. (2006) A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond. *Mol Cell* **23**, 779-786.

74. Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H. A., Fujimoto, M., Palvimo, J. J., Nakai, A., and Sistonen, L. (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 45-50.
75. Tremblay, A. M., Wilson, B. J., Yang, X. J., and Giguere, V. (2008) Phosphorylation-dependent sumoylation regulates estrogen-related receptor-alpha and -gamma transcriptional activity through a synergy control motif. *Mol Endocrinol* **22**, 570-584.
76. Namanja, A. T., Li, Y. J., Su, Y., Wong, S., Lu, J., Colson, L. T., Wu, C., Li, S. S., and Chen, Y. (2012) Insights into high affinity small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition by SUMO-interacting motifs (SIMs) revealed by a combination of NMR and peptide array analysis. *J Biol Chem* **287**, 3231-3240.
77. Sriramachandran, A. M., and Dohmen, R. J. (2014) SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 75-85.
78. Kerscher, O. (2007) SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* **8**, 550-555.
79. Song, J., Zhang, Z., Hu, W., and Chen, Y. (2005) Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation. *J Biol Chem* **280**, 40122-40129.
80. Merrill, J. C., Melhuish, T. A., Kagey, M. H., Yang, S.-H., Sharrocks, A. D., and Wotton, D. (2010) A Role for Non-Covalent SUMO Interaction Motifs in Pcb/Cbx4 E3 Activity. *PLoS One* **5**, e8794
81. Beauclair, G., Bridier-Nahmias, A., Zagury, J. F., Saib, A., and Zamborlini, A. (2015) JASSA: a comprehensive tool for prediction of SUMOylation sites and SIMs. *Bioinformatics* **31**, 3483-3491.
82. Sun, H., and Hunter, T. (2012) Poly-small ubiquitin-like modifier (PolySUMO)-binding proteins identified through a string search. *J Biol Chem* **287**, 42071-42083.
83. Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G., and Chen, Y. (2004) Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14373.
84. Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., Liu, Z., Zhao, Y., Xue, Y., and Ren, J. (2014) GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res* **42**, W325-330.

85. Nisole, S., Maroui, M. A., Mascle, X. H., Aubry, M., and Chelbi-Alix, M. K. (2013) Differential Roles of PML Isoforms. *Front Oncol* **3**, 125.
86. de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991) The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**, 675-684.
87. Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honore, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P. P., Puvion, E., Freemont, P., and de The, H. (2001) Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As₂O₃-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* **193**, 1361-1371.
88. Maroui, M. A., Pampin, M., and Chelbi-Alix, M. K. (2011) Promyelocytic Leukemia Isoform IV Confers Resistance to Encephalomyocarditis Virus via the Sequestration of 3D Polymerase in Nuclear Bodies. *Journal of Virology* **85**, 13164.
89. Li, C., Peng, Q., Wan, X., Sun, H., and Tang, J. (2017) C-terminal motifs in promyelocytic leukemia protein isoforms critically regulate PML nuclear body formation. *Journal of Cell Science* **130**, 3496.
90. Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P. S. (2001) PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* **20**, 7223-7233.
91. Chu, Y., and Yang, X. (2011) SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene* **30**, 1108-1116.
92. Wang, Q. Q., Zhou, X. Y., Zhang, Y. F., Bu, N., Zhou, J., Cao, F. L., and Naranmandura, H. (2015) Methylated arsenic metabolites bind to PML protein but do not induce cellular differentiation and PML-RARalpha protein degradation. *Oncotarget* **6**, 25646-25659.
93. Hands, K. J., Cuchet-Loureiro, D., Everett, R. D., and Hay, R. T. (2014) PML isoforms in response to arsenic: high-resolution analysis of PML body structure and degradation. *Journal of Cell Science* **127**, 365.
94. Kikuchi, M., Okumura, F., Tsukiyama, T., Watanabe, M., Miyajima, N., Tanaka, J., Imamura, M., and Hatakeyama, S. (2009) TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is repressed by a bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1828-1836.

95. Appikonda, S., Thakkar, K. N., Shah, P. K., Dent, S. Y. R., Andersen, J. N., and Barton, M. C. (2018) Cross-talk between chromatin acetylation and SUMOylation of tripartite motif-containing protein 24 (TRIM24) impacts cell adhesion. *J Biol Chem* **293**, 7476-7485.
96. Black, L. R., and Aiken, C. (2010) TRIM5alpha disrupts the structure of assembled HIV-1 capsid complexes in vitro. *J Virol* **84**, 6564-6569.
97. Nepveu-Traversy, M. E., Demogines, A., Fricke, T., Plourde, M. B., Riopel, K., Veillette, M., Diaz-Griffero, F., Sawyer, S. L., and Berthoux, L. (2016) A putative SUMO interacting motif in the B30.2/SPRY domain of rhesus macaque TRIM5alpha important for NF-kappaB/AP-1 signaling and HIV-1 restriction. *Heliyon* **2**, e00056
98. Prigge, J. R., and Schmidt, E. E. (2006) Interaction of protein inhibitor of activated STAT (PIAS) proteins with the TATA-binding protein, TBP. *J Biol Chem* **281**, 12260-12269.
99. Niu, G. J., Xu, J. D., Yuan, W. J., Sun, J. J., Yang, M. C., He, Z. H., Zhao, X. F., and Wang, J. X. (2018) Protein Inhibitor of Activated STAT (PIAS) Negatively Regulates the JAK/STAT Pathway by Inhibiting STAT Phosphorylation and Translocation. *Front Immunol* **9**, 2392.
100. Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2002) PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* **22**, 5222-5234.
101. Kaur, K., Park, H., Pandey, N., Azuma, Y., and De Guzman, R. N. (2017) Identification of a new small ubiquitin-like modifier (SUMO)-interacting motif in the E3 ligase PIASy. *J Biol Chem* **292**, 10230-10238.
102. Xiao, Y., Pollack, D., Nieves, E., Winchell, A., Callaway, M., and Vigodner, M. (2015) Can your protein be sumoylated? A quick summary and important tips to study SUMO-modified proteins. *Anal Biochem* **477**, 95-97.
103. Tirumalai, R. S., Pargellis, C. A., and Landy, A. (1996) Identification and characterization of the N-ethylmaleimide-sensitive site in lambda-integrase. *J Biol Chem* **271**, 29599-29604.
104. Suzuki, T., Ichiyama, A., Saitoh, H., Kawakami, T., Omata, M., Chung, C. H., Kimura, M., Shimbara, N., and Tanaka, K. (1999) A New 30-kDa Ubiquitin-related SUMO-1 Hydrolase from Bovine Brain. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 31131-31134.

105. van der Veen, A. G., and Ploegh, H. L. (2012) Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem* **81**, 323-357.
106. Callis, J. (2014) The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *Arabidopsis Book* **12**, e0174
107. Moon, J., Parry, G., and Estelle, M. (2004) The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Plant Development. *The Plant Cell* **16**, 3181.
108. Swatek, K. N., and Komander, D. (2016) Ubiquitin modifications. *Cell Res* **26**, 399-422.
109. Huang, X., and Dixit, V. M. (2016) Drugging the undruggables: exploring the ubiquitin system for drug development. *Cell Research* **26**, 484-498.
110. Lecker, S. H., Goldberg, A. L., and Mitch, W. E. (2006) Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *Journal of the American Society of Nephrology* **17**, 1807.
111. Adhikari, A., Xu, M., and Chen, Z. J. (2007) Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* **26**, 3214-3226.
112. Pertel, T., Hausmann, S., Morger, D., Zuger, S., Guerra, J., Lascano, J., Reinhard, C., Santoni, F. A., Uchil, P. D., Chatel, L., Bisiaux, A., Albert, M. L., Strambio-De-Castillia, C., Mothes, W., Pizzato, M., Grutter, M. G., and Luban, J. (2011) TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* **472**, 361-365.
113. Shieh, P. B., Kudryashova, E., and Spencer, M. J. (2011) Limb-girdle muscular dystrophy 2H and the role of TRIM32. *Handb Clin Neurol* **101**, 125-133.
114. Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S., and Leahy, D. J. (2013) Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol* **529**, 227-240.
115. Mooers, B. H. (2016) Simplifying and enhancing the use of PyMOL with horizontal scripts. *Protein Sci* **25**, 1873-1882.
116. Li, X., Lin, H. H., Chen, H., Xu, X., Shih, H. M., and Ann, D. K. (2010) SUMOylation of the transcriptional co-repressor KAP1 is regulated by the serine and threonine phosphatase PP1. *Sci Signal* **3**, ra32.

117. Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., and de The, H. (2008) Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* **10**, 547-555.
118. Heras, G., Namuduri, A. V., Traini, L., Shevchenko, G., Falk, A., Bergström Lind, S., Jia, M., Tian, G., and Gastaldello, S. (2018) Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) functions and cellular localization are regulated by SUMO1 post-translational modification. *Journal of Molecular Cell Biology* **11**, 356-370.
119. Berti, C., Fontanella, B., Ferrentino, R., and Meroni, G. (2004) Mig12, a novel Opitz syndrome gene product partner, is expressed in the embryonic ventral midline and co-operates with Mid1 to bundle and stabilize microtubules. *BMC Cell Biol* **5**, 9.

ANNEXE A

PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Tampon de lyse complet

- 9,8 mL de tampon de lyse RIPA buffer (20 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP40, Triton X100, 0,5 % acide deoxycholique)
- 1 tablette de l'inhibiteur de protéase
- 250 µL de NEM (à ajouter juste avant l'utilisation parce qu'il se dégrade rapidement)

NEM

- 0,05 g NEM
- 1 mL ethanol 100 %
- Brasser jusqu'à ce que tout soit dissout
- Mettre 25 µL par 1 mL de tampon de lyse

PSB 5X (Protein Sample Buffer)

- 0,3 M Tris-HCl pH 6,8
- 50 % Glycérole
- 0,01 % bleu bromophénol
- 10 % SDS
- 10 % β-mercaptopéthanole

TRIS-HCl 1M pour 1 L

- 121,1 g Tris base
- 800 mL d'eau déionisée

Running buffer 10X pour 4 L

- 250 mM Tris base 121g
- 1,9 M glycine 576 g
- 1 % SDS 40 g
- Ajuster le pH à 8,3

Transfer buffer 10X pour 1 L

- 250 mM Tris Base 30,3 g
- 19 mM glycine 144 g
- Ajuster le pH à 8,3

Transfer buffer 1X + 20 % MeOH pour 4 L

- 400 mL transfer buffer 10X
- 800 mL MeOH
- Ajuster avec l'eau déionisée
- Conserver à 4 °C

Solution de blockage (5 %) pour une membrane

- 0,5 g du lait ou du BSA
- 10 mL TBST

TBS (Tris Bufferd Saline) 10 X pour 4 L

- 200 mM Tris 96,92 g
- 1,5 M NaCl 350.64 g
- Ajuster le pH à 7,4

TBST (TBS + Tween-20) pour 8 L

- 800 mL TBS 10X
- 8 mL Tween 20
- Mettre en agitation pendant 1 heure

Solution de stripping

- 0,1 M glycine
- 20 mM acétate de magnésium
- 50 mM KCl
- Ajuster le pH à 2,2

Solution de perméabilisation 10 X, 30 mL

- Triton-X-100 (1 %) 300 µL
- Sodium de citrate (1 mM), 0,3 g
- Ajuster avec l'eau déionisé

Solution de fixation et de perméabilisation

- Solution de perméabilisation (1X), 1,5 mL
- PBS (1X), 11,880 mL
- Formaldéhyde (4 %), 1.62 mL

TAE (Tris-Acétate EDTA Buffer) 50X pour 1 L

- 242 g Tris base
- 57,1 mL acide acétique glaciale
- 100 mL EDTA, 0.5 M pH 8.0
- Ajuster avec l'eau

TAE 1X pour 1 L

- 20 mL de la solution de stockage à 50X
- Ajuster avec l'eau

SOC

- Dans une zone stérile. Près d'une flamme :
- 200 mL de SOB stérile
- 4 mL de glucose stérile 1M
- 1 mL de MgCl₂ stérile 2M

ANNEXE B

LES PLASMIDES UTILISÉS

