



HAL
open science

Analyse intégrative du rôle de l'excision de la méthionine N-terminale dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs

Frédéric Frottin

► **To cite this version:**

Frédéric Frottin. Analyse intégrative du rôle de l'excision de la méthionine N-terminale dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112045 . tel-00923136

HAL Id: tel-00923136

<https://theses.hal.science/tel-00923136>

Submitted on 2 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ
PARIS-SUD 11



UNIVERSITE PARIS-SUD 11
ÉCOLE DOCTORALE : Sciences du Végétal

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT
soutenu le 29/04/2011

par

Frédéric FROTTIN

Afin d'obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE PARIS XI

Analyse intégrative du rôle de l'excision
de la méthionine N-terminale dans le
cytoplasme des eucaryotes supérieurs

Composition du jury :

Pr. Pierre LE MARECHAL	PRESIDENT DU JURY
Dr. Bruno FRANZETTI	RAPPORTEUR
Dr. Dominique JOB	RAPPORTEUR
Pr. Zach ADAM	EXAMINATEUR
Dr. Carmela GIGLIONE	DIRECTEUR DE THESE

Remerciements

Mon travail de thèse a été effectué au sein de l'Unité Propre de Recherche C.N.R.S., Institut des Sciences du Végétal dans l'équipe Maturation, destinée cellulaire des protéines et thérapeutique dans le cadre d'une allocation de recherche du ministère (MENRT) poursuivie par une allocation « fin de thèse » de l'ARC.

Je remercie sincèrement le Dr Thierry Meinnel de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir soutenu et aidé dans la réalisation de mes projets par l'intermédiaire de discussions toujours fructueuses et pleines de sens. Je le prie de trouver ici l'assurance de ma profonde et respectueuse considération.

J'exprime toute ma gratitude à Carmela Giglione, qui m'a confié ce projet de thèse passionnant, qui m'a supervisé durant toutes ces années, tout en préservant mon autonomie. Je la remercie de m'avoir transmis son enthousiasme pour la science. Je garde un souvenir ému de ses nombreux emails « peux tu venir STP » !

Je remercie également chaleureusement Jérôme Bignon et Miao de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (équipe J. Bakala) pour leur grande disponibilité, participation active à mon travail sur les lignées cellulaires humaines, pour m'avoir pleinement fait profiter de leurs connaissances et pour toutes ces discussions improvisées et si enrichissantes.

Je remercie le Dr Bruno Franzetti et le Dr Dominique Job de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse, ainsi que le Pr Zach Adam et le Pr Pierre Le Maréchal d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens à remercier Aude Martinez, ma « co-thésarde » (et gardienne de fenêtres fermées !) dans le bureau 328. Je mentionne également le soutien indéfectible des troubadours de l'ISV passés et présents.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe : Sonia, Christelle, Michèle pour leur aide et soutien quotidien; Yann, Sylvain et José pour être toujours là pour détendre l'atmosphère; Willy, Renata, Wojciech, Chiara, Imene, Margaux et Alex pour toutes ces discussions passionnantes et moments partagés.

Je n'oublierai jamais non plus le Dr Vincent Ribrag et toute son équipe qui ont su me remettre sur pied dans les moments les plus difficiles.

Je remercie également toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien, aide ou sympathie et dont il serait difficile d'en faire une liste exhaustive.

Enfin je remercie Laurie pour sa patience et son soutien quotidien et mes parents sans qui tout cela n'aurait pas été possible.

MERCI !

Résumé

Le premier acide aminé incorporé dans une chaîne polypeptidique naissante est toujours la méthionine. On identifie donc toujours ce premier résidu à la méthionine N-terminale. Cependant, les deux tiers des protéines accumulées à l'état stationnaire ne présentent plus leur méthionine initiatrice. Cet enlèvement résulte essentiellement d'une maturation protéolytique affectant chaque protéine. Ainsi, l'**E**xcision de la **M**éthionine **N**-terminale (NME) concerne la majorité des protéines et ce dès que les premiers résidus émergent du ribosome. Ce mécanisme est retrouvé dans tous les compartiments cellulaires où une synthèse protéique a lieu : le cytoplasme, les plastes et les mitochondries. Les enzymes responsables du clivage de la méthionine initiatrice sont les **METH**ionine **A**mino**P**eptidases (METAPs) ; les METAPs sont conservées dans le Règne vivant. Des études fonctionnelles de délétions géniques ont montré le caractère létal du maintien de la première méthionine dans tous les organismes. Il y a plus de dix ans, les METAPs ont été identifiées comme étant la cible de composés naturels ayant des effets anticellulaires. Aujourd'hui un nombre croissant d'études rapportent que la NME est une cible prometteuse pour le traitement de nombreuses pathologies. Néanmoins, les bases moléculaires qui expliquent le caractère essentiel de la NME restent très peu comprises, en particulier dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs.

Grâce à un système inductible permettant de moduler finement la NME cytoplasmique dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et différentes approches incluant des analyses protéomiques et métabolomiques, j'ai pu étudier les événements moléculaires précoces associés à l'inhibition de la NME cytoplasmique. J'ai également caractérisé la contribution relative des deux types de METAP cytoplasmiques au processus. Dans ce contexte, j'ai pu démontrer chez *A. thaliana* que la NME cytoplasmique agit sur deux voies de signalisation fréquemment dérégulées lors de conditions pathologiques : le statut des composés thiolés et la protéolyse. La diminution de la NME cytoplasmique induit une protéolyse accrue principalement *via* une augmentation du nombre de protéines destinées à une dégradation rapide. Ainsi, l'activité de la NME, en modulant la sensibilité de nombreuses protéines à subir la protéolyse, est un élément fondamental de la régulation de la demi-vie protéique. Finalement, mes résultats similaires obtenus également chez les Archées, levures et les lignées de cellules humaines suggèrent l'existence d'un mécanisme ubiquitaire associé à la NME.

Abstract

The first amino acid incorporated in nascent polypeptide chain is always methionine so called N-terminale methionine. However, in a given proteome, more than fifty percent of proteins have not this first methionine. Indeed, the early proteolytic event affecting a majority of proteins is **N**-terminal **M**ethionine **E**xcision (NME) as soon as few residues exit from the ribosome. Enzymes ensuring NME process are conserved along species. This mechanism takes place in all compartments where protein synthesis occurs including cytoplasm, plastids and mitochondria and the enzymes responsible of N-methionine excision are **METH**ionine **A**mino**P**eptidases (METAP). Early functional studies of gene deletion has quickly showed that NME is an essential process. Ten years ago, METAPs have been identified as the molecular target of natural compounds with anticancer activities. Now, a growing number of studies suggest that NME is a promising target for treatment of various deseases. Nevertheless, molecular mechanisms making NME an essential process is poorly understood in particular in higher eukaryote cytoplasm.

Using a dedicated inducible system in the model organism *Arabidopsis thaliana* and multiple approaches, including proteomics and metabolomics, I examined the earliest molecular events associated with the inhibition of this process and the contribution of both METAP to NME process. In this context, I demonstrated that cytoplasmic NME in *A. thaliana* orchestrates a cross-talk between two fundamental signaling pathways frequently deregulated in pathological conditions: thiol status and proteolysis. In these studies, we demonstrated that developmental defects induced by cytoplasmic NME inhibition are associated with an increase of the proteolytic activity due to an increase of the proteins available for rapid degradation. Thus, NME activity that modifies the availability of several proteins for degradation is an integral and fundamental element protein turnover regulation. Finally my preliminary results obtained in Archea, Fungi and human cells seem to suggest the existence of a ubiquitous mechanism associated with NME process.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	4
Abstract	5
INTRODUCTION	14
I. Modifications protéiques	17
1. <i>Les protéines, effecteurs dynamiques et régulées</i>	17
2. <i>La protéolyse, un mécanisme présent dès la synthèse</i>	18
3. <i>Modifications N-terminales des protéines</i>	19
II. Les constituants de l'excision de la méthionine N-terminale	21
1. <i>L'excision de la méthionine N-terminale</i>	21
2. <i>Les méthionine aminopeptidases</i>	22
III. Implications et applications thérapeutiques de l'excision de la méthionine N-terminale	31
1. <i>L'excision de la méthionine N-terminale : une cible thérapeutique attractive</i>	31
2. <i>La méthionine aminopeptidase 2 : une cible, plusieurs effets</i>	31
3. <i>La méthionine aminopeptidase 1, une cible émergente</i>	38
4. <i>Effets physiologiques de la diminution de l'excision de la méthionine N-terminale</i>	39
IV. Rôles physiologiques de l'excision de la méthionine N-terminale	49
1. <i>L'excision de la méthionine N-terminale comme un prérequis</i>	49
2. <i>Les méthionine aminopeptidases, une régulation différentielle</i>	51
3. <i>L'excision de la méthionine N-terminale et le métabolisme de la méthionine</i>	52
4. <i>L'excision de la méthionine N-terminale et dégradation protéique</i>	54
V. Problématiques, enjeux et objectifs du doctorat	65
1. <i>Rappel général de l'état de l'art: de l'enzyme à l'organisme, du plus au moins connu</i>	65
2. <i>Enjeux de la thèse</i>	66
3. <i>Objectifs du doctorat</i>	67
RESULTATS	68
I. NME, glutathion et protéolyse : acteurs majeurs - Utilisation du modèle <i>Arabidopsis thaliana</i>	71

<i>1. Introduction</i>	71
<i>2. Résumé de l'article : « Cotranslational Proteolysis Dominates Glutathione Homeostasis to support Proper Growth and Development » (Annexe 1 et [1])</i>	72
<i>3. Contrôles et expériences additionnels effectués</i>	76
II. Aspects universels de l'excision de la méthionine N-terminale	91
<i>1. Excision de la méthionine N-terminale et glutathion chez les archées et les champignons</i>	91
<i>2. L'aide d'un modèle simplifié où l'étude de la NME est bien avancée, le chloroplaste</i>	94
<i>3. Protéolyse et excision de la méthionine N-terminale chez H. volcanii</i>	101
<i>4. L'excision de la méthionine N-terminale chez l'Homme, similitudes, différences et valorisation</i>	106
<i>5. Spécificité de substrats des méthionine aminopeptidases</i>	120
DISCUSSION	126
Maturation, destinée cellulaire des protéines et thérapeutique	128
I. La NME, une spécificité de substrats très conservée	129
<i>1. Spécificité de substrats des METAPs procaryotiques</i>	130
<i>2. La spécificité de substrats des METAPs cytoplasmiques d'A. thaliana</i>	130
<i>3. Le cas de la spécificité de substrats des METAPs cytoplasmiques chez l'Homme</i>	131
II. Evénements physiologiques associés à l'inhibition de l'excision de la méthionine N-terminale dans le cytoplasme des eucaryotes	134
<i>1. Le glutathion comme une cible physiologique de la NME</i>	134
III. Le maintien de la méthionine N-terminale, signal de dégradation	139
<i>1. Le maintien de la méthionine N-terminale des protéines dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs : un rôle déstabilisant</i>	139
<i>2. L'influence de l'apparition de la méthionine N-terminale sur d'autres voies : ubiquitination N-terminale et N-α-acétylation</i>	141
<i>3. La situation dans le chloroplaste, un modèle d'étude de la NME</i>	144
<i>4. H. volcanii, un modèle d'étude des voies associées à la NME</i>	146
IV. L'excision de la méthionine N-terminale chez les mammifères, cycle cellulaire et glutathion	147
<i>1. L'homéostasie rédox et le cycle cellulaire</i>	148
<i>2. D'autres cibles de la NME</i>	151
V. La NME, processus ubiquitaire et voies associées conservées	154
<i>1. Le glutathion</i>	154

<i>2. La protéolyse</i>	156
VI. Conclusions - perspectives	156
MATERIELS ET METHODES	159
I. Propagation et culture du matériel vivant utilisé	162
<i>1. Arabidopsis thaliana</i>	162
<i>2. Saccharomyces cerevisiae</i>	163
<i>3. Haloferax volcanii</i>	165
<i>4. Lignées de cellules humaines</i>	166
II. Biologie moléculaire et génétique	169
<i>1. Extraction de l'ADN génomique d'A. thaliana et génotypage</i>	169
<i>2. Génotypage de loci de levures</i>	170
<i>3. Sous clonage des METAPs cytoplasmique d'A. thaliana</i>	170
<i>4. Electrophorèses d'ADN</i>	174
<i>5. Extraction des transcripts des cellules humaines et PCRs quantitatives</i>	174
<i>6. Analyse du cycle cellulaire chez les cellules humaines</i>	175
III. Biochimie des protéines	176
<i>1. Extraction des protéines d'A. thaliana</i>	176
<i>2. Dosage des protéines</i>	176
<i>3. Electrophorèses des protéines - SDS-PAGE</i>	177
<i>4. Western blot</i>	177
<i>5. Détection des protéines carbonylées</i>	178
<i>6. Séparation et dosage des peptides chez A. thaliana</i>	179
<i>7. Mesure de l'activité d'enzymes antioxydante chez A. thaliana</i>	179
<i>8. Expression et purification d'AtMETAP1A</i>	180
<i>9. Mesure de l'activité méthionine aminopeptidase</i>	181
IV. Dosage de métabolites	184
<i>1. Dosage du glutathion chez Arabidopsis</i>	184
<i>2. Dosage du glutathion chez les cellules humaines</i>	184
<i>3. Dosage du glutathion chez les HUVEC avec le CMFDA</i>	185
<i>4. Dosage des nicotinamides chez A. thaliana</i>	186
<i>5. Analyse des thiols chez A. thaliana</i>	186
<i>6. Quantification des métabolites et acides aminés chez A. thaliana</i>	187

ANNEXE 1 « Cotranslational Proteolysis Dominates Glutathione Homeostasis to Support Proper Growth and Development »	189
ANNEXE 2 «The proteomics of N-terminal methionine cleavage »	222
BIBLIOGRAPHIE	243

Liste des figures et tableaux

Fig. 1 - Réactions enzymatiques de la voie d'excision de la méthionine N-terminale	22
Fig. 2 - Organisation en domaine des METAPs et classification	23
Fig. 3 - Alignement de séquences de différentes METAPs	25
Fig. 4 - Identité de séquences de différentes METAPs	26
Fig. 5 - Structure des deux types de METAPs	26
Fig. 6 - La spécificité de substrats des METAPs	30
Fig. 7 - Inhibiteurs des METAPs	37
Fig. 8 - Voies de blocage du cycle cellulaire proposées lors de l'inhibition des METAPs humaines	44
Fig. 9 - Autres conséquences physiologiques de l'inhibition de la METAP2 humaine	47
Fig. 10 - Multiples effets de l'inhibition de la NME cytoplasmique sur la croissance tumorale	48
Fig. 11 - Interaction entre METAP2 et métabolisme de la méthionine	54
Fig. 12 - Mécanisme catalytique des quatre classes majeures de protéases	55
Fig. 13 - Voie ubiquitine-protéasome	57
Fig. 14 - Règle de l'azote N-terminal à travers le vivant	58
Fig. 15 - Dégradation des protéines substrats de la règle de l'azote N-terminal	60
Fig. 16 - Ubiquitination et acétylation utilisent les mêmes groupements accepteurs	62
Fig. 17 - Inhibition de la NME cytoplasmique chez <i>A. thaliana</i> et système biologique d'étude	72
Fig. 18 - Le phénotype des plantes ayant leur NME cytoplasmique diminuée est similaire à celui du mutant <i>rml1</i>	74
Fig. 19 - Analyse du développement du mutant <i>metap1a</i> cultivé en présence de 100 nM de fumagilline	78
Fig. 20 - Etat d'oxydation protéique lors de la diminution de la NME cytoplasmique	79
Fig. 21 - Activités ascorbate peroxydases et catalases lors de la diminution de la NME cytoplasmique	80
Fig. 22 - La NME et le fer dans la cellule	81
Fig. 23 - Métabolisme de la cystéine et tests de complémentation.	84
Fig. 24 - Siliques issues du croisement <i>gr1 ; METAP1A X GR1 ; metap1a</i>	86
Fig. 25 - Test de transmission des gamètes	86
Fig. 26 - Test de la sensibilité du double mutant <i>gr1 ; metap1a</i> à la fumagilline.	88
Fig. 27 - Ratio des différents pyridines nucléotides chez <i>A. thaliana</i>	89
Fig. 28 - Effet de la diminution de la NME cytoplasmique sur l'activité protéolytique cellulaire.	90
Fig. 29 - Identification de la METAP d' <i>Haloferax volcanii</i>	92
Fig. 30 - Inhibition de l'activité de la METAP2 de <i>P. furiosus</i> par la fumagilline	93
Fig. 31 - L'analyse génétique des doubles mutants <i>pdf1b ftsH2</i> positionne PDF1B en amont de FtsH2 et agissant dans la même voie.	97
Fig. 32 - L'accumulation de D1 et D2 dans les plantes des différents génotypes.	98
Fig. 33 - La réduction de la traduction chloroplastique induit l'accumulation des formes D1 et D2 déformylées uniquement en absence de FtsH2	99
Fig. 34 - L'analyse de la dégradation de D1 et D2 <i>in vivo</i> montre une diminution rapide de l'accumulation de D2 dans le mutant <i>ftsH2</i> à l'obscurité tandis que les formes de D1 et D2 déformylées sont dégradées par FtsH2 lors de la photo-inhibition.	101

Fig. 35 - Le mutant <i>Δtet</i> à un taux de croissance réduit par rapport à la lignée wt	103
Fig. 36 - Le mutant <i>Δtet</i> est moins sensible à l'inhibition de la NME que la lignée wt.	105
Fig. 37 - Alignement de séquences de différentes protéines TET.	106
Fig. 38 - Prolifération des HUVECs en présence de fumagilline.	109
Fig. 39 - Prolifération des cellules EA.hy926s en présence de fumagilline.	110
Fig. 40 - Prolifération des cellules HCT-116s en présence de fumagilline.	111
Fig. 41 - Analyse des transcripts METAPs en fonction du temps, du traitement à la fumagilline et de la lignée cellulaire.	113
Fig. 42 - Dosage du glutathion chez les HUVECs et HCT-116s en présence de fumagilline.	115
Fig. 43 - Analyse du contenu en glutathion des HUVECs avec le CMFDA.	116
Fig. 44 - Analyse du cycle cellulaire lors de la diminution de la prolifération cellulaire des HUVECs avec la fumagilline.	118
Fig. 45 - Test de la complémentation de la prolifération des HUVECs par la cystéine.	119
Fig. 46 - Analyse du cycle cellulaire des cellules HUVECs en temps court en présence de fumagilline et de N-acétyl-cystéine.	120
Fig. 47 - Purification de <i>AtMETAP1A</i> .	123
Fig. 48 - Effet de la fumagilline sur l'activité d' <i>AtMETAP1A</i>	124
Fig. 49 - Influence de la position P1' sur l'efficacité catalytique d' <i>AtMETAP1A</i> <i>in vitro</i> .	125
Fig. 50 - Spécificité de substrats de la NME et de la N- α -acétylation	133
Fig. 51 - La NME dans le cytoplasme d' <i>A. thaliana</i>	138
Fig. 52 - Devenir protéique en fonction de la NME	143
Fig. 53 - Le résidu P1' détermine le devenir d'une protéine	144
Fig. 54 - L'inhibition de la NME chloroplastique induit une dégradation de D1 et D2 indépendante de FtsH2	145
Fig. 55 - La NME régule le cycle cellulaire à travers le statut du glutathion chez l'Homme	153
Fig. 56 - Mesure de l'activité METAP2.	183
Tab. 1 - Modifications N-terminales des protéines	20
Tab. 2 - Paramètres catalytiques du clivage de la méthionine N-terminale par <i>AtMETAP1A</i> pour les peptides substrats utilisés	124
Tab. 3 - Lignées d' <i>A. thaliana</i> utilisées ou obtenues durant mon doctorat	163
Tab. 4 - Lignées de <i>S. cerevisiae</i> utilisées	165
Tab. 5 - Liste des oligonucléotides utilisés pour vérifier le génotype des souches de levures aux <i>loci</i> YLR244c et YBL091c.	165
Tab. 6 - Oligonucléotides et sondes Taqman utilisées	175

Liste des abréviations

ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNi	acide ribonucléique interférant
ATP	adénosine triphosphate
CdK	kinase dépendante de cycline
CdKi	inhibiteur de kinase dépendante de cycline
CMFDA	5-chlorométhylfluorescein diacetate
Cyc	cycline
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
ERK	extracellular signal-regulated kinases
Fig	Figure
GST	glutathion-S-transférase
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
METAP	méthionine aminopeptidase
N-MYR	N-myristoylation
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Nat	N-acétyltransférase
NER	règles de l'azote N-terminal
NME	excision de la méthionine N-terminale
NTA	N- α -acétylation
NTU	Ubiquitination N-terminale
ORF	cadre ouvert de lecture
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PCNA	antigène nucléaire de la prolifération cellulaire
PDF	peptide déformylases
POEP	protection of eIF2 phosphorylation
PSII	photosystème II
Rb	rétinoblastome
rmsd	root mean square deviation
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RT-PCR	réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse
SDS	dodécylsulfate de sodium
Tab	Tableau
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem

Organismes :

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. cuniculi</i>	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>T. maritime</i>	<i>Thermotoga maritime</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Lignées cellulaires humaines :

HMVEC	Human MicroVascular Endothelial Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HCT-116	Lignée cellulaire humaine de carcinome colorectal
U-87	Lignée cellulaire humaine de glioblastome de stade 3
EA.Hy926	Lignée hybride obtenues après fusion des lignées HUVEC et A549

INTRODUCTION

Table des matières - Introduction

I. Modifications protéiques	17
<i>1. Les protéines, effecteurs dynamiques et régulées</i>	17
<i>2. La protéolyse, un mécanisme présent dès la synthèse</i>	18
<i>3. Modifications N-terminales des protéines</i>	19
II. Les constituants de l'excision de la méthionine N-terminale	21
<i>1. L'excision de la méthionine N-terminale</i>	21
<i>2. Les méthionine aminopeptidases</i>	22
A. Organisation des METAPs	22
B. Les méthionine aminopeptidases dans leur environnement	26
C. La double fonctionnalité de la méthionine aminopeptidase 2 animale	27
D. Les méthionine aminopeptidases et la controverse sur la nature du métal catalytique	28
E. La spécificité de substrats des méthionine aminopeptidases	29
III. Implications et applications thérapeutiques de l'excision de la méthionine N-terminale	31
<i>1. L'excision de la méthionine N-terminale : une cible thérapeutique attractive</i>	31
<i>2. La méthionine aminopeptidase 2 : une cible, plusieurs effets</i>	31
A. Effet anticellulaire de l'inhibition de la méthionine aminopeptidase 2	31
B. Méthionine aminopeptidase 2 et angiogenèse	33
C. Méthionine aminopeptidase 2, une cible pour le traitement de nombreuses affections	34
D. Les inhibiteurs des méthionine aminopeptidases 2 toujours en développement	35
<i>3. La méthionine aminopeptidase 1, une cible émergente</i>	38
<i>4. Effets physiologiques de la diminution de l'excision de la méthionine N-terminale</i>	39
A. La fonction POEP de la méthionine aminopeptidase 2 animale en question	39
B. Diminution de l'activité méthionine aminopeptidase et conséquences physiologiques sur le cycle cellulaire	40
C. Diminution de l'activité méthionine aminopeptidase et autres conséquences physiologiques	45
IV. Rôles physiologiques de l'excision de la méthionine N-terminale	49
<i>1. L'excision de la méthionine N-terminale comme un prérequis</i>	49
A. L'excision de la méthionine N-terminale et la N-myristoylation	49

B. Le résidu N-terminal catalytique	50
2. Les méthionine aminopeptidases, une régulation différentielle	51
3. L'excision de la méthionine N-terminale et le métabolisme de la méthionine	52
4. L'excision de la méthionine N-terminale et dégradation protéique	54
A. Dégradation protéique	54
B. Le système ubiquitine-protéasome	56
C. La règle de l'azote N-terminal et ubiquitination interne	57
D. La règle de l'azote N-terminal et ubiquitination N-terminale	60
E. NME et dégradation protéique, les faits.	62
F. N- α -acétylation	63
V. Problématiques, enjeux et objectifs du doctorat	65
1. Rappel général de l'état de l'art: de l'enzyme à l'organisme, du plus au moins connu	65
2. Enjeux de la thèse	66
3. Objectifs du doctorat	67

I. Les modifications protéiques

1. Les protéines, effecteurs dynamiques et régulées

Longtemps après leur découverte en 1838 par le chimiste néerlandais Gerhardus Johannes Mulder (<http://web.lemoyne.edu/~giunta/mulder.html>), les protéines ont été perçues uniquement comme des entités figées. Après leur synthèse, ces macromolécules étaient censées perdurer pendant une durée plus au moins constante puis être dégradées dans le cadre d'un processus destiné essentiellement à alimenter la cellule en acides aminés. L'étymologie du mot protéine – donné par le chimiste suédois Jöns Jakob Berzelius (<http://web.lemoyne.edu/~giunta/mulder.html>) - fait d'ailleurs initialement référence au caractère indispensable de substance de réserve de ces macromolécules qui constituent une partie majeure (60%) du poids sec des cellules (*prôtos* en grec ancien signifie *premier, essentiel*).

Progressivement et essentiellement depuis la fin des années 50, il est apparu que les protéines subissent en fait d'innombrables modifications durant un temps de vie très variable. Parmi ces modifications, on retrouve les phosphorylations [2], glycosylations [3], ligations de protéines (ubiquitination par exemple [4]) et bien d'autres, puisque 416 sont répertoriées à ce jour (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>). Les modifications protéiques sont le plus souvent essentielles pour le bon fonctionnement cellulaire. Ces modifications affectent les propriétés physicochimiques des protéines en leur permettant de moduler leur activité, leur localisation ou leur stabilité. La protéine ainsi modifiée adopte une structure très différente de la molécule directement codée par le gène. En moyenne, chaque protéine subit 5 modifications différentes.

D'un point de vue temporel, ces modifications peuvent avoir lieu à tout moment de l'existence des protéines. Lorsqu'elles affectent les protéines très précocement, c'est-à-dire au moment de leur synthèse, ces modifications sont dites co-traductionnelles. De telles modifications ont lieu avant que la protéine se détache du ribosome et bien souvent dès que les premiers acides aminés émergent du tunnel de sortie du ribosome, et avant que la protéine commence son repliement. Ainsi, les acides aminés qui seront finalement dissimulés dans la structure tridimensionnelle une fois le repliement achevé, sont à ce moment précis tous accessibles et susceptibles d'être modifiés. Les modifications affectant une protéine dont la synthèse est terminée sont dites post-traductionnelles. Elles ont lieu durant toute la vie de la

protéine. Certaines modifications peuvent être très transitoires et permettent ainsi de répondre rapidement à un besoin cellulaire précis.

Beaucoup de modifications protéiques sont étroitement régulées et certaines d'entre elles peuvent avoir des effets néfastes. C'est le cas notamment de l'oxydation protéique lors d'un stress oxydatif. Lorsque la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) devient trop importante, les mécanismes antioxydatifs ne suffisent plus à stabiliser l'homéostasie redox de la cellule. Cela conduit à une oxydation générale de la cellule, les ROS pouvant oxyder les protéines mais aussi les acides nucléiques et les lipides causant des dommages qui peuvent entraîner la mort cellulaire. L'oxydation d'une protéine peut conduire à sa dégradation, car mis à part peu d'exceptions, l'oxydation est irréversible et peut altérer la fonction de la protéine [5].

Par opposition à l'oxydation protéique, la plupart des modifications protéiques sont assurées par des activités enzymatiques distinctes qui permettent de les réaliser ou de les retirer. Ces mécanismes enzymatiques engendrent le caractère réversible et transitoire de beaucoup de modifications protéiques. Un des systèmes le mieux décrit est celui de la phosphorylation/déphosphorylation qui illustre très bien un tel mécanisme. Lorsque la seconde enzyme du mécanisme est absente, cela conduit à une modification protéique irréversible dans la plupart des cas. C'est le cas par exemple de la N-myristoylation, une réaction catalysée par la N-myristoyltransférase, qui consiste en l'ajout d'un acide gras sur une glycine N-terminale. Cet ajout est irréversible car il n'existe pas d'enzymes qui enlèvent ce groupement [6]. Le cas inverse existe aussi notamment pour l'oxydation des protéines. En effet, une méthionine oxydée par une ROS peut retrouver son état réduit grâce aux méthionine sulfoxyde réductases [7]. De même, une protéine peut être modifiée de façon réversible par des groupements plus importants tels que le glutathion [8].

2. La protéolyse, un mécanisme présent dès la synthèse

La protéolyse ou dégradation des protéines est un concept qui est apparu il y a approximativement 60 ans avec les premières expériences de marquage de l'azote (historique de la protéolyse dans [9]). La protéolyse est une modification majeure et irréversible qui affecte les protéines. Ce processus est assuré par un grand nombre de protéases qui peuvent représenter jusqu'à 5% d'un génome eucaryotique [10]. Les protéases occupent une fonction

prédominante dans d'innombrables processus physiologiques incluant le développement, la coagulation sanguine, la mort cellulaire ainsi que dans différentes pathologies telles que le cancer et les maladies infectieuses [11, 12, 13]. La protéolyse contrôle en général la durée de vie des protéines, élimine celles qui sont mal repliées ou endommagées, en détruit certaines de manière spécifique pour réguler une fonction et conséquemment participe au maintien du pool d'acides aminés libres cellulaires. La protéolyse cellulaire est un processus très bien contrôlé : toute dégradation protéique abusive est systématiquement liée à d'importants problèmes dans de nombreux organismes [14, 15, 16, 12]. Même si le plus souvent la protéolyse est associée à la dégradation des protéines, il ne faut pas oublier que d'autres modifications protéolytiques, non reliées à des processus de dégradation, existent *i.e.* le clivage des peptides d'adressage après importation de la protéine dans son compartiment fonctionnelle [17, 18].

3. Modifications N-terminales des protéines

Les modifications affectant les protéines peuvent avoir lieu sur toute leur longueur y compris les résidus N- et C-terminaux. Le seul impératif est l'accessibilité du résidu subissant la modification. La partie N-terminale est une des régions les plus actives concernant les modifications protéiques depuis la synthèse protéique jusqu'à sa dégradation. En effet, le résidu N-terminal peut subir de nombreuses modifications qui lui sont spécifiques ou non (Tab. 1). Parmi lesquelles, la maturation N-terminale des protéines, une modification fondamentale irréversible, est le premier événement protéolytique affectant une protéine. En effet, la synthèse des protéines débute par l'ajout d'une méthionine initiatrice mais elle est, dans la majorité des cas, excisée par un mécanisme dédié. Ce processus nommé **Excision de la Méthionine N-terminale (NME)** est co-translationnel c'est-à-dire qu'il a lieu dès que les premiers résidus émergent du tunnel de sortie du ribosome avant l'initiation du repliement protéique [19].

Modifications spécifiques du N-terminus	Modifications non spécifiques du N-terminus
Excision du peptide leader ou propeptide [20]	Phosphorylation [2]
Déformylation [21]	Oxydation [22]
Excision de la méthionine N-terminale [21]	Méthylation [23]
N- α -acétylation [24]	ϵ -acétylation [25]
Cyclisation [26]	Lipidation (palmitoylation...) [27]
N-Myristoylation [6]	Ubiquitination [28]
Ligation (ubiquitination N-terminale, arginylation...) [4]	

Tableau 1. Modifications N-terminales des protéines

Le tableau présente les modifications pouvant affecter le résidu N-terminal des protéines. Elles sont classées en deux colonnes : à gauche celles qui sont spécifique du résidu N-terminal, à droite celles pouvant également affecter d'autres parties de la protéine.

II. Les constituants de l'excision de la méthionine N-terminale

1. L'excision de la méthionine N-terminale

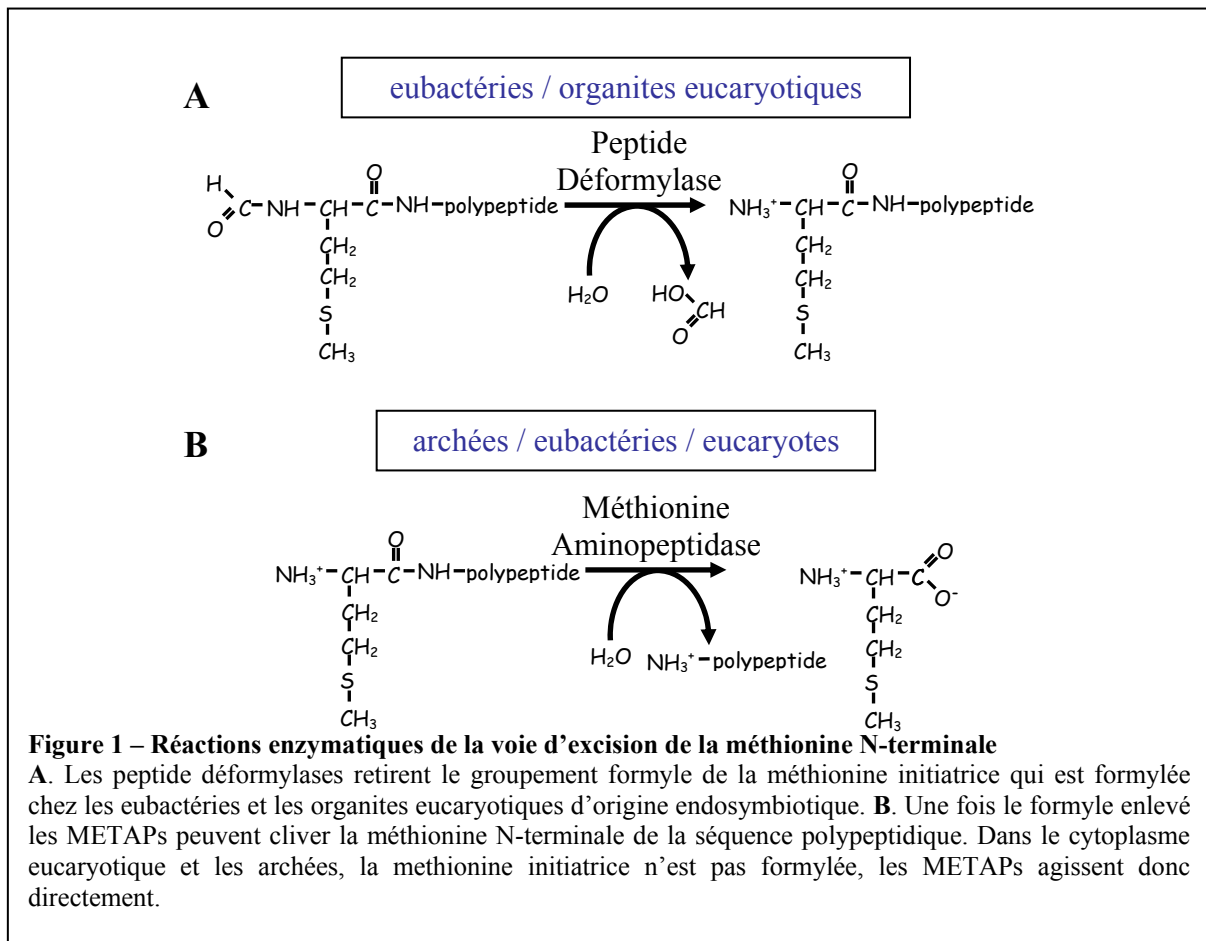
Les protéines sont synthétisées à partir des ARNs messagers. La traduction des ARNs messagers commence généralement par un codon AUG. Ce dernier est interprété comme une méthionine dans tous les codes génétiques décrits jusqu'à présent. Il existe d'autres codons qui peuvent être utilisés, notamment GUG, CUG et AUU et représentent environ 10% de tous les sites d'initiation de la traduction chez *E. coli*. Des codons d'initiation non-AUG ont aussi été découverts chez les eucaryotes. Néanmoins, il est admis que seul l'ARN de transfert d'initiation de la traduction ARNt^{Met} chez les eubactéries et ARNt^{Met} chez les autres organismes, peuvent être utilisés pour commencer la traduction. A l'exception de quelques très rares cas particuliers, le premier résidu incorporé dans les protéines naissantes est toujours la méthionine [29, 30, 31].

Bien que la méthionine soit le premier acide aminé d'une chaîne polypeptidique naissante, elle est ensuite très souvent absente de la protéine mature. En effet, selon l'organisme et le compartiment cellulaire considéré, entre 50 et 70% des protéines subissent la NME. Ce processus enzymatique est effectué en deux étapes chez les procaryotes et dans les organites d'origine endosymbiotique. En effet, la méthionine initiatrice est formylée. Ce groupement est retiré grâce aux **P**eptide **D**é**F**ormylases (PDFs) afin que les **M**ETHionine **A**mino**P**eptidases (METAPs) puissent cliver la méthionine initiatrice [32, 33]. Dans le cytoplasme eucaryotique ainsi que chez les archées où la méthionine initiatrice n'est pas formylée il n'y a que des METAPs (Fig. 1).

La NME est un processus ubiquitaire, elle est retrouvée dans tous les organismes vivants. Elle est présente dans tous les compartiments cellulaires où il y a une néo-synthèse de protéines : le cytoplasme, les mitochondries ainsi que les plastes. Le NME est un processus de maturation irréversible co-traductionnelle, qui a lieu avant que la chaîne polypeptidique soit complètement synthétisée [34]. La NME débute très tôt durant la traduction, dès que les premiers résidus émergent du tunnel de sortie du ribosome, avant l'initiation du repliement de la protéine [35, 36, 37]. Ces observations ont conduit à l'utilisation de courts peptides dans les expériences *in vitro* d'activités enzymatiques associées à la NME. Ces petits peptides étant considérés comme modèles de la chaîne polypeptidique naissante. De plus, pour beaucoup de

protéines matures, le N-terminus est inaccessible aux enzymes de la NME à cause du repliement protéique cachant la séquence N-terminale dans la structure, ou à cause de la localisation cellulaire finale de la protéine.

Les premières études sur la NME ont commencé dans les années 1960 et se sont intensifiées progressivement durant les 30 dernières années. Depuis environ 15 ans, le nombre de publications a explosé avec la découverte que la NME représente une excellente cible thérapeutique ainsi qu'avec l'essor de la génomique qui a permis de mieux étudier les acteurs de ce processus.

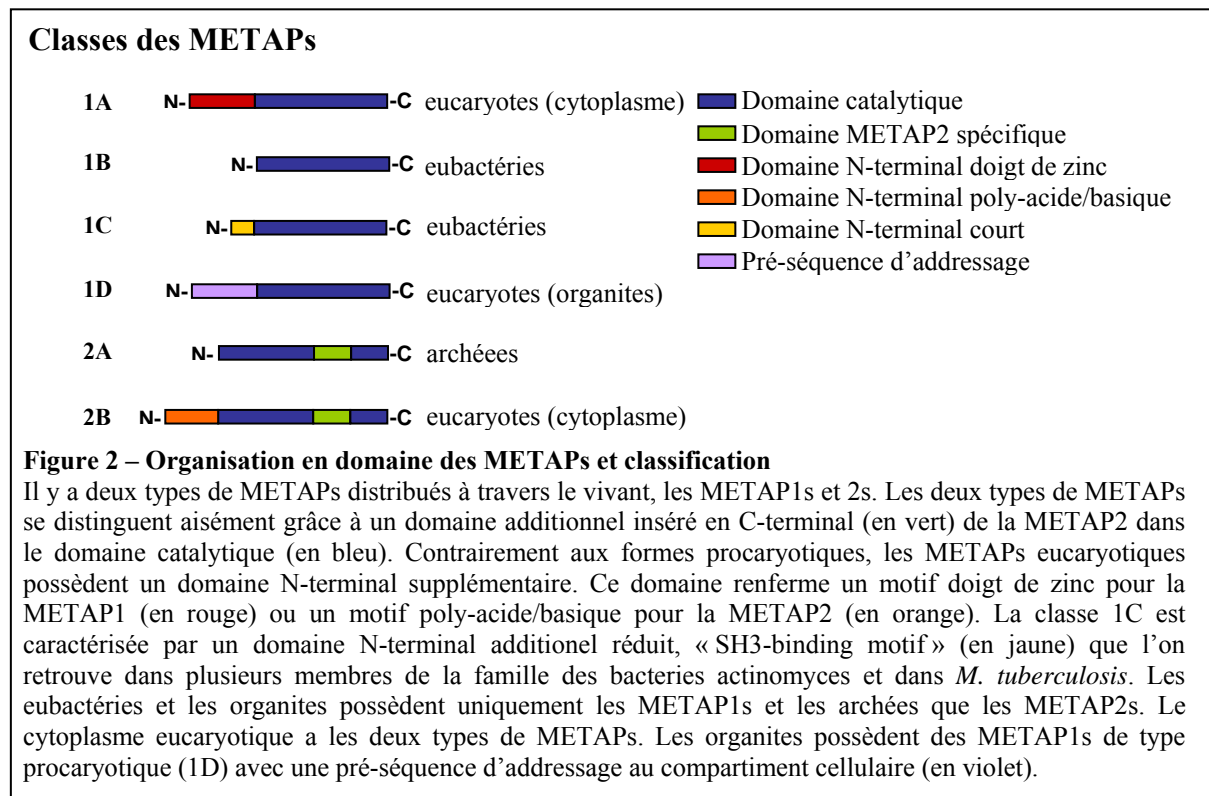


2. Les méthionine aminopeptidases

A. Organisation des METAPs

Les METAPs (IUBMB Enzyme Nomenclature : EC 3.4.11.18 ; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) sont évolutivement très proches des

créatinases, des aminopeptidases P et des proline dipeptidases [38]. Elles font parties du clan MG et de la famille M24 selon la classification des protéases MEROPS [39, 40]. A ce jour, deux types de METAPs ont été définis à partir de données structurales et d'alignements de séquences, les METAPs de type 1 et celles de type 2 [41, 21] (Fig. 2, 3 et 5). Les METAPs de types 1 et 2 sont ensuite sous-divisées selon la nature et la taille de leur séquence N-terminale supplémentaire (sous classes A, B, C et D).



Les structures tridimensionnelles des METAP1s d'*E. coli* [42, 43], de *S. aureus* [44], de *T. maritime* [45] et de *M. tuberculosis* ainsi que celles des METAP2s d'*H. sapiens* [46], de *P. furiosus* [47, 48, 49] et d'*E. cuniculi* [50] ont été résolues. Les deux types de METAPs ont une topologie très similaire bien que leurs séquences en acides aminés diffèrent considérablement (Fig. 3) comme en témoigne la faible valeur de l'écart moyen par rapport à la structure moyenne (rmsd=1,4 Å) obtenu sur un ensemble consécutif de 227 paires de carbone alpha des enzymes d'*E. coli* (METAP1) et *P. furiosus* (METAP2) [48]. La structure du site actif est très bien conservée et les résidus impliqués dans la liaison aux cations métalliques se chevauchent. Au sein du même type de METAP, le niveau d'identité de séquence est élevé [21, 51] (Fig. 4). Le domaine catalytique des METAPs montre un

repliement de type “pita-bread” avec deux plans de symétrie interne (Fig. 5). Il contient deux ions métalliques coordonnés par cinq résidus strictement conservés : deux glutamates (en position 379 et 475 dans la séquence d’*E. coli*), deux aspartates (en positions 258 et 269 dans la séquence d’*E. coli*), une histidine ainsi que deux molécules d’eau (en position 340 dans la séquence d’*E. coli*, voir aussi Fig. 3) [43].

Les eubactéries et les organites possèdent les METAPs de type 1 tandis que les archées contiennent le type 2. En revanche, le cytoplasme eucaryotique renferme les deux types de METAPs [24]. Contrairement aux METAPs de type 1, un domaine en hélice d’environ 60 acides aminés est inséré dans la partie C-terminale des METAP2s et permet de différencier aisément les deux types de METAPs. Ce domaine ne partage pas d’homologie de séquences ou de structures avec d’autres protéines connues. De plus, les METAPs eucaryotiques ont une extension N-terminale non retrouvée chez les enzymes procaryotiques sous-divisant les deux classes. Les enzymes ayant uniquement le domaine catalytique font parties des sous-classes 1B et 2A (par exemple *E. coli* METAP1 et *P. furiosus* METAP2). Celles possédant un domaine N-terminal d’environ 120 acides aminés appartiennent à la sous-classe 1A et 2B (par exemple *H. sapiens* METAP1 et METAP2). Enfin, les METAP1s ayant un domaine N-terminale d’environ 40 acides aminés font partie de la sous-classe 1C (par exemple *M. tuberculosis* METAP1C). Les METAPs de type 1B, 1C et 2A sont retrouvées chez les procaryotes tandis que les formes 1A, 1D et 2B sont chez les eucaryotes [38, 52, 41, 24, 53]. Les METAPs présentes dans les organites comportent une pré-séquence N-terminale adressant l’enzyme au bon compartiment cellulaire qui une fois clivée présente le domaine catalytique [54, 55] (Fig. 2, 3 et 5).

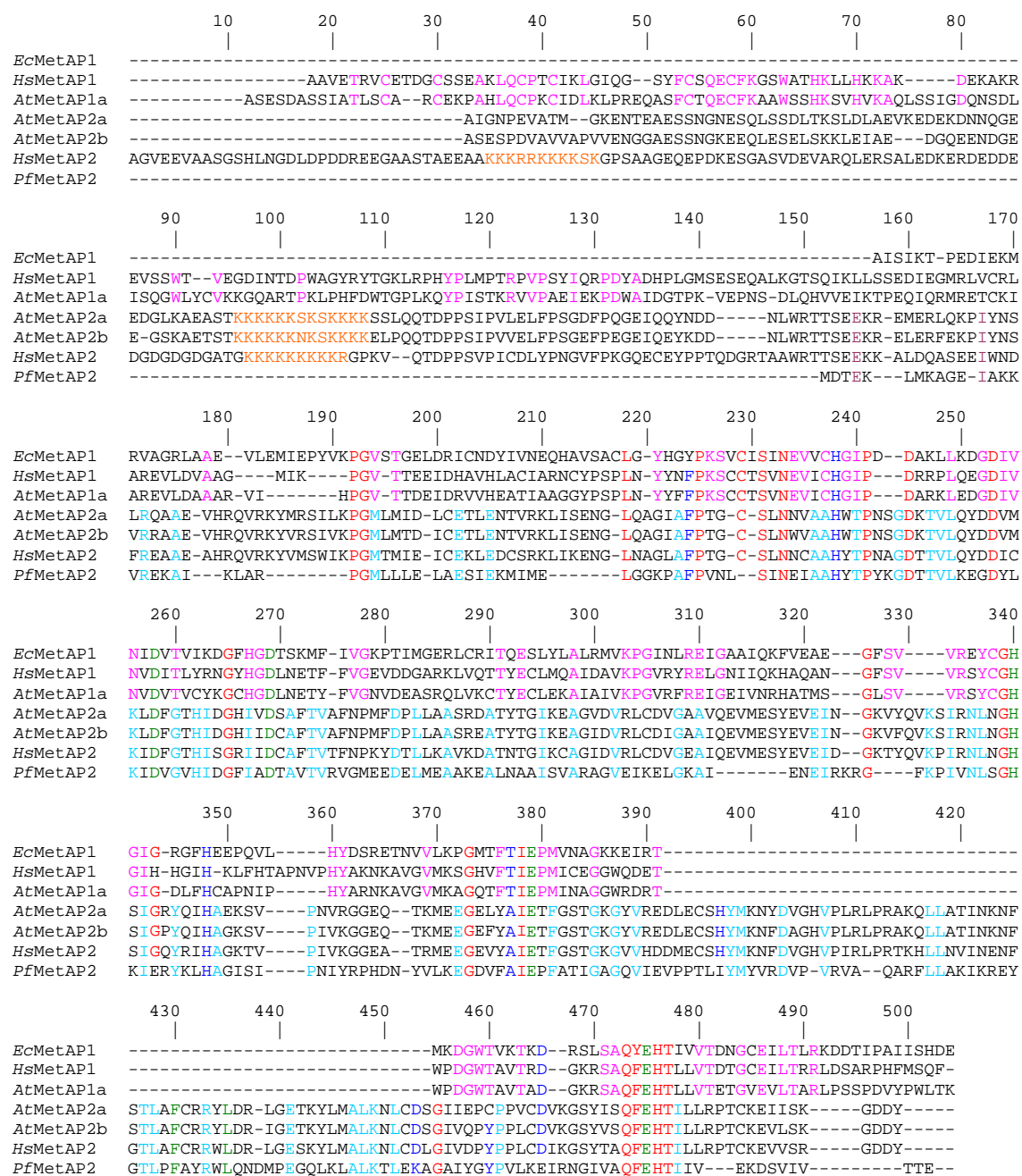


Figure 3 - Aligment de séquences de différents METAPs

Alignement de séquences des METAP1s d'*E. coli* (EcMETAP1), d'*H. sapiens* (HsMETAP1), d'*A. thaliana* (AtMETAP1A) et des METAP2s de *P. furiosus* (PfMETAP2), d'*A. thaliana* (AtMETAP2A et 2B) et d'*H. sapiens* (HsMETAP2). Les résidus impliqués dans la liaison aux cations métalliques sont indiqués en vert, ceux impliqués dans la reconnaissance de la fumagilline en bleu et les résidus strictement conservés dans cet alignement en rouge. Les résidus conservés à travers les METAP1s alignées sont indiqués en rose incluant les résidus du doigt de zinc en position N-terminale, en bleu clair les résidus conservés des METAP2s alignées. En orange, les domaines polybasiques sont indiqués. Les séquences ont été extraites à partir de la base de donnée UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

Identité (%)	<i>Ec</i> METAP1	<i>Hs</i> METAP1	<i>At</i> METAP1A	<i>Pf</i> METAP2	<i>Hs</i> METAP2	<i>At</i> METAP2A
<i>Hs</i> METAP1	31,1					
<i>At</i> METAP1A	29,5	55,0				
<i>Pf</i> METAP2	22,9	16,3	13,6			
<i>Hs</i> METAP2	10,5	17,7	14,9	24,6		
<i>At</i> METAP2A	13,7	14,5	12,9	25,3	58,9	
<i>At</i> METAP2B	13,6	14,9	10,9	24,7	60,5	83,3

Figure 4 – Identité de séquences de différentes METAPs

Pourcentage d'acides aminés identiques entre deux séquences de METAPs sur toute leur longueur. Les séquences alignées sont celles utilisées en figure 3. Le calcul du pourcentage a été réalisé après alignement automatique de deux séquences sur Clustalw (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html). Le code couleur représente le niveau d'identité de séquence, du jaune au rouge, du moins au plus identique.

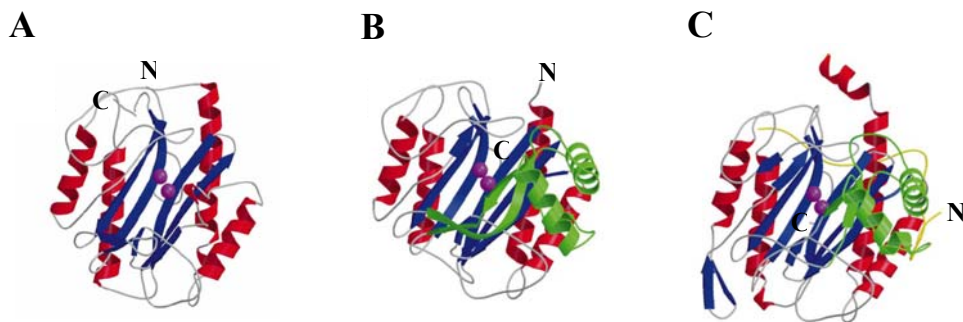


Figure 5 – Structure des deux types de METAPs

La structure en ruban de la METAP1 d'*E. coli* (A), de la METAP2 de *P. furiosus* (B) et de la METAP2 d'*H. sapiens* (C) est montrée. Le pseudo axe de symétrie du site actif est représenté par les hélices en rouge et par les brins en bleus. Le domaine additionnel caractéristique des METAP2s est montré en vert. Les cations métalliques du site actif sont montrés en violet. Les images des structures sont tirées de [Erreur ! Source

B. Les méthionine aminopeptidases dans leur environnement

L'une des grandes questions scientifiques actuelles est de comprendre les mécanismes co-traductionnels qui surviennent au voisinage du ribosome. En effet, le moment précis où la protéine en cours de synthèse émerge du tunnel de sortie du ribosome est un instant particulièrement critique, car la cellule doit faire des choix importants concernant le destin de cette protéine. De nombreux facteurs appelés « ribosome-associated protein biogenesis factors » ou facteurs RPB sont responsables de la prise en charge de cette protéine naissante. La régulation fine et précise dans le temps et l'espace de l'action de ces différents facteurs est

primordiale pour assurer la synthèse de protéines natives et actives [56, 19]. Pourtant, les règles spatio-temporelles qui régissent l'action de ces différents facteurs et qui semblent dépendre de la séquence N-terminale des protéines nouvellement synthétisées, restent une énigme.

Depuis longtemps, il est postulé que l'état non replié de la chaîne polypeptidique naissante facilite fortement l'accès aux différentes enzymes impliquées dans la maturation N-terminale des protéines. Aujourd'hui, de plus en plus d'études complémentaires appuient l'hypothèse de l'interaction des enzymes de la NME avec le ribosome et que ce processus est très dynamique [57].

Les METAPs du cytoplasme des eucaryotes présentent une extension N-terminale contrairement aux formes procaryotiques [38, 52] (Fig. 3). L'extension N-terminale des METAP1s inclue deux motifs en doigt de zinc. Des études menées sur l'enzyme de levure ont montré que ce domaine N-terminal est essentiel pour qu'elle puisse assurer sa fonction *in vivo* et il a été suggéré qu'il puisse être à l'origine de l'interaction de l'enzyme avec le ribosome [58]. Ce domaine en doigt de zinc de la METAP1 est également conservé chez les animaux [59] et les plantes [60]. L'enzyme METAP2 ne possède pas ce motif mais a deux séquences de poly-lysines et un motif riche en acides aspartiques pouvant jouer un même rôle d'interaction avec le ribosome [38]. Bien que les METAP1s des procaryotes ne possèdent pas d'extension N-terminale, il a été proposé que la présence d'une région riche en prolines (SH3-binding motif) de certaines METAP1s comme celle de *M. tuberculosis* pouvait favoriser l'association au ribosome. Cependant, ces motifs SH3 ne sont présents que dans une minorité de METAPs bactériennes [61].

Malgré ces dernières avancées, la dynamique des événements mis en place au niveau du tunnel de sortie du ribosome impliquant la METAP et plus généralement les enzymes de la NME reste peu comprise et demande donc à être largement étudiée.

C. La double fonctionnalité de la méthionine aminopeptidase 2 animale

Les gènes et ADNc des METAP2s ont été clonés à partir de cellules animales (lapin, rat et humain) et la phase ouverte de lecture a été initialement appelée p67, du nom de la glycoprotéine de 67 kDa qui s'associe au facteur d'initiation de la traduction eucaryote eIF2 [62, 63, 52, 64, 65, 66]. En effet, chez les animaux, la METAP2 est une protéine bi-

fonctionnelle. Son domaine N-terminal maintient la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction eIF2 dans une forme active en la protégeant de la phosphorylation [65]. Cette activité de protection d'eIF2 de la phosphorylation (POEP) est indépendante de l'activité NME.

L'extension N-terminale des METAP2s eucaryotiques n'est pas requise pour l'activité catalytique [67]. De plus, la structure de la METAP2 humaine révèle que ce domaine n'est pas structuré [46]. L'activité POEP est médiée par une séquence riche en lysine et un site de *O*-glycosylation chez la METAP2 animale [68, 69, 70]. Au moins un de ces deux domaines n'est pas retrouvé dans la METAP2 des plantes et des champignons, ce qui suggère que ces enzymes ne possèdent pas d'activité POEP.

D. Les méthionine aminopeptidases et la controverse sur la nature du métal catalytique

Les METAPs sont des metalloprotéases et à ce titre, leur activité est fortement inhibée par des agents chélateurs de métaux tels que l'EDTA. Plusieurs données ont suggéré que le cation métallique lié à l'enzyme *in vivo* pourrait être un cation ferreux Fe^{2+} pour la METAP1 de *E. coli* et un cation Mn^{2+} pour la METAP2 humaine. Pourtant, à l'heure actuelle la nature et le nombre de cations métalliques du centre actif restent encore très controversés. Très vite après sa caractérisation initiale, il a été montré que les METAPs sont fortement activées par deux ions cobalt par site actif. De plus, des études structurales ont révélé la présence de deux cations cobalt par polypeptide pour les deux types de METAPs [46, 42] suggérant que ce sont des enzymes di-nucléaires utilisant le cobalt. Une molécule d'eau lie les deux cations et agit comme nucléophile durant la catalyse [42]. Les METAPs peuvent être activées *in vitro* par différents cations métalliques divalents tels que Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} . La METAP peut également être active sous la forme mono-nucléaire [71, 72, 73]. De plus, des inhibiteurs metallo-spécifiques de différentes formes de METAPs ont été décrits [74]. C'est le cas notamment des inhibiteurs de type catéchol et thiazole [75, 76, 77, 78]. Malheureusement, beaucoup de ces inhibiteurs se sont montrés être efficaces sur les enzymes purifiées mais ils ont échoué *in vivo*. Il a été suggéré que la disparité du cation métallique utilisé pour activer la METAP purifiée et le métal réellement utilisé dans la cellule peut être la cause de cet échec et que la nature du cation métallique présent *in vivo* dans le site actif peut dépendre aussi des

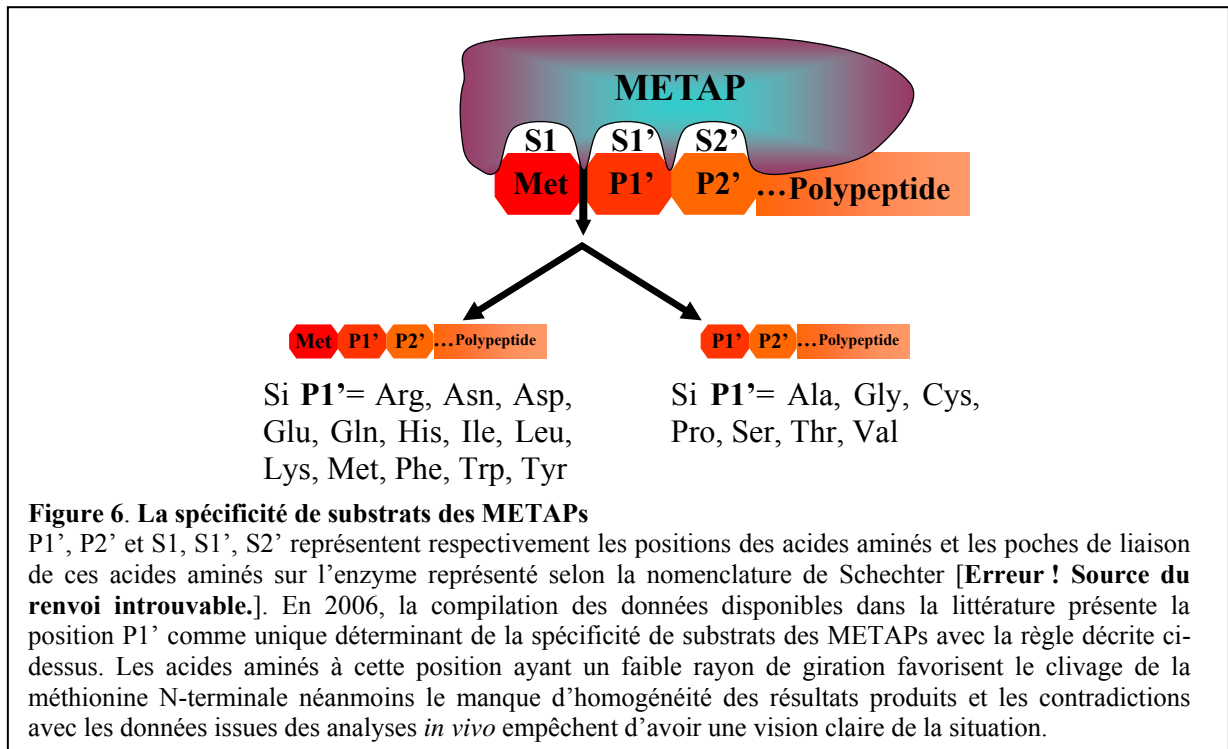
conditions physiologiques et de la disponibilité de ces ions dans la cellule.

E. La spécificité de substrats des méthionine aminopeptidases

Chez la levure, l'inactivation simultanée des deux gènes qui codent pour les METAPs est létale [52]. Cependant, l'absence de la METAP1 induit une forte diminution du taux de croissance des levures tandis que l'absence de la METAP2 ne l'affecte que très peu indiquant le rôle prépondérant de la METAP1 chez la levure [79, 80]. En outre, certaines cellules de mammifères sont sensibles à l'inhibition de la METAP2 suggérant un rôle plus important de la METAP2 dans ces cellules. Enfin, chez *A. thaliana*, l'inactivation simultanée des METAPs cytoplasmiques est également létale [81]. Les deux types de METAPs sont fonctionnellement interchangeables contrairement à celles des champignons et des animaux car l'absence d'un des deux types de METAPs n'induit pas de phénotypes visibles [82]. Par conséquent, l'importance relative des deux types de METAPs semble différente chez les plantes, les mammifères et les champignons.

La NME est reconnue pour être la source majeure de la diversité de l'acide aminé N-terminal des protéines. Dès 1985, plusieurs études ont montré que l'activité méthionine aminopeptidase est spécifique de peptides présentant une méthionine en position P1, selon la nomenclature de Schechter [83] (Fig. 6). Cette nomenclature nomme la position de la méthionine N-terminale P1, l'acide aminé suivant P1', puis P2' et ainsi de suite. De même, pour les METAPs, la poche de liaison de la méthionine N-terminale est nommée S1, la poche correspondant à l'acide aminé suivant S1' et ainsi de suite (Fig. 6). Il est admis depuis longtemps que le déterminant majeur de l'excision ou non de la méthionine initiatrice est le couple : poche S1' – position P1' [84, 85]. En effet, le clivage a lieu si la chaîne latérale du résidu suivant la méthionine initiatrice est peu encombrante: Gly, Cys, Pro, Ser, Thr et Val. Le clivage n'étant pas possible pour des acides aminés ayant une chaîne latérale plus imposante à cette position (Fig. 6). Cette « règle » qui a été établie par différentes approches *in vitro*, *in vivo* et *in silico* constitue notre connaissance actuelle sur la spécificité de substrats des METAPs [24]. Cependant, la lecture attentive des données publiées ne permet pas d'avoir une idée précise de la spécificité de substrats des METAPs étant donné l'hétérogénéité et le manque de standardisation des expériences réalisées. Beaucoup de questions restent sans réponse notamment l'influence des résidus P2', P3' ou plus éloignés de la méthionine N-

terminale. De plus, des analyses protéomiques ont apporté une vision plus globale et physiologique de la situation. La séquence N-terminale a été identifiée pour le produit de 862 ORFs d'*E. coli* [86, 87]. Cependant, la conclusion de ces analyses est contradictoire avec les premières observations. Par exemple, les auteurs ont rapporté qu'une glycine en position P1' diminue l'efficacité du clivage [86]. Par conséquent, il est aujourd'hui difficile d'avoir une vision précise et cohérente de la spécificité de substrats des METAPs lorsque que l'on compile les différentes analyses réalisées jusqu'à présent. La question d'une éventuelle différence de spécificité de substrats entre les deux types de METAPs et entre les différents organismes se pose. Ainsi, une meilleure compréhension de la spécificité de substrats des différentes METAPs pourra aider à réconcilier les données *in vitro* et *in vivo*.



III. Implications et applications thérapeutiques de l'excision de la méthionine N-terminale

1. L'excision de la méthionine N-terminale : une cible thérapeutique attractive

La connaissance des voies physiologiques et leurs régulations est un prérequis pour combattre efficacement les pathologies impliquant ces voies. La NME est une de ces voies physiologiques jouant un rôle important dans beaucoup de pathologies. Par conséquent, la NME est un mécanisme cellulaire d'intérêt croissant notamment dans la lutte contre le cancer ainsi que dans un grand nombre d'affections. En effet, de récentes découvertes ont ravivé l'intérêt de l'étude de cette voie en montrant qu'elle est la cible de composés ayant un effet anticellulaire et antitumorale.

Les METAPs sont des enzymes ubiquitaires et leur activité est essentielle à la survie cellulaire. La délétion génique ou l'inhibition de leur activité par des molécules inhibitrices est létale chez tous les organismes vivants. Les bactéries ont un seul gène codant une METAP, par conséquent c'est une cible prometteuse pour développer des antibiotiques ayant un mécanisme d'action nouveau ainsi qu'un spectre antibactérien large.

Les PDFs constituent également une cible attractive pour la conception de nouveaux antibactériens car ces enzymes ne sont pas retrouvées dans le cytoplasme eucaryotique et sont essentielles à la survie des bactéries. Mon étude se situant principalement au niveau du cytoplasme des eucaryotes supérieurs, la description de l'inhibition des PDFs ne sera donc pas réalisée (pour revue [88]).

2. La méthionine aminopeptidase 2 : une cible, plusieurs effets

A. Effet anticellulaire de l'inhibition de la méthionine aminopeptidase 2

La NME a fait l'objet de plus d'attention depuis la découverte que la METAP2 est la cible d'un composé naturel, la fumagilline et de ses dérivés ayant des vertus anticellulaires [89, 90]. En effet, la cible moléculaire de la fumagilline a été élucidée et identifiée comme étant la METAP2 en 1997 par deux groupes indépendants en utilisant notamment des analogues réactifs de la fumagilline [89, 90]. La fumagilline est un sesquiterpène contenant

deux groupements époxydes (Fig. 7B) qui a été isolé à partir du champignon *Aspergillus fumigatus*. Elle a été originellement découverte au début des années 1950 pour ses effets délétères sur les amibes [91]. De nombreux dérivés ont été synthétisés à partir de cette molécule telle que par exemple le TNP-470 (ou AGM-1470) [92], l'ovalicine [89] et le fumagalone [93] (Fig. 7B).

Depuis quinze ans, de nombreuses études ont montré que la prolifération des cellules endothéliales ainsi que celle de beaucoup de lignées cellulaires cancéreuses est inhibée par la fumagilline et ses dérivés [94]. Parmi ses dérivés synthétiques, le TNP-470 est efficace dans le traitement de tumeurs développées [95]. Ces observations et le fait que la METAP2 soit surexprimée dans beaucoup de tumeurs, suggèrent fortement que cette enzyme est une cible très prometteuse pour des thérapies anticancéreuses.

Le mode d'action de la fumagilline et de ses dérivés sur la METAP2 est bien décrit. En effet, des approches complémentaires et indépendantes ont permis d'identifier les résidus impliqués dans la liaison de ces molécules [96, 97]. Beaucoup de ces composés ont été étudiés en complexe avec la METAP2 par des approches cristallographiques. C'est le cas notamment de la fumagilline complexée à la METAP2 humaine. L'ensemble de ces études a montré que la fumagilline et ses dérivés se lient covalamment, spécifiquement et inactivent les METAP2s en alkylant un résidu histidine du site actif impliqué dans la liaison avec le métal (His231 pour la METAP2 humaine) [96, 97, 98]. La fumagilline et ses analogues n'ont pas d'effets physiologiques sur la METAP1 même si ils se lient également covalamment à l'enzyme mais avec une très faible affinité [99].

Le rôle de la METAP2 dans la progression tumorale n'est pas encore bien compris. En particulier, la cascade d'événements qui relie l'inhibition de l'activité METAP2 et l'arrêt de la prolifération cellulaire n'est actuellement pas connue. De même, les substrats de la METAP2 qui causent directement la réponse antiproliférative de ces composés sont inconnus. Différentes hypothèses ont été proposées : (i) la cinétique d'incorporation cellulaire ou de métabolisation de ces molécules est différente entre les cellules sensibles et résistantes et/ou (ii) la réponse à l'inhibition de la croissance est dépendante du type cellulaire et est déterminée par une protéine directement régulée par l'activité METAP2. Néanmoins, il a été montré que la fumagilline et le TNP-470 ont un effet antiprolifératif directement sur différentes lignées de cellules tumorales [100, 101, 102]. De même, différentes études ont rapporté que le TNP-470 et ses analogues inhibent la croissance tumorale ainsi que la

formation de métastases sur une grande variété de modèles tumoraux [103, 104, 101, 105]. En effet, le TNP-470 inhibe notamment la croissance des tumeurs primaires et métastatiques chez l'Homme et la souris notamment les neuroblastomes, glioblastomes, les neurofibrosarcomes, le cancer des ovaires, de la prostate, et les sarcomes de l'utérus et conduit également à la réduction de leur vascularisation [106, 107, 101, 108, 109, 110, 104, 111]. Ces inhibiteurs ont donc un spectre anticancéreux très large.

B. Méthionine aminopeptidase 2 et angiogenèse

L'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de la vascularisation existante, est un composant essentiel dans beaucoup de pathologies incluant la croissance tumorale, la rétinopathie diabétique, la dégénérescence maculaire, l'arthrite et l'inflammation. La prolifération de cellules endothéliales normales quiescentes est une étape critique requise pour l'angiogenèse. Par conséquent, les inhibiteurs de l'angiogenèse sont des agents thérapeutiques prometteurs pour un grand nombre d'affections [112, 113]. Beaucoup d'efforts ont été alloués au développement de traitements antiangiogéniques depuis que Judah Folkman a rapporté que la croissance tumorale et des métastases dépend de la croissance des vaisseaux sanguins [114, 115, 116]. En outre, les agents antiangiogéniques sont supposés être moins susceptibles aux mécanismes de résistances car la tumeur n'est pas la cible directe de la drogue. De plus, comme l'angiogenèse est réprimée dans beaucoup de processus à l'âge adulte excepté la reproduction, un agent antiangiogénique peut avoir des effets secondaires minimaux [115].

La fumagilline et ses dérivés ont une activité antiangiogénique *in vitro* ainsi que dans des modèles *in vivo* en arrêtant la prolifération des cellules endothéliales [95, 117, 118, 101, 119, 120, 105, 121, 122]. Ils font partie des inhibiteurs les plus efficaces de l'angiogenèse. Le TNP-470 a une activité antiangiogénique plus forte et moins d'effets secondaires que la fumagilline. De plus, ce composé représente l'une des premières molécules antiangiogéniques à avoir effectué un essai clinique [122]. Le TNP-470 et ses analogues ont montré une capacité à ralentir la progression tumorale et de causer une régression complète et durable [123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 105]. Pour accroître le caractère antiangiogénique de ces molécules, des molécules hybrides ont été synthétisées, c'est le cas des hybrides de 1-deoxynojirimycines et d'aryl-1,2,3-triazoles inhibant les α -glucosidases (autre cible

antiangiogénique bien connue) et les METAP2s respectivement [131] (Fig. 7B).

C. La méthionine aminopeptidase 2, cible pour le traitement de nombreuses affections

Les microsporidies, parasites eucaryotes intracellulaires obligatoires affectant les humains sont sensibles à la fumagilline [132]. En effet, le génome minimal de ces organismes représentés par *E. cuniculi* possède un gène codant une METAP2 et aucun pour une METAP1. Ces parasites sont responsables de différents syndromes chez des personnes immunodéprimées et la fumagilline est l'une des seules drogues actives contre ces parasites. Elle a également un effet antiprolifératif sur d'autres eucaryotes unicellulaires comme les amibes [133], les trypanosomes (causant la leishmaniose) et les sporozoaires [134] et peut donc être utilisée pour développer des molécules contre ces parasites.

De plus, il a été rapporté pour la première fois en 2002 que la fumagilline et le TNP-470 ont une activité antipaludique sur des cultures cellulaires [134]. Plus récemment, un dérivé de la fumagilline a été synthétisé, le fumarranol, ce composé possède une activité antimalariale *in vitro* et semble plus efficace que le TNP-470 [120]. Contrairement à la fumagilline, le fumarranol est un inhibiteur non covalent de la METAP2 humaine [135]. Il interagit avec la METAP2 de *P. falciparum* et est capable d'inhiber également la croissance des souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine (première génération de composés antimalarial) *in vitro* et *in vivo* [120]. Il y a quatre isoformes de METAPs chez *P. falciparum* : METAP1A, METAP1B, METAP1D et METAP2. Comme pour d'autres METAP1s les trois METAP1s de *P. falciparum* sont actives *in vitro* mais ne sont pas inhibées par le TNP-470 et le fumarranol à haute concentration. Ceci suggère que c'est l'inhibition de METAP2 qui est responsable de l'effet antimalarial de ces composés [120]. Ces données confirment que la METAP2 de *P. falciparum* est une cible viable pour le développement de nouveaux agents antimalariales. Néanmoins, comme pour les cellules de mammifères sensibles aux inhibiteurs des METAP2s, il reste à comprendre pourquoi nous observons cet effet anticellulaire alors même que des METAP1s sont encore présentes et actives.

En outre, les affections dépendantes de l'angiogenèse telles que la rétinopathie diabétique, la dégénérescence musculaire et l'arthrite peuvent être combattues en utilisant les inhibiteurs des METAP2s car beaucoup ont montré une activité antiangiogénique (voir chapitre III.2.B.). Récemment, la fumagilline a été testée en tant que molécule antiobésité car

l'angiogenèse est un processus largement impliqué dans cette pathologie. Néanmoins les premiers résultats décrits semblent contradictoires. En effet, tandis qu'*in vitro* la différenciation des préadipocytes est stimulée et les tissus adipeux sont affectés par l'application de fumagilline, *in vivo*, un effet marginal de la fumagilline est constaté sur les préadipocytes, la taille et la densité des vaisseaux sanguins ne semblent pas affectées bien que la fumagilline soit un composé antiangiogénique reconnu [136]. De plus, il a été montré que l'abolition de l'activité de la METAP2 inhibe la production d'anticorps dans des tests *in vitro* sur des cellules de types B en bloquant la différenciation de ces cellules. Chez un modèle *in vivo*, il a été constaté que l'inhibition de l'activité de la METAP2 provoque un blocage de la production d'anticorps dépendante des cellules T et la déplétion en cellules de type B au niveau du centre germinale [137].

D. Les inhibiteurs des méthionines aminopeptidases 2 toujours en développement

La fumagilline et ses nombreux dérivés synthétiques ont engendré beaucoup d'espoirs dans le champ thérapeutique car cette classe d'inhibiteurs a démontré une activité antitumorale très vite après sa caractérisation initiale (voir chapitre III.2.). Malgré tout, les essais avec cette première génération de composants ont été arrêtés durant les tests cliniques à cause de leur neurotoxicité à la concentration nécessaire pour observer la régression tumorale. De plus, la demi-vie extrêmement courte du TNP-470 dans le plasma sanguin (6 min) impose une administration lourde et fréquente lors des traitements [123, 122]. Ces molécules provoquent d'autres effets secondaires tels que la diminution de la concentration, des pertes de mémoires, confusion et dépression [123, 138].

Cependant, l'élimination des symptômes neurologiques a été obtenue grâce à des polymères couplés au TNP-470 bloquant le passage de la barrière sang-cerveau. C'est le cas de la Caplostatine, formulée pour l'injection [139]. Plus récemment une forme bio-disponible oralement a été mise au point (Lodamine). Cette molécule correspond au TNP-470 conjugué à du polyéthylène glycol et forme des micelles nanopolymériques. La Lodamine s'accumule dans les tumeurs et inhibe la croissance tumorale et l'angiogenèse sans causer de problèmes neurologiques chez la souris. De plus, en passant par le foie, la Lodamine prévient l'apparition de métastases [105] (Fig. 7B). En outre, pour améliorer le comportement pharmacocinétique de la fumagilline, une version $\alpha_v\beta_3$ -targeted de la fumagilline a été créée et

cible spécifiquement les cellules endothéliales grâce à un ligand de l' $\alpha_v\beta_3$ -intégrine présent dans la nanoparticule. Cette glycoprotéine transmembranaire est exprimée dans beaucoup de types cellulaires différents incluant les cellules endothéliales, néanmoins, les contraintes stériques de la nanoparticule dans le système vasculaire rendent le ciblage spécifique des cellules endothéliales. Cette nanoparticule inhibe la croissance des adénocarcinomes *in vivo* [130].

D'autres composés ont été synthétisés sur la base de la structure de la fumagilline en substituant différents groupements du spiroepoxyde cyclohexane. C'est le cas du PPI-2458, qui est bio-disponible oralement et inhibe *in vitro* la prolifération des lignées endothéliales HUVECs et BAECs (cellules endothéliales d'aorte bovine) avec des concentrations sub-nanomolaires. Il présente un profil pharmacocinétique amélioré par rapport à la première génération de molécules et est entré en phase I des essais cliniques pour le traitement des lymphomes non Hodgkinien et de tumeurs cancéreuses. [121]. Le PPI-2458 est également efficace pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde [140]. D'autres analogues de la fumagilline ont été conçus, c'est le cas du fumarranol qui a été développé pour lutter contre la malaria et montre également une activité antiangiogénique [120].

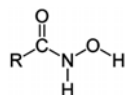
D'autres inhibiteurs des METAP2s ont été recherchés. En utilisant les techniques de criblage à grande échelle et de conception rationnelle, le composé A-357300 a été identifié comme un nouvel inhibiteur des METAP2s à fixation réversible ; ce composé fait partie de la famille des bestatines [100], une famille de composés connue depuis longtemps pour son activité contre les différents types d'aminopeptidases. Les premiers résultats semblent indiquer une suppression de la croissance tumorale sans la toxicité observée avec le TNP-470 [141, 100].

La famille des acides anthraniliques sulfonamides représentée par le A-800141 (Fig. 7B) est hautement spécifique des METAP2s. Cette molécule bio-disponible oralement montre également un effet antiangiogénique ainsi qu'un spectre d'activité anticancéreux large : lymphomes de type B, neuroblastomes et les carcinomes de la prostate et du colon. De plus une corrélation entre l'inhibition de la METAP2 *in vivo* et l'effet antitumoral a été rapportée [142, 143].

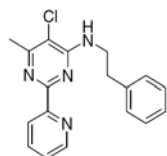
Les bengamides (Fig. 7C), produits par les éponges marines, inhibent également la prolifération des cellules tumorales. Des analyses protéomiques ont montré que les bengamides se lient et inhibent spécifiquement les METAP1s et METAP2s humaines. Les

bengamides, représentés par le composé LAF-389, ont montré une efficacité anticancéreuse sur différents modèles animaux en tests précliniques. Bien qu'ils ne soient pas spécifiques du type 2 des METAPs, ils produisent le même effet que la fumagilline et montrent une selectivité cellulaire similaire [144, 145, 146].

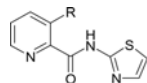
A



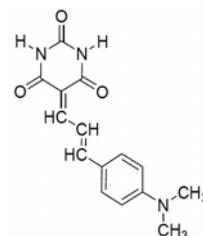
Acide hydroxamique



Dérivé 2-pyridyl-pyrimidine

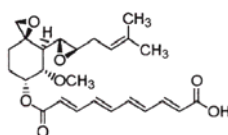


Dérivé de pyridine 2-carboxylique

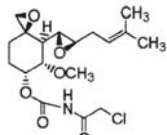


Dérivé barbiturate

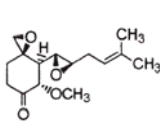
B



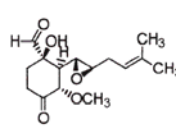
Fumagilline



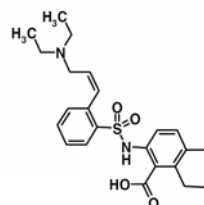
TNP-470



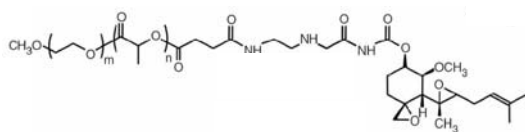
Ovalicine



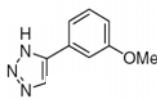
Fumagalone



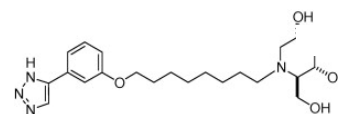
A-800141



Lodamine

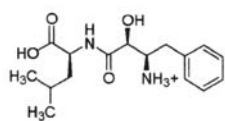


aryl-1,2,3-triazole

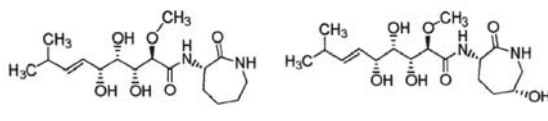


Hybride de 1-deoxyojirimycine et aryl-1,2,3-triazole

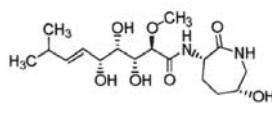
C



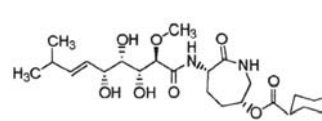
Bestatine



Bengamide E



LAF153



LAF389

Figure 7 – Inhibiteurs des METAPs

A. Inhibiteurs des METAP1s, la formule générale d'un acide hydroxamique est donnée. Un dérivé de chaque classe des molécules est montré pour les 2-pyridyl-pyrimidines, les pyridines 2-carboxylique et les barbiturates. **B.** Inhibiteurs de METAP2s, la fumagilline et certains de ses dérivés sont montrés. L'aryl-1,2,3-triazole est montré ainsi que la molécule hybride qui a été développée avec. Le représentant des acides anthraniliques sulfonamides, A-800141 est montré. **C.** Inhibiteurs des deux types de METAPs, la bestatine, inhibiteur peu efficace des aminopeptidases est montré. La famille des bengamides est également représentée (Bengamide E, LAF153 et LAF389).

3. La méthionine aminopeptidase 1, une cible émergente

Les méthionine aminopeptidases de type 1 représentent une cible prometteuse pour le développement de nouveaux antibactériens, antifongiques et anticancéreux. Pourtant, en comparaison à la METAP2, il existe peu d'inhibiteurs des METAP1s et ces METAPs sont également moins étudiées alors que leur activité est essentielle à la survie des eubactéries.

Depuis longtemps les acides hydroxamiques (Fig. 7A) sont connus pour être des inhibiteurs compétitifs de la METAP1 humaine, cependant, ils sont peu efficaces [147].

Des dérivés d'acides pyridines carboxyliques (Fig. 7A) ont été décrits comme inhibant la METAP1 d'*E. coli* et de *S. cerevisiae* efficacement [148, 149]. Cette famille d'inhibiteurs est 100 fois plus sélective pour la METAP1 que pour la METAP2 [150]. Cette propriété indique que ces dérivés pourraient être utilisés pour la conception de nouveaux antibiotiques, les bactéries exprimant seulement la METAP1. Par ailleurs, ils inhibent également la prolifération de lignées cellulaires tumorales [150].

En outre, les dérivés catéchols couplés avec un thiazole ou un thiophène montrent une forte efficacité et sont sélectifs pour la METAP1 d'*E. coli* ayant un centre dinucléaire ferreux. Une activité antibactérienne a également été observée. La structure de l'enzyme d'*E. coli* en complexe avec un de ces inhibiteurs a confirmé l'interaction directe entre l'inhibiteur et la METAP au niveau de son site actif [77, 78].

Plus récemment, la famille des pyridinyles pyrimidines (Fig. 7A) a été découverte grâce à un criblage haut débit [151]. Elle inhibe l'activité de la METAP1D de *P. falciparum* et montre une activité antiplasmodiale [151, 152]. Ces inhibiteurs arrêtent le développement du parasite dans les expériences *in vitro*. Il a également été constaté une activité *in vivo* sur deux modèles de paludisme chez la souris. Ces composés étant efficaces sur les souches de *P. falciparum* sensibles et résistantes à la chloroquine, ils sont donc très intéressants dans la lutte contre ces affections [151]. De plus, ils possèdent une activité antileishmaniale [152].

Une autre classe d'inhibiteurs sélectifs des METAP1s a été découverte. Il s'agit des dérivés de barbiturates (Fig. 7A). Ils sont efficaces *in vitro* pour inhiber la METAP1 humaine et pourront donc être développés pour des applications contre le cancer [153].

Des analyses de transcripts ont indiqué que les deux METAP1s de *M. tuberculosis* sont différenciellement exprimées durant les phases de croissance suggérant que ces deux METAPs peuvent avoir des rôles différents. Ces différences peuvent être exploitées pour de

futures applications thérapeutiques [154]. De plus, les dérivés catéchols inhibent *in vitro* la METAP1C de *M. tuberculosis* [75, 155].

4. Effets physiologiques de la diminution de l'excision de la méthionine N-terminale

Les effets visibles de l'application de la fumagilline ou de ses dérivés sur différentes lignées cellulaires ou sur différentes tumeurs sont désormais bien décrits. De même, la cible moléculaire de ces composés est identifiée formellement comme étant la METAP2 même si ils se lient également covalamment à la METAP1 mais avec une très faible affinité [99]. Néanmoins, cela n'a pas d'effets physiologiques comme montré par le mutant nul de la METAP2 de levure qui n'est pas sensible à la fumagilline [79]. De plus, la fumagilline inhibe spécifiquement l'activité NME des METAP2s sans altérer la fonction POEP [89]. Cependant, la cascade d'évènements qu'il y a entre l'inhibition de l'activité enzymatique des METAPs et les effets antiangiogéniques et anticellulaires observés reste largement incomprise. En outre, la sélectivité de ces molécules pour certaines lignées cellulaires de mammifères reste largement énigmatique.

L'effet anticellulaire des inhibiteurs des METAP2s étant spécifique de certaines lignées cellulaires, une des hypothèses pour expliquer ce phénomène est une régulation différentielle des METAPs dans les différentes lignées et conditions de culture. Il semblerait que le traitement des HMVECs (cellules endothéliales humaines microvasculaires) avec de la fumagilline induit un triplement de la quantité de METAP2 dans la cellule tandis que la quantité de protéines METAP1 semble rester constante [156]. Néanmoins, une surexpression similaire de la METAP2 exposée à la fumagilline a aussi été observée dans des types cellulaires non endothéliaux et insensibles à cette molécule [156]. Ces données contradictoires ne permettent pas à l'heure actuelle de clarifier l'impact et le lien entre sur-expression des METAP2s et sélectivité cellulaire de la fumagilline.

A. La fonction POEP de la méthionine aminopeptidase 2 animale en question

La réduction de la quantité de METAP2s avec des ARNs antisens dans les cellules d'hépatomes de rat supprime la synthèse protéique, augmente la phosphorylation d'eIF2 α et induit l'apoptose [157]. Il a également été montré que la diminution de la quantité de

METAP2 provoque l'apoptose à travers la diminution de l'expression de *Bcl-2* (un gène antiapoptotique) et la réduction de l'activité télomérase dans les cellules humaines de mésothéliome [158]. De même, la déplétion par des ARNs interférents de la METAP2 provoque l'inhibition de la prolifération des HUVECs [159, 160]. La délétion ubiquitaire des METAP2s engendre un défaut de gastrulation et sa délétion ciblée dans les lignées hémangioblastes induit un développement vasculaire anormal et est létale au stade « midsomite » [160]. Ces différents phénotypes sont la résultante de la diminution de la NME et de la fonction POEP. Cette activité de protection de phosphorylation maintient dans une forme active la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 [65]. Une diminution de l'expression de la METAP2 provoque une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α et par conséquent son inhibition, ce qui induit une diminution de la synthèse protéique amenant à la mort cellulaire. Ainsi, ces expériences affectant le niveau d'expression de la METAP2 ne permettent pas de savoir si les effets observés sont dus au manque (i) d'activité POEP, (ii) d'activité NME ou (iii) des deux. Clairement, des expériences sont aujourd'hui nécessaires pour mieux comprendre le rôle de l'activité POEP. De plus, des études où l'activité POEP n'est pas affectée sont requises pour comprendre le rôle de la NME dans ces cellules. Actuellement, le meilleur moyen d'y parvenir est l'utilisation d'inhibiteurs tels que la fumagilline. En effet, même s'il reste des interrogations sur l'effet de ces molécules sur l'activité POEP, il a été montré que les METAP2s inactivées covalamment par le TNP-470 sont toujours capables de stabiliser eIF2 α [89].

B. Diminution de l'activité méthionine aminopeptidase et conséquences physiologiques sur le cycle cellulaire

Dès 1994, il a été constaté sur différentes lignées cellulaires que la fumagilline et le TNP-470 bloquent le cycle cellulaire en fin de phase G1 [161, 117]. Les marqueurs du début de cette phase - notamment le profil de phosphorylation des tyrosines de protéines cellulaires et l'expression des gènes *c-fos* - ne sont pas affectés par ces composés. En revanche, ils inhibent l'activation de la kinase dépendante de la cycline 2 (CdK2) et conséquemment la phosphorylation de la protéine Rb (un produit de gène suppresseur de rétinoblastome), qui sont des marqueurs de la fin de la phase G1 et nécessaires pour la progression du cycle vers la phase S [161] (Fig. 8A).

Les CdKs permettent la progression du cycle cellulaire et nécessitent une cycline pour être activée en formant des complexes. Ces deux composants essentiels du cycle cellulaire sont finement régulés à différents moments clés du cycle. Une des régulations des CdKs repose sur les inhibiteurs de CdKs ou CdKis. En 2000, deux groupes ont montré indépendamment que l'application de TNP-470 sur des cellules endothéliales provoque l'accumulation du CdKi p21. Ce dernier inhibe l'activation du complexe cycline E - CdK2 corrélant ainsi avec l'inhibition dose spécifique de la croissance des cellules endothéliales. Une élévation de la quantité de p53 a également été constatée, il s'agit d'un activateur transcriptionnel de p21. Par conséquent, le blocage en fin de phase G1 semble être réalisé par p53 qui provoque l'accumulation de p21 ce qui inhibe le complexe cycline E - CdK2, arrêtant le cycle cellulaire. Ces découvertes ont été consolidées par d'autres expériences *in vivo* avec des mutants nuls de p21 chez la souris. En effet, les souris portant une délétion du gène codant p21 sont très peu sensibles à l'activité antiangiogénique du TNP-470. Des expériences similaires réalisées *in vitro* sur des lignées cellulaires ont confirmé ces résultats [162, 163] (Fig. 8A). Ainsi, il a été démontré que p53 et p21 sont tous deux nécessaires pour l'effet antiprolifératif du TNP-470. Néanmoins, les cellules déficientes en p53 sont toujours un peu sensibles au TNP-470 ce qui suggère que d'autres voies sont impliquées dans l'effet antiprolifératif du TNP-470.

Par conséquent, il a été proposé que l'effet des inhibiteurs des METAP2s ne se manifeste pas uniquement sur la voie contrôlée par p53. Il a été suggéré que les cellules ayant p53 comme modulateur du cycle cellulaire sont sensibles aux inhibiteurs des METAP2s en comparaison aux lignées cellulaires n'utilisant pas ou très peu cette voie. Dans beaucoup de cellules tumorales, le gène codant p53 porte une mutation ce qui peut expliquer la résistance de certaines lignées tumorales à l'inhibition de la METAP2 [164]. Pourtant, la sensibilité de certaines cellules tumorales ne semble pas corrélér ni avec leur niveau d'expression de p53 ou version allélique de p53 ni avec leur sensibilité aux inhibiteurs des METAP2s. Par exemple, les cellules tumorales MCF7 (lignée cellulaire de carcinome canalaire invasif du cerveau) ont l'allèle sauvage de p53 et sont insensibles à l'inhibition de l'activité METAP2. De plus, la prolifération des cellules dont l'expression de p53 est abolie (HCT-15 et DLD1, deux lignées cellulaires de cancer du colon) est inhibée par la fumagilline [100]. Une lignée cellulaire de cancer de la prostate délétée pour p53 est insensible au TNP-470 en culture en monocouche tandis qu'elle y est sensible en culture sur milieu agar, ce qui souligne l'influence majeure des

conditions de cultures [165] (Fig. 8A).

En utilisant le PPI-2458 sur les lignées HUVECs et HFLS-RAs (lignée d'étude de l'arthrite rhumatoïde), il a été montré une sous-expression de PCNA (antigène nucléaire de la prolifération cellulaire), proportionnelle au niveau d'inhibition de METAP2 suggérant un rôle de PCNA dans l'effet de l'inhibition de la METAP2 [140]. Cette protéine est impliquée dans la réplication de l'ADN car il s'agit du facteur de processivité de l'ADN polymérase. Le CdKi p21 est capable de s'associer au PCNA [166]. La quantité de p21 est également augmentée dans une lignée cellulaire modèle de mélanome traité avec le PPI-2458 [167].

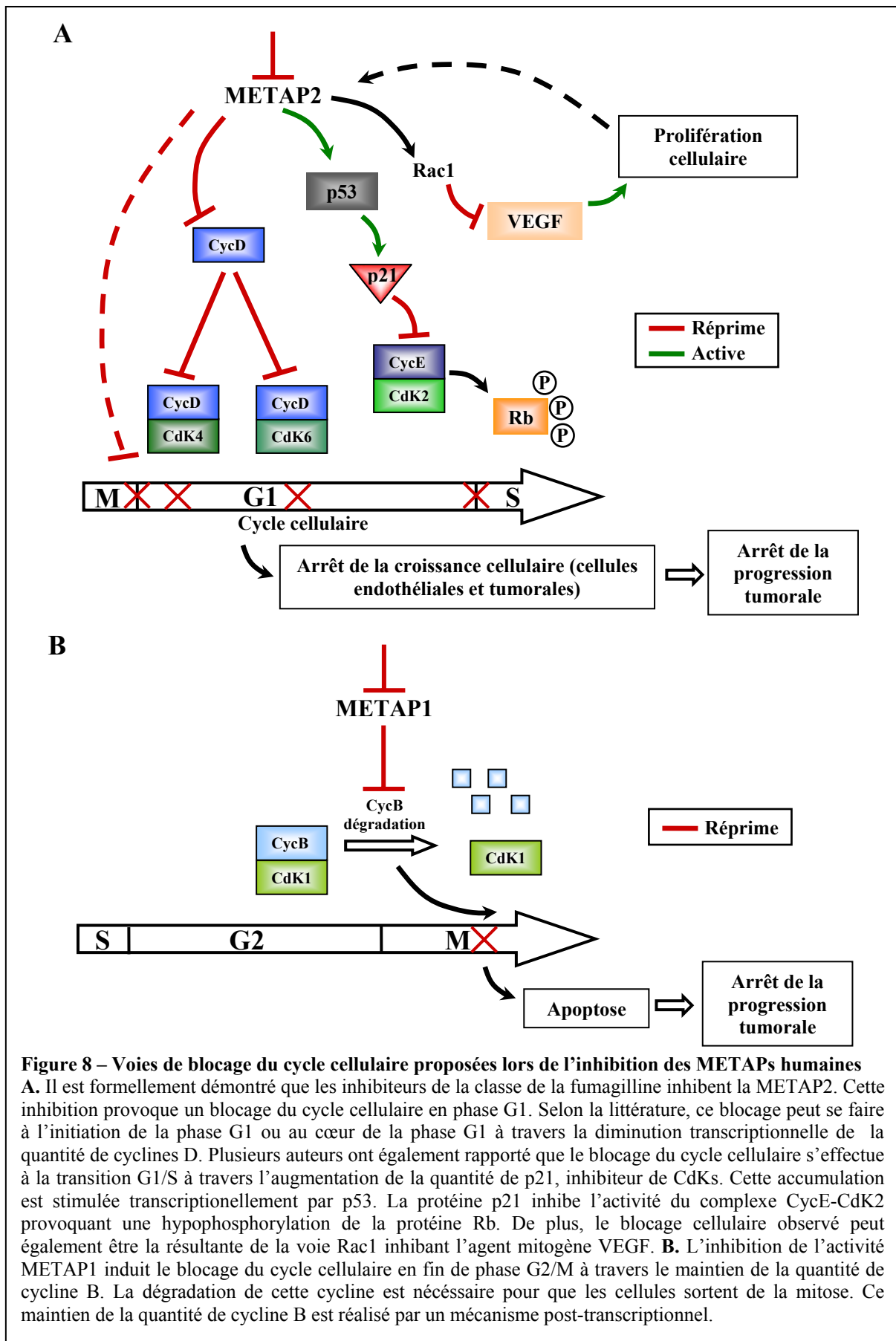
Il a été également montré que l'inhibition de la METAP2 bloque l'activation du complexe cycline E - CdK2 de cellules vasculaires musculaires stimulées avec différents facteurs de croissance [168]. Cependant, un autre groupe a suggéré que l'inhibition de la METAP2 induit un arrêt du cycle cellulaire *via* la réduction de l'expression de cyclines D [169]. Dans ce contexte, l'hyperphosphorylation des protéines Rb et l'activité cycline E - CdK2 sont également inhibées par le TNP-470 en accord avec les études précédentes [169, 161] (Fig. 8A).

En outre, dans une lignée de cellules de sarcome hépatique, le TNP-470 inhibe l'expression des cyclines D1, D2 et E en présence ou en absence de facteurs de croissances. Le TNP-470 supprime également l'activation de ces cellules de sarcome. Ainsi, ce blocage cellulaire en G1 et l'abolition de l'activation inhibe la progression de la fibrose hépatique [170]. Le TNP-470 induit la diminution de la quantité de cyclines D dans les tumeurs [171]. L'augmentation du niveau de cette cycline permet la progression du cycle cellulaire [172]. Ainsi, il a été rapporté que l'arrêt de la prolifération cellulaire passe par la diminution de la quantité de cycline D [131] (Fig. 8A). Enfin, une étude a rapporté que l'inhibition de la METAP2 empêche les cellules endothéliales de rentrer en phase G1 [173] (Fig. 8A).

Pour le moment, les données sur l'effet de l'inhibition de l'activité de la METAP2 sur le cycle cellulaire ne semblent pas converger vers un modèle d'action très clair. En effet, certains suggèrent que l'inhibition de l'activité METAP2 induit un blocage du cycle cellulaire en phase G1 *via* l'inhibition de l'expression de cyclines D [169, 117, 174] tandis que d'autres ont indiqué que l'inhibition de l'activité METAP2 induit un arrêt en fin de phase G1 par d'autres voies moléculaires [161] telles que celles impliquant le complexe cyclines E-CdK2.

Récemment, la METAP1 humaine a été impliquée dans le contrôle de la progression

du cycle cellulaire lors de la transition G2/M. La dégradation de la cycline B est une étape requise pour sortir de la mitose. L'inhibition de l'activité de la METAP1 induit le maintien de la quantité de cycline B par un mécanisme post-transcriptionnel. De plus, des inhibiteurs spécifiques des METAP1s sont capables d'induire l'apoptose dans des cellules leucémiques probablement en conséquence de l'arrêt du cycle cellulaire [150] (Fig. 8B).



C. Diminution de l'activité méthionine aminopeptidase et autres conséquences physiologiques

L'inhibition sélective de la METAP1 conduit à l'arrêt de la division cellulaire et induit l'apoptose dans les cellules leucémiques [150]. Néanmoins, l'apoptose n'a pas été systématiquement observée [100], ce qui signifie que d'autres éléments encore non formellement identifiés entrent en jeu, comme le type cellulaire et les conditions expérimentales. Par conséquent, de plus amples investigations sont nécessaires pour bien comprendre les acteurs responsables de ces observations.

L'utilisation de la fumagilline ou du TNP-470, qui bloquent uniquement l'activité NME des METAP2s, a un effet cytostatique sur certaines lignées cellulaires de mammifères [100]. Il a également été montré que ces inhibiteurs, appliqués à plus fortes doses peuvent avoir un effet cytotoxique. Cet effet biphasique de l'inhibition de l'activité METAP2 sur les HUVECs a également été observé [117]. Plusieurs groupes ont observé une induction de l'apoptose dans des cellules tumorales et des cellules vasculaires endothéliales lors de l'inhibition de la METAP2 [175, 176].

De plus, il a été montré que la fumagilline induit l'apoptose à travers des dommages mitochondriaux dans les cellules malignes de mésothéliome mais que les lignées de cellules mesothéliales primaires ne subissent pas l'apoptose suggérant encore une fois qu'il y a plusieurs voies de réponse à l'inhibition de la METAP2 selon les conditions cellulaires. Il a été observé que la quantité de protéines codées par le gène antiapoptotique Bcl2 ainsi que l'activité télomérase sont réduites lors du traitement à la fumagilline [158]. Le produit du gène Bcl2 maintient l'intégrité de la mitochondrie en régulant l'ouverture des pores transitoires et contrôlant ainsi le relargage dans le cytoplasme de composés tels que les activateurs de caspases [177] (Fig. 9).

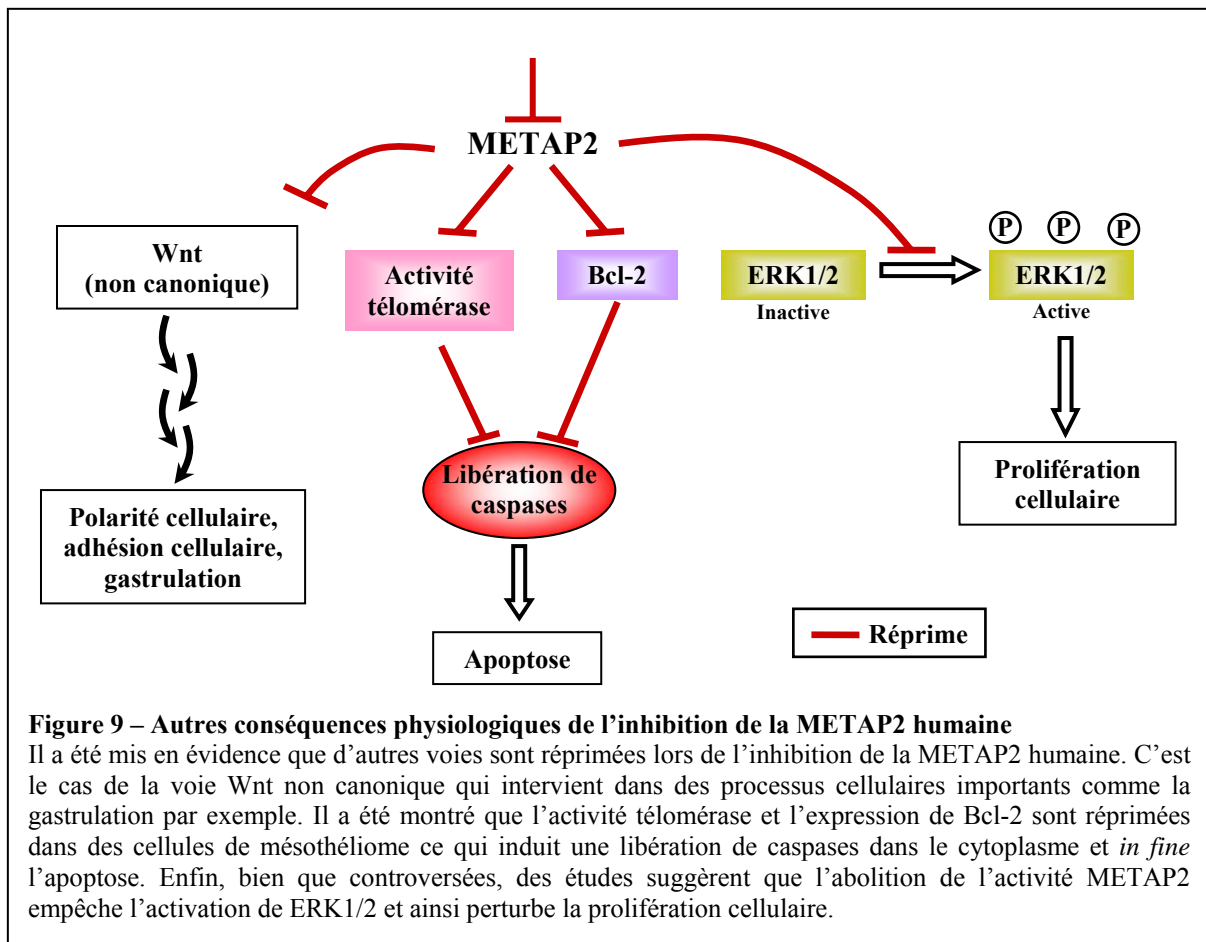
En outre, la phosphorylation de ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) a lieu durant la prolifération cellulaire [178] et la réduction de cette phosphorylation est constamment associée à la diminution de la prolifération des cellules. Ces protéines font parties de la famille des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein kinase). Il a été rapporté que la fumagilline augmente l'affinité de la METAP2 avec ERK1/2 et provoque ainsi l'inhibition de cette phosphorylation dans des myoblastes [179] ce qui peut expliquer l'effet antiprolifératif de la fumagilline. Cependant, en utilisant une autre classe d'inhibiteurs des METAP2s, l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 n'a pas été retrouvée [131]. De

même, cela n'a pas été retrouvé dans les fibroblastes de poumons de rats [180] (Fig. 9).

Le TNP-470 empêche l'adhésion des cellules endothéliales entre elles initiée par le VEGF, la formation de replis membranaires et le réarrangement du cytosquelette en inhibant l'activation de Rac1 qui est un membre de la famille Rho des GTPases [101]. Il semble également que le TNP-470 réduise la perméabilité des vaisseaux sanguins tumoraux [139]. En outre, il a été observé que la concentration en VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) dans le milieu de culture de cellules de fibrosarcomes traitées avec le TNP-470 est diminuée par rapport au contrôle indiquant que le TNP-470 réprime la sécrétion du VEGF. Cette découverte suggère fortement que le TNP-470 inhibe également l'angiogenèse par le truchement de la répression de la sécrétion de VEGF et que conséquemment, la suppression de l'angiogenèse inhibe la tumorigenèse [181] (Fig. 9).

Par ailleurs, le TNP-470 bloque sélectivement une des voies impliquant la protéine Wnt. Il s'agit d'une famille de glycoprotéines riches en cystéines sécrétées dans le milieu extracellulaire. Wnt joue un rôle important chez tous les animaux dans l'embryogenèse et la morphogenèse. Les voies impliquant Wnt ont un rôle critique également dans beaucoup d'autres processus incluant développement, différenciation cellulaire et tumorigenèse [182] (Fig. 9).

Enfin, des analyses microarray d'HUVECs traitées avec de la fumagilline ont montré la sur-expression de 71 gènes et la sous-expression de 143 autres gènes [119]. Ces changements d'expression semblent avoir lieu très précocement c'est-à-dire entre une et deux heures après les traitements des cellules [183]. Toutefois, même si ces modifications de l'expression génique sont très probablement impliquées dans l'effet antiangiogénique de la fumagilline nous ne connaissons ni leur lien direct avec l'inhibition de METAP2 ni si cette variation au niveau de l'ARN messager est accompagnée par un changement de niveau des protéines correspondantes. En effet, très peu d'études protéomiques approfondies ont été engagées jusqu'à maintenant [184, 146].



Il est désormais acquis que l’inhibition de la NME est une voie à suivre pour développer des stratégies thérapeutiques notamment contre le cancer et les affections dépendantes de l’angiogenèse. La compilation des données disponibles semble montrer un effet antitumoral multifactoriel avec une inhibition directe des cellules malignes ainsi qu’une inhibition de l’angiogenèse (Fig. 10). Néanmoins, les causes de la spécificité cellulaire d’action de la fumagilline et de ses dérivés restent inconnues. De même, la cascade d’événements qui relie le blocage de la NME, c’est-à-dire le maintien de la méthionine N-terminale, et l’effet anticellulaire et antiangiogénique observé est encore très peu comprise. Le fait que la METAP2 animale possède l’activité POEP ne facilite pas la compréhension du rôle de la NME. De plus, les données concernant la NME sont souvent partielles et non homogènes ce qui ne permet pas à l’heure actuelle de se faire une idée claire de la fonction de la NME dans ces cellules malgré que ce processus possède un potentiel thérapeutique reconnu très important.

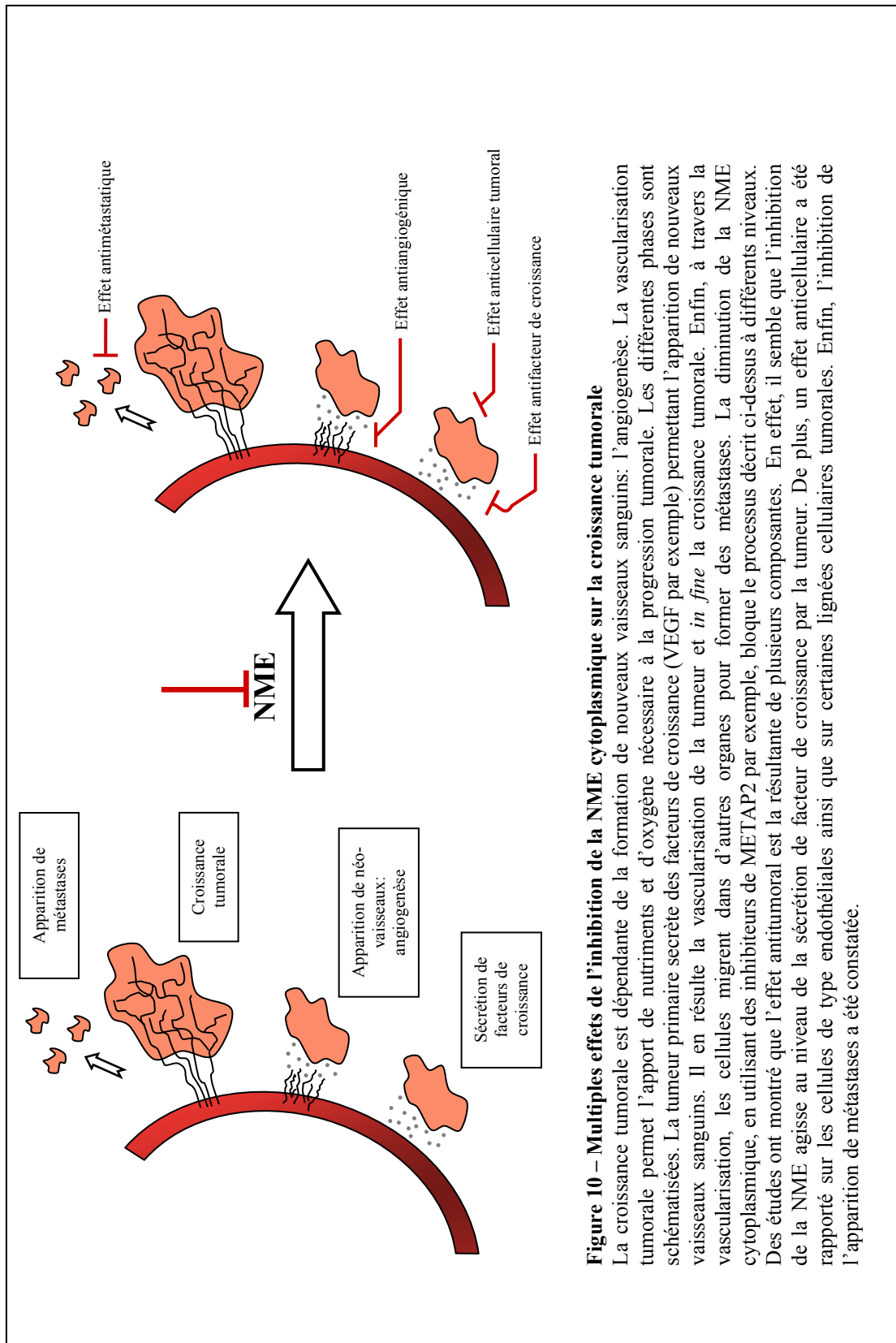


Figure 10 – Multiples effets de l’inhibition de la NME cytoplasmique sur la croissance tumorale

La croissance tumorale est dépendante de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins: l’angiogénèse. La vascularisation tumorale permet l’apport de nutriments et d’oxygène nécessaire à la progression tumorale. Les différentes phases sont schématisées. La tumeur primaire sécrète des facteurs de croissance (VEGF par exemple) permettant l’apparition de nouveaux vaisseaux sanguins. Il en résulte la vascularisation de la tumeur et *in fine* la croissance tumorale. Enfin, à travers la vascularisation, les cellules migrent dans d’autres organes pour former des métastases. La diminution de la NME cytoplasmique, en utilisant des inhibiteurs de METAP2 par exemple, bloque le processus décrit ci-dessus à différents niveaux. Des études ont montré que l’effet antitumoral est la résultante de plusieurs composantes. En effet, il semble que l’inhibition de la NME agisse au niveau de la sécrétion de facteur de croissance par la tumeur. De plus, un effet anticellulaire a été rapporté sur les cellules de type endothéliales ainsi que sur certaines lignées cellulaires tumorales. Enfin, l’inhibition de l’apparition de métastases a été constatée.

IV. Rôle physiologique de l'excision de la méthionine N-terminale

Il est aujourd'hui largement admis que la NME est un processus essentiel et ce pour différentes raisons. En effet, la NME est un processus qui a lieu dans tous les compartiments cellulaires où il y a une synthèse de protéines (cytoplasme, mitochondries et plastes) et qui est très conservé à travers le vivant. Les gènes codant les enzymes assurant la NME font partie du génome minimal (environ 300 gènes) requis pour la viabilité des eubactéries [185, 186, 187] et la NME est une fonction tellement conservée qu'elle a lieu également dans les organites ayant un protéome de moins de 100 protéines [60]. De façon similaire, les METAPs sont présentes dans le protéome très réduit du parasite eucaryotique *E. cuniculi* (environ 2000 protéines) [188]. De plus, l'abolition de la NME conduit systématiquement à la mort cellulaire.

De façon surprenante, peu de choses sont connues sur les raisons de cette conservation ou ce qui rend ce processus si important. Les recherches sur la fonction de la NME cytoplasmique ont été historiquement frustrantes. L'inactivation de gènes chez les bactéries [189, 190, 191] et la levure [52] conduit systématiquement à la mort cellulaire rendant les études difficiles. La compréhension de ce processus chez les eucaryotes a été retardée par la redondance des gènes codant les enzymes de la NME, son essentialité ainsi que par le fait que ce processus affecte plus de 15 000 cibles potentielles différentes dans le cytoplasme d'un eucaryote supérieur. Ainsi, les bases moléculaires qui font de la NME un mécanisme essentiel sont encore inconnues.

La description des connaissances actuelles sur le rôle de la NME est réalisée ici excepté pour le domaine lié aux applications thérapeutiques qui a été abordé plus en détail dans le précédent chapitre (III.4.).

1. L'excision de la méthionine N-terminale comme un prérequis

A. L'excision de la méthionine N-terminale et la N-myristoylation

Les METAPs en enlevant la méthionine initiatrice peuvent permettre d'autres modifications. En effet, la NME est un prérequis nécessaire pour d'autres modifications co-

traductionnelles telle que la N-myristoylation (N-myr). La N-myr est l'attachement d'un groupement myristate (acide gras saturé ayant 14 atomes de carbone) sur une glycine N-terminale. Par conséquent, l'action des METAPs est nécessaire pour que cette modification ait lieu. La N-myr est un processus irréversible essentiel catalysée par les N-myristoyltransférases. Elle a lieu dans toutes les cellules eucaryotiques [192, 193, 194] et affecte un ensemble réduit de protéines [195]. La N-myr n'a pas lieu dans les bactéries et les organites d'origine endosymbiotique. Par conséquent, cela suggère que la N-myr est apparue après la NME durant l'évolution. En outre, toutes les protéines ayant une glycine N-terminale ne sont pas myristoylées. Ainsi, la nature essentielle de la NME ne peut pas s'expliquer uniquement comme une conséquence de la N-myr.

B. Le résidu N-terminal catalytique

Il existe de rares cas où il a été montré que la NME est nécessaire pour libérer le résidu N-terminal impliqué dans le mécanisme catalytique de l'enzyme. En effet, dans une telle situation, l'action des METAPs est nécessaire pour que l'enzyme puisse fonctionner correctement. C'est le cas notamment de la glutamine fructose-6-phosphate amino-transférase (Gfa1), une enzyme essentielle chez la levure et qui catalyse la première étape limitante de la biosynthèse de l'héxosamine. Le groupement α -amino de la cystéine N-terminale de Gfa1, libéré après l'action de la METAP, agirait comme un nucléophile dans le mécanisme catalytique. Il a été montré que l'exposition de la cystéine en position N-terminale est requise pour la fonction normale de Gfa1 car sinon son activité décroît, ce qui provoque une diminution du taux de croissance des levures [196]. Ces résultats constituent la première démonstration qu'une protéine endogène de la levure a besoin de la NME pour assurer sa fonction.

De plus, la NME de protéines recombinantes est souvent critique pour leur fonction. Par exemple, le maintien de la première méthionine d'une ribonucléase ayant des propriétés antitumorales, exprimée chez *E. coli* conduit à une activité catalytique plus faible ainsi qu'à une réduction de sa thermostabilité [197]. De manière similaire, la cytokine RANTES est complètement inactive lorsque la méthionine N-terminale est maintenue [198, 199, 200].

2. Les méthionine aminopeptidases, une régulation différentielle

La NME a longtemps été considérée comme une voie constitutive, faisant partie des fonctions dites de « ménage » assurant le bon fonctionnement cellulaire. Désormais, une variété d'évidences appuie la théorie contraire. C'est le cas notamment des cellules des mammifères où une expression différentielle de la METAP2 a été observée selon le type cellulaire et l'état de prolifération des cellules en comparaison à la METAP1. L'expression des METAP2s semble augmenter dans des conditions mitogéniques. De plus, la METAP2 semble surexprimée dans les cellules tumorales en comparaison aux cellules normales [201, 156, 66]. Elle s'accumule aussi dans les tumeurs du cancer du colon et est associée à la progression des métastases [202]. En outre, la surexpression de la METAP2 humaine provoque une accélération de la prolifération des cellules épithéliales des bronches [102]. Ce phénotype est aboli par l'application d'un inhibiteur des METAP2s indiquant l'importance de la fonction catalytique des METAP2s. Ainsi, ces données suggèrent que la METAP2 est régulée durant la prolifération cellulaire ainsi que durant la tumorigenèse contrairement à la METAP1. Chez les insectes, les transcripts des METAP2s sont uniformément distribués durant les premières étapes du développement embryonnaire mais ensuite une spécificité tissulaire a été constatée [203]

Une régulation différentielle de la METAP2 a été observée pendant le développement asexuel du parasite eucaryote *Toxoplasma gondii* [204]. Chez *P. falciparum*, la protéine METAP1 est co-réglée avec différents composants de la voie ubiquitine [205]. La METAP1 est exprimée de manière différentielle aussi durant le cycle cellulaire des dinoflagellés [206]. Chez les plantes, les METAPs sont également connues pour être régulées durant le développement. Dans le cytoplasme du modèle *A. thaliana*, une METAP de type 1 (METAP1A) et deux METAPs de type 2 (METAP2A et METAP2B) ont été caractérisées. La METAP2B est la plus fortement exprimée et des transcripts METAPs ont été trouvés dans tous les organes étudiés. Cependant, la quantité des différents transcripts est organo-dépendante, suggérant une régulation tissulaire de leur expression. De plus, les différents types de METAPs sont régulés durant le développement de la plante [82]. Il a été rapporté également que les gènes codant les différentes METAPs de la cyanobactérie *Synechocystis sp.* PCC 6803 sont différentiellement exprimés durant les phases de croissance et en condition de stress [207]. Récemment, le gène d'une METAP a été identifié chez l'orge et semble induit en

cas d'exposition à des basses températures et lors d'un traitement à l'acide abscisique [208].

Par conséquent, les METAPs apparaissent aujourd'hui comme des enzymes dont l'expression est modulable et non plus constitutive.

3. L'excision de la méthionine N-terminale et le métabolisme de la méthionine

Le métabolisme de la méthionine joue un rôle dans beaucoup d'aspects de la physiologie cellulaire. Un des métabolites de la méthionine, le *S*-adénosyl-méthionine est le donneur universel de groupements méthyles dans la cellule. De plus, grâce à sa capacité à être oxydée, il a été suggéré que la méthionine libre puisse agir comme un antioxydant contre les radicaux libres et ainsi protéger la cellule du stress oxydatif [209]. Le métabolisme des acides aminés soufrés tels que la méthionine a été également lié à la progression du cycle cellulaire ainsi qu'à des dysfonctionnements cellulaires [210, 211].

Les plantes, bactéries et champignons peuvent assimiler le soufre inorganique comme sulfate et le réduire en sulfite conduisant à la synthèse des acides aminés soufrés [212, 213, 214, 215]. En revanche, les animaux n'ont pas cette capacité et obtiennent le soufre réduit par l'alimentation. Le métabolisme de la méthionine et le système antioxydant sont étroitement liés par la cystéine, autre acide aminé soufré précurseur du glutathion. Chez les animaux, la méthionine est utilisée entre autre pour produire de la cystéine grâce à la voie de reverse transulfuration. Par contre, les plantes utilisent la voie de transulfuration pour synthétiser de la méthionine à partir de la cystéine (Fig. 11).

La NME clive la méthionine initiatrice des protéines en cours de synthèse. Ainsi, les deux produits de la réaction sont d'une part la chaîne polypeptidique dépourvue de sa méthionine initiatrice et d'autre part une méthionine libre. Cette méthionine ainsi relâchée peut donc être recyclée dans la cellule au niveau du métabolisme des acides aminés soufrés ou incorporée dans une protéine. Ce recyclage de la méthionine est important pour la cellule car la méthionine est un acide aminé coûteux à produire.

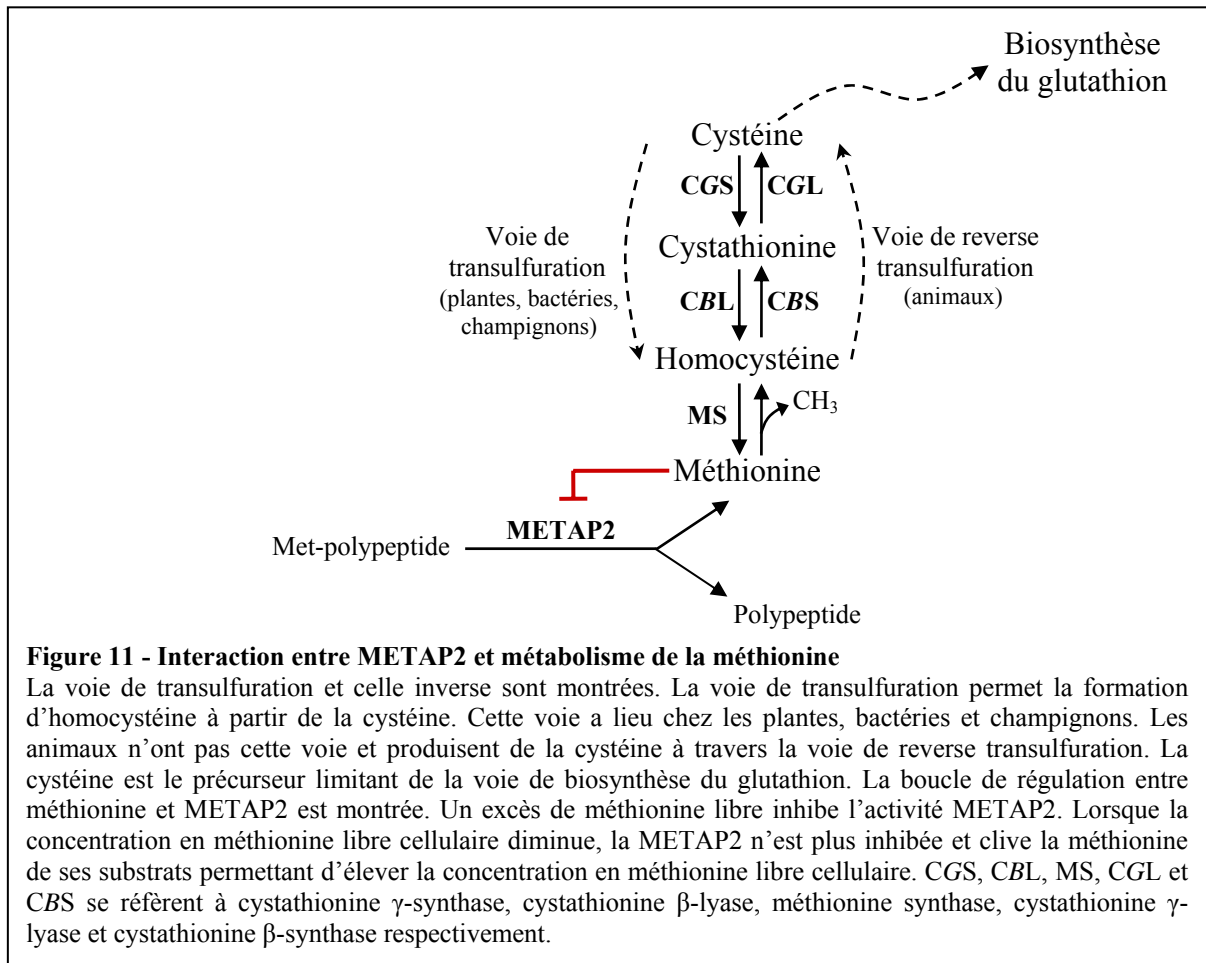
Au début des années 2000 il a été établi chez la levure que la METAP1 est l'isoforme dominante pour la croissance cellulaire et que la METAP2 semble être largement redondante en terme de fonction [216]. En effet, la surexpression de la METAP2 permet de compléter le défaut de la METAP1 [216, 52]. Cependant, cette complémentation du phénotype du mutant de la METAP1 est abolie par l'ajout de méthionine dans le milieu de

culture des levures. Chez les champignons, la méthionine est un médiateur de l'expression génique en réprimant spécifiquement les gènes impliqués dans l'assimilation du soufre et la biosynthèse de la méthionine (gènes MET) [214]. Il a été montré que l'inhibition de la croissance est indépendante de la capacité de la méthionine à réprimer les gènes MET et ne résulte pas non plus de l'inhibition de la synthèse d'autres métabolites, mais cela résulte de l'inhibition de la METAP2 [80] (Fig. 11).

En effet, la concentration en méthionine dans le cytosol de la levure (0,1 – 1 mM [217]) est proche de la constante de liaison pour la METAP2 [80], ce qui explique le rôle mineur de la METAP2 chez la levure. L'inhibition par la méthionine est très spécifique des METAP2s et est très conservée de la levure à l'Homme. En comparaison, dans les cellules endothéliales, la concentration de méthionine libre varie entre 5 et 30 μ M. Chez les plantes, la valeur est proche de 15 μ M [218] et elle est connue pour être étroitement contrôlée [219]. Cette concentration réduite en méthionine dans ces types cellulaires peut donc permettre à la METAP2 d'avoir un rôle plus étendu. Il a donc été suggéré que l'activité METAP2 est inhibée dans la levure quand la concentration en méthionine libre n'est pas limitante tandis que ce n'est pas le cas pour la METAP2 animal [80]. Il est donc possible que lorsque la concentration en méthionine cellulaire est limitante chez la levure, l'activité METAP2 augmente et ainsi la méthionine initiatrice sera retirée des substrats moins efficacement clivés permettant à la levure de retrouver un niveau de méthionine libre adéquat. Il s'agit de la première démonstration d'un lien fort entre la NME et le métabolisme de la méthionine [80] (Fig. 11). Une telle interaction a aussi été suggérée entre les METAPs et la méthionine chez *A. thaliana* [82]. En effet, la L-méthionine induit un retard du développement de la plante et le mutant nul pour la METAP1A est plus affecté que la lignée sauvage [82].

Les données obtenues sur la levure et chez *A. thaliana* suggèrent clairement que NME et métabolisme de la méthionine sont étroitement liés et probablement à différents niveaux. En effet, la faible concentration en méthionine libre cellulaire peut expliquer que la METAP2 joue un rôle plus important chez les eucaryotes supérieurs y compris les plantes mais ne peut pas expliquer seule la plus grande sensibilité de certaines lignées cellulaires de mammifères à la fumagilline. De plus, nous en savons encore trop peu sur la METAP1 dans ces systèmes pour avoir une idée plus précise de la fonction de la NME. Une diminution de l'activité globale METAP ou une augmentation de la demande en NME dans certains tissus peut être à la base de telles observations. On peut concevoir que le blocage de l'activité de la METAP2

conduise à la rétention de la méthionine initiatrice d'un nombre limité de protéines. Par exemple, les protéines commençant par Met-Val seront probablement parmi les plus affectées car elles sont connues pour être clivées de manière peu efficace par les deux types de METAPs. Cela conduit inévitablement à la production de protéines ayant anormalement maintenue leur méthionine initiatrice. L'altération de ces protéines du fait du maintien de la première méthionine (*e.g.* activité, stabilité, localisation etc) peut être à la base du défaut de développement associé à l'inhibition de la NME.

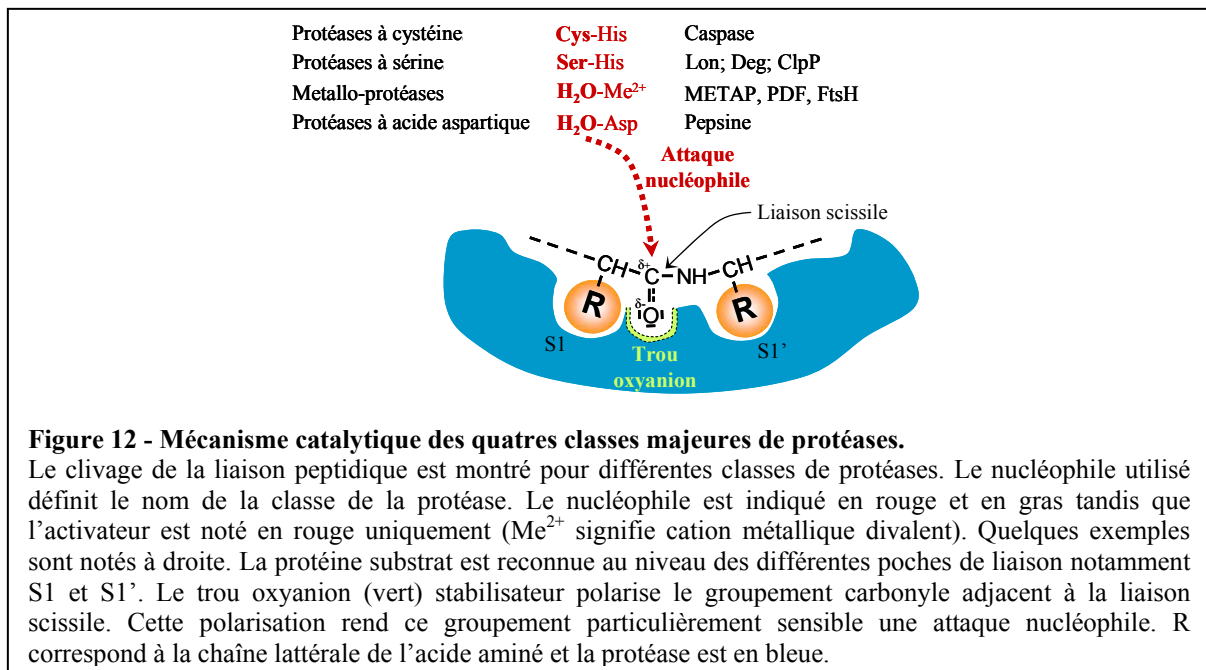


4. L'excision de la méthionine N-terminale et dégradation protéique

A. Dégradation protéique

La dégradation des protéines ou protéolyse est un processus étudié depuis plus de 50 ans et aujourd'hui de nombreuses protéases ont été caractérisées. La protéolyse est désormais

reconnue comme un mécanisme majeur de la cellule, finement régulé et lui-même régulateur de nombreux processus cellulaires essentiels. Les premières voies de dégradation étudiées ont été celles impliquant le lysosome, un compartiment cellulaire contenant de nombreuses hydrolases. Néanmoins, il a rapidement été mis en évidence différents paradoxes suggérant que des protéines puissent être dégradées par une voie indépendante du lysosome notamment en utilisant des réticulocytes de lapin (dépourvus de lysosomes). Le protéasome 26S est un exemple très bien décrit de protéases ayant un rôle de régulation ainsi que le système ubiquitine permettant le ciblage précis de certaines protéines vers la dégradation (revue dans [9]). Différents types de protéases ont été caractérisées et elles sont classées en fonction du nucléophile servant pour l'hydrolyse de la liaison peptidique. Ainsi, il existe des protéases à cystéine telles que les caspases par exemple. D'autres protéases utilisent la sérine ou encore la thréonine faisant donc parties des protéases à sérine et thréonine respectivement. Certaines protéases utilisent une molécule d'eau en guise de nucléophile, c'est le cas des protéases à acide glutamique, acide aspartique ainsi que les metallo-protéases (Fig. 12).



Une protéine peut être dégradée car elle n'assure plus sa fonction correctement ou à cause d'un mauvais repliement de sa chaîne peptidique. D'autres protéines sont dégradées pour en recycler les acides aminés. Cependant, la protéolyse de beaucoup de protéines est déclenchée par différents *stimuli* développementaux et environnementaux pour contrôler l'abondance de régulateurs cellulaires cruciaux. Dans ces situations, le mécanisme de protéolyse doit être très spécifique et finement contrôlé. La dégradation d'une mauvaise

protéine ou à un mauvais moment peut être catastrophique pour l'organisme. Un des meilleurs exemples est le cas des produits de proto-oncogènes qui sont régulés par la protéolyse, de nombreux cancers se développent lorsque la protéolyse de ces régulateurs est abolie ou dérégulée [220, 221, 222, 223].

B. Le système ubiquitine-protéasome

Une des voies de dégradation fortement impliquée dans la régulation cellulaire est celle faisant intervenir le système ubiquitin-protéasome [224, 225, 226] (Fig. 13). Ce système est assuré par deux grandes fonctions : l'étiquetage de la protéine cible et la dégradation de cette protéine une fois étiquetée. L'ubiquitination d'une protéine correspond à la liaison covalente d'une petite protéine, l'ubiquitine, sur une protéine cible. Cette « étiquette » ubiquitine permet le ciblage de la protéine vers le protéasome. En effet, ce mécanisme fait intervenir différentes enzymes réalisant successivement l'activation de l'ubiquitine et son transfert sur une protéine cible qui a été reconnue spécifiquement. Cette dernière étape de l'ubiquitination, la reconnaissance du substrat à « ubiquitiner » est réalisée par des protéines nommées E3 ubiquitine ligases. Ce sont ces enzymes qui permettent la spécificité de cette voie de dégradation. Il existe différentes E3 ubiquitine ligases ayant chacune un mode de liaison à la protéine cible et de transfert de l'ubiquitine différent. Le protéasome est un complexe protéasique dépendant d'ATP qui est retrouvé chez les eucaryotes, archées et quelques bactéries (pour revue [227]).

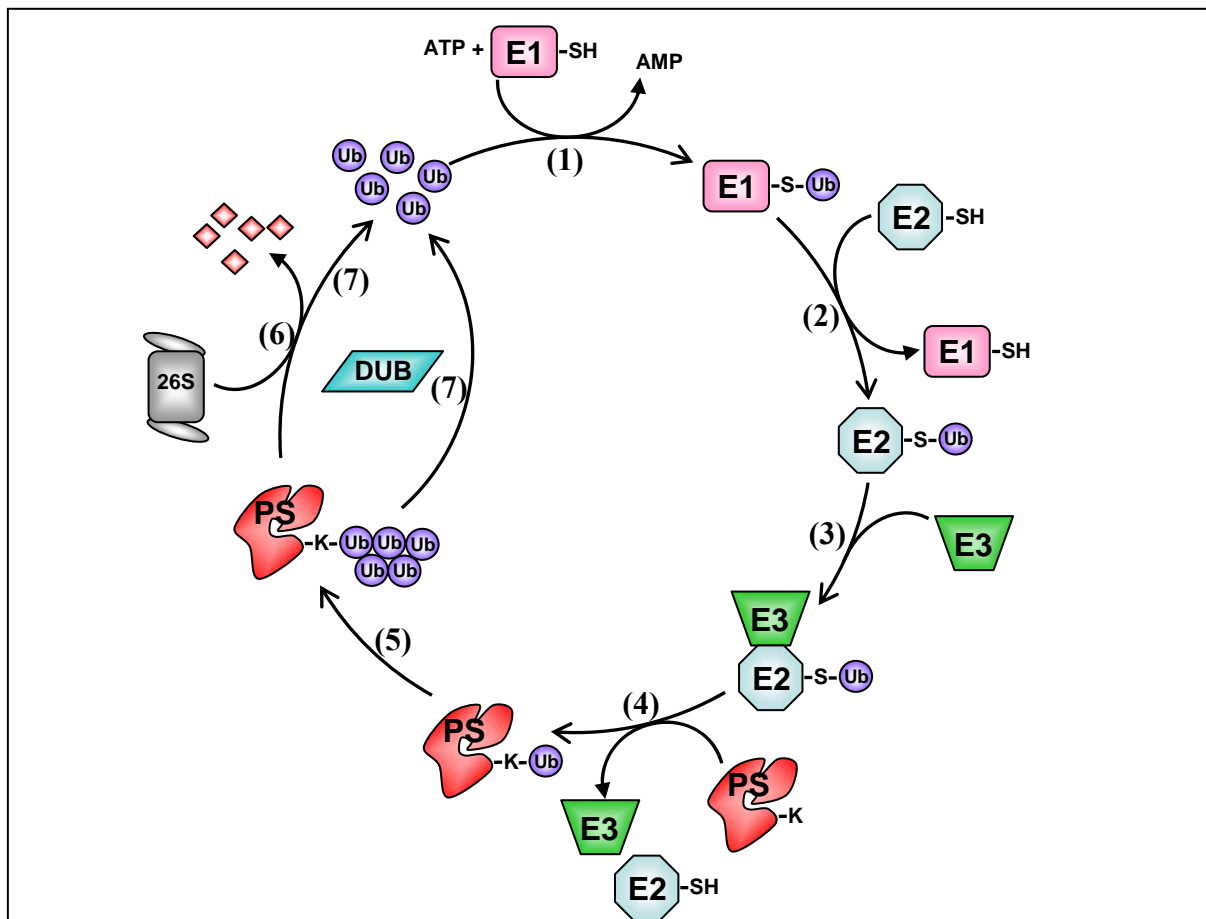


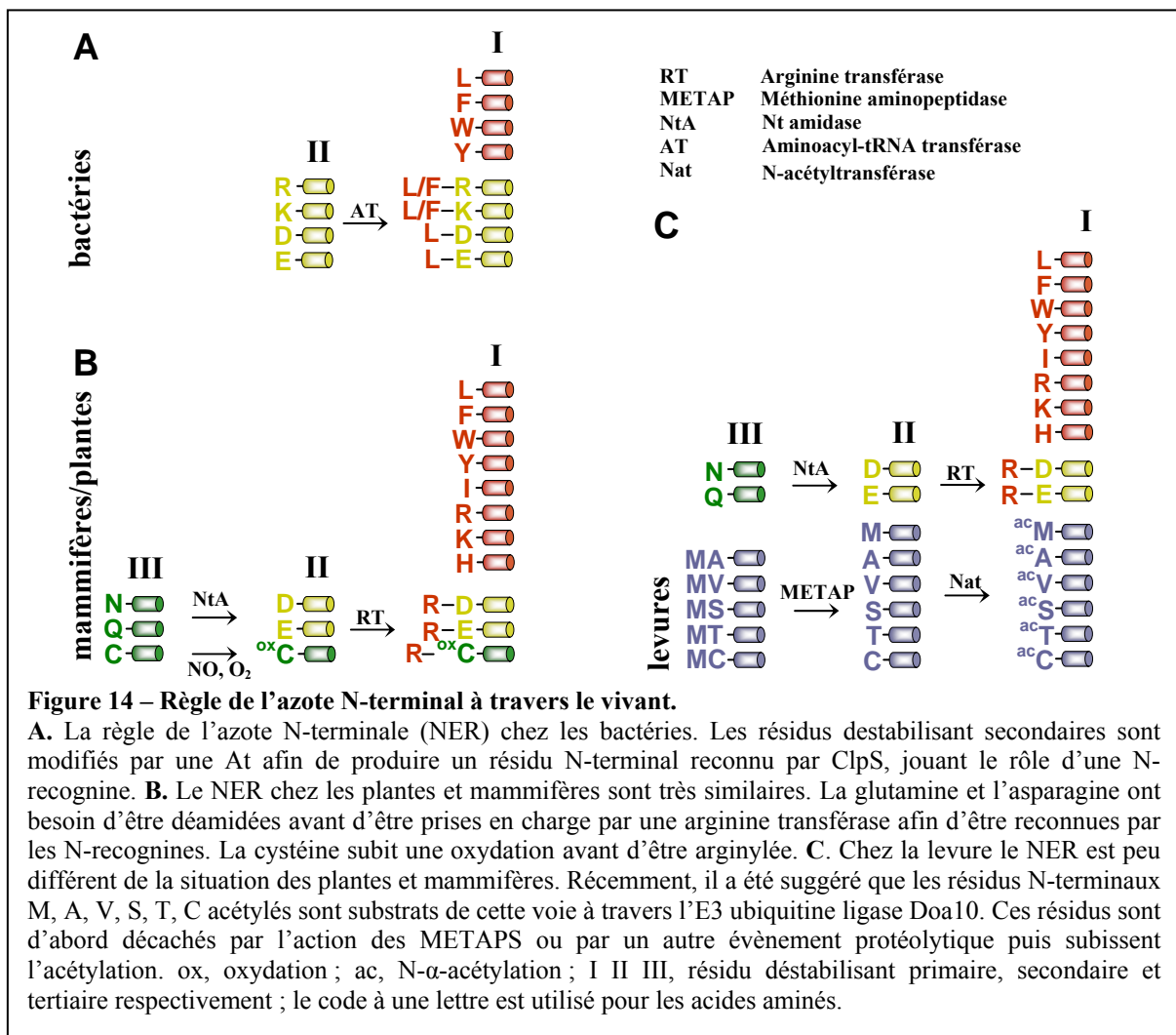
Figure 13 – Voie ubiquitine-protéasome

Les protéines destinées à la dégradation *via* la voie ubiquitine-protéasome subissent le plus souvent une poly-ubiquitination. La première étape du cycle consiste en l'activation de l'ubiquitine (Ub) à travers une liaison thioester avec l'enzyme E1 (1). Puis, l'Ub est transférée sur l'enzyme de conjugaison de l'Ub E2 (2). L'Ub ligase E3 s'associe à l'E2 transportant l'Ub activée (3) facilitant le transfert de l'Ub sur une lysine interne de la protéine substrat (PS) (4). Différents mécanismes de transfert de l'Ub existent selon l'enzyme E3. Plusieurs événements de conjugaisons de l'Ub à la protéine cible permettent de créer une chaîne poly-Ub (5) permettant généralement d'adresser la protéine aux protéasomes 26S qui va dégrader cette dernière (6). Des enzymes de de-ubiquitination (DUB) existent et permettent de recycler l'Ub (7).

C. La règle de l'azote N-terminal et ubiquitination interne

La reconnaissance d'un substrat protéique pour la dégradation implique la reconnaissance d'un motif structural dans la protéine qui ne conduit pas nécessairement à une dégradation constitutive de cette dernière. Ces motifs portent le nom de dégrons. Un dégron est couramment défini comme l'élément minimal d'une protéine qui suffit à sa reconnaissance et sa dégradation par une voie protéolytique. Une des caractéristiques d'un dégron est d'être transférable : ajouter un dégron à une protéine lui confère une demi-vie courte [228]. De tels motifs peuvent être démasqués par d'autres mécanismes secondaires tels que la liaison à

l'ADN pour le *N-terminus* de MyoD par exemple [229]. Cependant, peu de signaux de dégradations sont connues aujourd'hui. Le signal le mieux documenté est celui concernant le résidu N-terminal lui-même. Un ensemble de règles régissant ce signal est connu sous le nom de règles de l'azote N-terminale (NER, N-end rule) et relate la demi-vie d'une protéine en fonction de l'identité de son résidu N-terminal [230]. Cette voie fait partie du système ubiquitine-protéasome chez les eucaryotes. Une caractérisation détaillée de la voie du NER a été réalisée dans un premier temps chez la levure et les animaux et a révélée une structure hiérarchique [230] (Fig. 14). Bien que les eubactéries ne possèdent pas la voie ubiquitine-protéasome, il existe des règles définissant le NER chez ces organismes. Les règles sont similaires aux NERs décrits auparavant même si des différences existent [231] (Fig. 14). Chez les plantes, le NER a été également caractérisé et est similaire à celui des mammifères [232] (Fig. 14).



Chez les bactéries, la protéine ClpS se lie aux *N-termini* des substrats du NER et

transfert directement la protéine cible à la protéase ClpAP ; ClpS joue ainsi le rôle d'une N-recognine (Fig. 15) [233, 234]. Chez les eucaryotes, la reconnaissance des substrats du NER est réalisée par les N-recognines, une classe spécifique d'E3 ubiquitine ligase qui permet l'accrochage d'une ubiquitine sur la protéine substrat à travers une liaison isopeptidique formée entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et le groupement ϵ -NH₂ d'une lysine interne. Ensuite, une chaîne polyubiquitine est formée à partir de la première molécule ubiquitine ajoutée sur la protéine substrat (Fig. 16A) ce qui *in fine* conduit la protéine à la dégradation *via* le protéasome 26S.

Cette règle a été suggérée par une série d'expériences explorant le devenir métabolique de fusions protéiques entre l'ubiquitine et une protéine rapporteur telle que la β -galactosidase d'*E. coli* [235]. Cette règle montre que les résidus N-terminaux stabilisant sont ceux ayant une chaîne latérale réduite donc démasquées par la NME. De manière surprenante, malgré que la méthionine soit volumineuse et ainsi théoriquement un résidu déstabilisant, différentes études avec une protéine rapporteur ont initialement suggéré que la méthionine est un résidu stabilisant chez la levure, les mammifères et la plante [236, 230, 237]. Cependant, d'autres études avec d'autres protéines rapporteurs notamment la glutathion-S-transférase chez la levure [216], la β -galactosidase chez *E. coli* [238], la β -glucuronidase [239] et les protéines D1 et D2 du photosystème II [240] chez les plantes ont montré que le maintien de la méthionine N-terminale déstabilise la protéine. Ainsi, la méthionine en position N-terminale peut agir comme un signal de déstabilisation conduisant une protéine à la dégradation.

Cependant, une N-méthionine n'est pas toujours suffisante pour conduire une protéine à la dégradation. En effet, d'autres caractéristiques probablement proches du résidu N-terminal peuvent être requises. La demi-vie de la protéine oncogène c-mos et de la protéine ribosomal P1 dépend de l'état de phosphorylation de la sérine en position 2 [241, 242]. La protéine D1 du photosystème 2 est phosphorylée chez les plantes supérieures durant son cycle de réparation lors de la photo inhibition [243, 244]. En outre, chez *C. reinhardtii*, la thréonine N-terminale de la sous unité D2 est phosphorylée mais cela n'est pas nécessaire pour le fonctionnement du photosystème II [245, 246, 240]. De façon similaire, la demi-vie de l'homosérine transsuccinylase et de l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase dépend du résidu N-terminal mais pas de son état de phosphorylation [247, 248]. Récemment, Alexander Varshavsky [249] a montré que l'acétylation de résidus N-terminaux incluant la méthionine de certaines protéines chez la levure peut agir comme un signal de dégradation *via* le

protéasome. Ainsi, des caractéristiques autres que le résidu N-terminal tel que des modifications post-traductionnelles peuvent aussi influencer la demi-vie de la protéine.

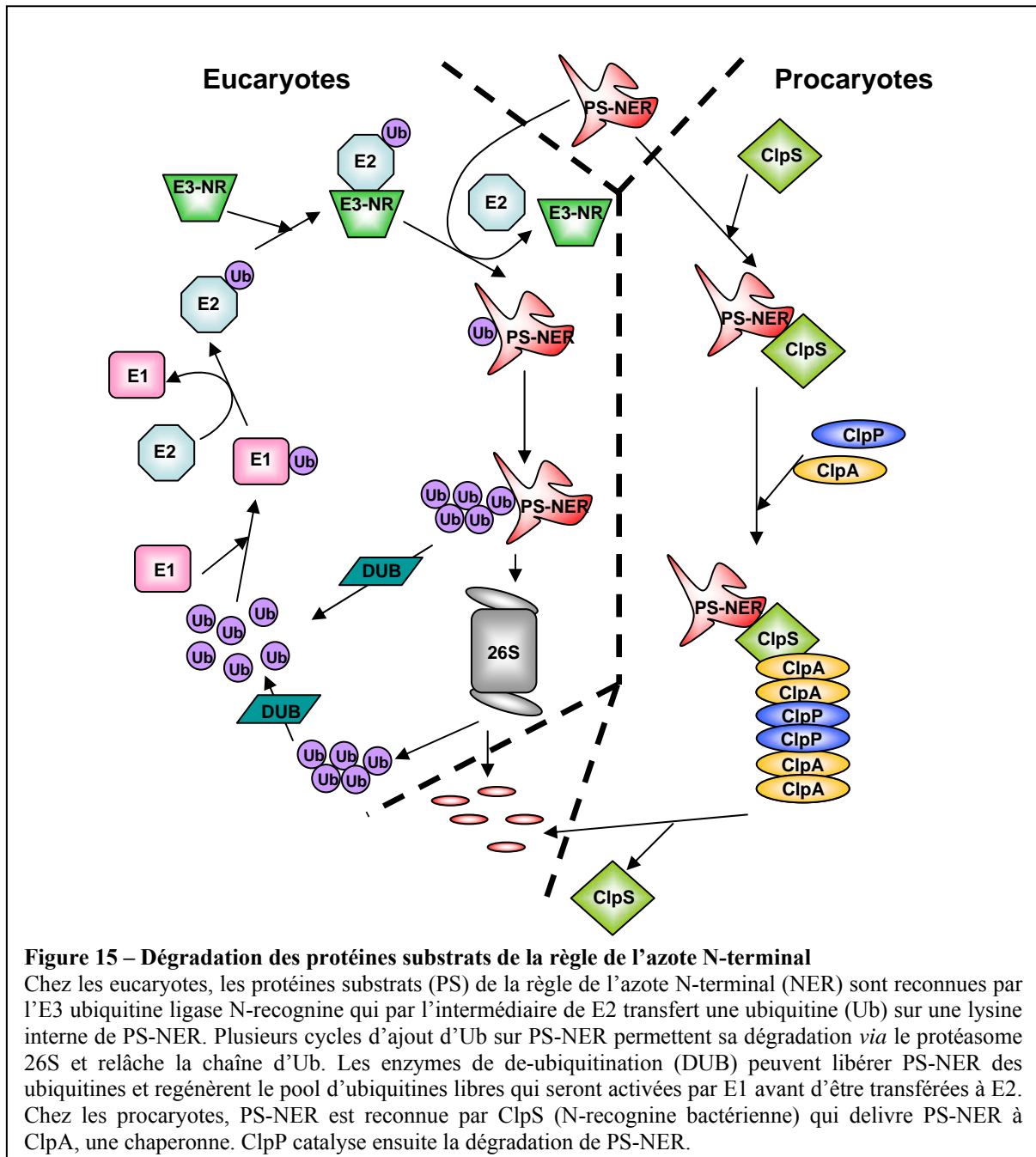


Figure 15 – Dégradation des protéines substrats de la règle de l'azote N-terminal

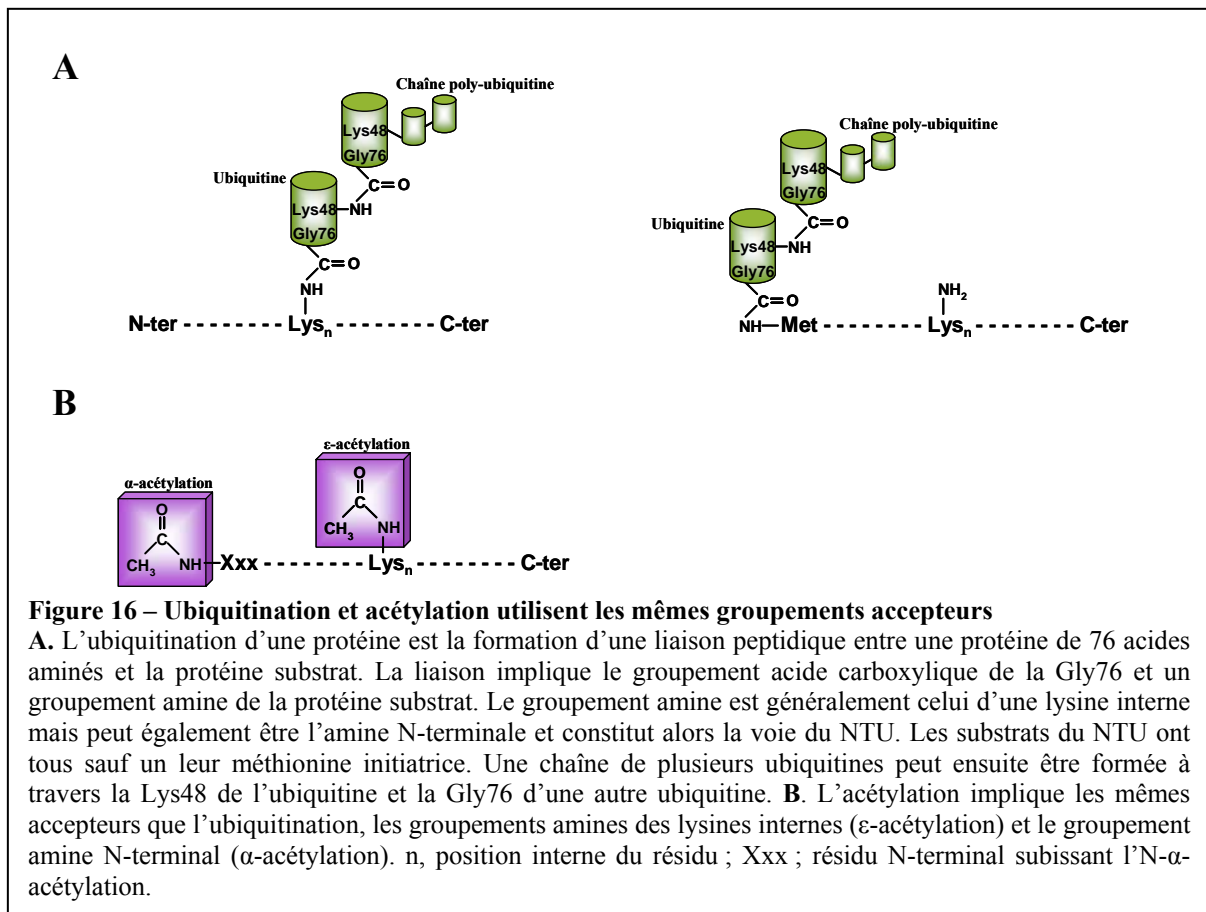
Chez les eucaryotes, les protéines substrats (PS) de la règle de l'azote N-terminal (NER) sont reconnues par l'E3 ubiquitine ligase N-recoginine qui par l'intermédiaire de E2 transfère une ubiquitine (Ub) sur une lysine interne de PS-NER. Plusieurs cycles d'ajout d'Ub sur PS-NER permettent sa dégradation *via* le protéasome 26S et relâche la chaîne d'Ub. Les enzymes de de-ubiquitination (DUB) peuvent libérer PS-NER des ubiquitines et régénèrent le pool d'ubiquitines libres qui seront activées par E1 avant d'être transférées à E2. Chez les procaryotes, PS-NER est reconnue par ClpS (N-recoginine bactérienne) qui délivre PS-NER à ClpA, une chaperonne. ClpP catalyse ensuite la dégradation de PS-NER.

D. La règle de l'azote N-terminal et ubiquitination N-terminale

Les règles du NER citées ci-dessus sont celles qui ont été originellement décrites et faisant intervenir la reconnaissance du résidu N-terminal et l'ubiquitination d'une lysine interne. Aujourd'hui, de plus en plus de règles additionnelles s'ajoutent à celles

précédemment décrites. En effet, un mode alternatif existe. Par ailleurs, certaines lysines internes semblent plus efficacement ubiquitinyllées que d'autres pour une même protéine substrat. Par exemple, il a été suggéré que l'ubiquitination de seulement six lysines sur vingt que comporte la protéine Sic1 est efficace pour adresser la protéine vers le protéasome [250]. Néanmoins, pour une majorité de substrats du protéasome, le site préférentiel et précis d'ubiquitination n'est pas caractérisé. Désormais, un mode alternatif de reconnaissance du résidu N-terminal et de ciblage au protéasome impliquant l'ubiquitination a été découvert. En 1998, A. Ciechanover et ses collaborateurs ont montré pour la première fois que l'ubiquitination N-terminale ou NTU est une nouvelle voie de ciblage des protéines au protéasome qui est initiée par l'attachement de l'ubiquitine au α -NH₂ terminal libre (non bloqué) du résidu N-terminal [28]. Le NTU a besoin d'un α -amino terminal libre pour accepter le résidu C-terminal de l'ubiquitine. Cette fusion peut être suffisante pour conduire la protéine vers le protéasome (Fig. 16A). C'est le cas par exemple du facteur de transcription MyoD, une protéine de liaison à l'ADN requise pour la différenciation des muscles qui est dégradée *via* cette voie [251, 28]. Depuis, d'autres substrats du NTU ont été découverts. De manière importante, il y a des protéines ayant des lysines internes notamment MyoD [28], LMP1 [252], LMP-2 [253], HPV-16 E7 [254] et Id2 [255] ainsi que des protéines naturellement sans lysine interne comme HPV-58 E7, p16^{INK4a} [256] et p14ARF [257, 258] qui subissent le NTU suggérant que ce mécanisme n'est pas uniquement une solution pour les protéines n'ayant pas de lysine interne.

De récentes données ont suggéré que la voie du NTU est utilisée pour la dégradation de protéines nucléaires ayant une demi-vie courte. Un nombre de protéines substrats de cette voie sont reconnues par des E3 ubiquitine ligases spécifiques et sont dégradées *via* le protéasome. Tous les substrats connus du NTU (13) - sauf un - commencent avec une méthionine libre non clivée. La seule exception est p19Arf. En effet, selon l'espèce considérée, p19Arf peut subir ou non la NME et ainsi avoir un résidu N-terminal différent [257, 258].



E. NME et dégradation protéique, les faits

Il existe peu de données expérimentales concernant l'impact de la NME sur un protéome et plus généralement l'influence de la séquence N-terminale sur la demi-vie protéique. En 2003, le plaste a été utilisé comme système modèle pour investiguer le rôle de la NME car les modifications N-terminales dans ce compartiment sont variées malgré le protéome restreint (moins de 100 protéines) [54, 240]. En inhibant la NME de différentes façons, il a été démontré qu'elle assure dans le chloroplaste une régulation globale de l'organite en influençant la demi-vie d'une protéine clé, la protéine D2 du photosystème II [240] sans en modifier sa fonction. La diminution de la quantité de cette seule protéine induit une cascade d'événements incluant la déstabilisation d'un complexe protéique majeur, le photosystème II, puis en conséquence une désorganisation complète de la biogenèse de tout le compartiment, le plaste dans lequel la protéine est active. Cet effet peut être reproduit en substituant le deuxième acide aminé par un acide aminé altérant le clivage de la méthionine

initiatrice de D2, ce qui provoque la rétention de la N-méthionine. Ainsi, seulement très peu de protéines sont directement sensibles à l'inhibition de la NME et son blocage déstabilise une protéine clé faisant partie d'un complexe protéique majeur du compartiment. La machinerie responsable de cette dégradation reste inconnue. Néanmoins, ce processus ne semble impliquer ni l'ubiquitination (absente chez les plastes) ni les protéases ClpS [240]. Les plastes contiennent d'autres protéases telles que FtsH et Deg [259] qui ont notamment été impliquées dans la dégradation de D1 [260, 261]. Ils peuvent faire partie du processus protéolytique qui a été observé comme résultat de l'inactivation de la NME.

De manière analogue, il a été suggéré qu'un défaut de NME lors de conditions de stress chez *Synechocystis* peut affecter la stabilité du photosystème II [207]. De même, une glutathion-S-transférase exprimée chez la levure a une demi-vie réduite lorsque la méthionine N-terminale est maintenue [216] et elle a été décrite comme pouvant être un signal de déstabilisation chez *E. coli* [262].

Avec l'ère des analyses à grande échelle, de plus en plus de données concernant les séquences N-terminales sont disponibles que se soit pour leurs modifications, leurs séquences et la demi-vie de la protéine dont est issue cette séquence. En compilant ces données, des analyses bioinformatiques ont révélé qu'environ un tiers des protéines codées par le noyau ont une méthionine N-terminale non modifiée et que cette fraction est beaucoup moins stable que la demi-vie moyenne des protéines chez les eucaryotes supérieurs. Il a été suggéré que ces protéines instables subissent la dégradation *via* le NTU [263, 264].

F. N- α -acétylation

L'N- α -acétylation est le transfert d'un groupement acétyl de l'acétyl-coenzyme A au groupement α -amino du résidu N-terminal d'une protéine (Fig. 16B). L'N- α -acétylation a été découverte très tôt et rapidement en grand nombre de protéines ont été trouvées être N- α -acétylées. En effet, l'N- α -acétylation est une modification majeure et peu affecter l'activité, la stabilité thermique ou la demi-vie d'une protéine [265, 266]. Cette modification affecte un grand nombre de protéines chez les eucaryotes. Des analyses protéomiques ont montré qu'environ 60% des protéines chez la levure, 30% chez la drosophile et plus de 80% chez l'homme sont N- α -acétylées [267, 268]. Cette modification est exceptionnelle chez les bactéries [269]. En revanche, chez les archées, la N- α -acétylation est plus fréquente et

affecterait de 15% à 30% des protéines selon l'espèce considérée [270, 271, 272].

L'*N*- α -acétylation est catalysée chez les eucaryotes par trois différentes *N*- α -acetyltransférases (Nat), NatA, B et C. Chacune d'entre elle a une spécificité de substrats qui lui est propre. NatA qui est responsable de la majeure partie de la *N*- α -acétylation a pour substrat les protéines commençant par Ser, Ala, Gly, Cys, Val ou Thr. Par conséquent, elle agit sur les mêmes substrats que les METAPs après leur action. NatB semble être spécifique des protéines commençant avec une Met et ayant un acide aminé imposant en position 2. NatC est spécifique des séquences commençant par Met-Glu et Met-Asp [267]. Ces deux dernières Nats sont donc indépendantes de l'action des METAPs. Cette spécificité de substrats apparaît conservée à travers les eucaryotes [265, 273].

Une des fonctions de la *N*- α -acétylation qui est discutée depuis longtemps est la stabilisation de la protéine vis-à-vis de la protéolyse. En effet, les protéines *N*- α -acétylées sont fortement surreprésentées dans les différentes analyses réalisées bien que des biais expérimentaux existent [263]. Cependant, le rôle de cette modification reste toujours énigmatique. En effet, des données allant dans le sens opposé ont été récemment rapportées. Comme discuté dans le paragraphe précédent, Varshavsky et ses collaborateurs ont montré que des résidus *N*-terminaux *N*- α -acétylés peuvent constituer un *N*-dégren et sont reconnues par l'ubiquitine ligase E3 nommée Doa10 chez la levure [249, 274]. Même si l'*N*- α -acétylation joue un rôle prépondérant, d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre le(s) rôle(s) de ce processus.

La méthionine *N*-terminale peut donc agir comme un résidu déstabilisant. Ainsi, la NME, non seulement dans les plastes mais aussi dans le cytoplasme et la mitochondrie peut être un mécanisme général de modulation de la demi-vie protéique, probablement en concertation avec les caractéristiques propres de chaque protéine et impliquant différentes voies de protéolyses selon l'organisme/organite considéré. Il a donc été proposé que l'inactivation des composants de la NME puisse aussi participer à la dégradation protéique dans le cytoplasme. Tandis que de plus en plus d'informations tendent à appuyer cette hypothèse, il n'y a toujours pas de données décrivant les mécanismes moléculaires faisant le lien avec la demi-vie des protéines notamment dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs.

V. Problématiques, enjeux et objectifs du doctorat

1. Rappel général de l'état de l'art: de l'enzyme à l'organisme, du plus au moins connu

A mon arrivée au laboratoire début 2006, les composants de la NME étaient déjà bien décrits que ce soit chez les eucaryotes ou chez les procaryotes. En effet, les enzymes de la voie de la NME ont été identifiées dans chaque règne du vivant et dans tous les compartiments cellulaires où une synthèse de protéine a lieu. Très tôt, plusieurs enzymes de la NME ont été surproduites et étudiées biochimiquement. Il en résulte que leur structure et leur spécificité de substrats par exemple sont bien étudiées même si des zones d'ombre perdurent. En revanche, lorsque l'on s'éloigne de la réaction enzymatique en elle-même pour s'intéresser à l'impacte de la NME dans un protéome, il y a beaucoup moins de certitudes. La NME est connue pour être un mécanisme co-translationnel. Cependant, la dynamique des événements précoces au voisinage du ribosome participant à la maturation protéique est encore largement débattue.

Un des moyens les plus répandus pour comprendre une fonction est de l'abolir pour en étudier les conséquences. Ainsi, des mutants nuls des METAPs ont été réalisés dès la fin des années 1980. Les résultats ont rapidement montré le caractère essentiel de la NME du fait de la létalité de tels mutants et quelque soit l'organisme considéré. En outre, la présence de différents types de METAPs au sein du même compartiment cellulaire a posé la question de leur contribution respective au sein de la cellule. En effet, dans le cytoplasme des eucaryotes, l'absence d'un seul type de METAP ne conduit pas au même phénotype selon l'organisme étudié. Ainsi, la question de l'influence respective des deux types de METAPs dans différents organismes est clairement posée. De plus, il n'y a toujours pas de données décrivant les mécanismes moléculaires faisant le lien avec la demi-vie des protéines notamment dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs. Parallèlement, la découverte que les enzymes de la NME sont la cible de composés naturels ayant des vertus thérapeutiques notamment dans la lutte contre le cancer a fortement stimulé les recherches menées sur la NME.

2. Enjeux de la thèse

La NME, processus protéolytique essentiel, cible de composés ayant un intérêt thérapeutique important et reconnu, reste encore très mal comprise bien que le nombre de publications ait beaucoup augmenté depuis 20 ans du fait de son implication dans le domaine médical. Cela s'explique notamment par l'essentialité de ce processus, rendant son étude difficile. De plus, ce processus affectant une très grande quantité de protéines (plus de la moitié d'un protéome donné), il est peu aisé de comprendre la cascade d'événements conduisant aux phénotypes constatés. Ainsi, de nombreuses études réalisées jusqu'à présents se sont focalisées sur la découverte de molécules inhibant la NME et produisant un phénotype anticellulaire sans toutefois comprendre les mécanismes moléculaires induits par cette inhibition. Cette stratégie a montré ses limites dans ce domaine car il apparaît que l'absence de molécules ciblant la NME sur le marché est due à notre manque de connaissances fondamentales sur le rôle de ce processus. En effet, il ne nous est pas encore possible de suivre les différentes étapes liées à l'inhibition de ce processus et entraînant ou non un phénotype sévère. De même, l'origine des différences de réponses observées lors de l'inhibition des composants de la NME est inconnue. Cependant, quelques études ont apporté des éléments de réponses en utilisant des protéomes restreints. Ainsi, il a été montré que la NME peut être impliquée dans la régulation de la demi-vie des protéines, la méthionine N-terminale pouvant être interprétée par la machinerie cellulaire comme un signal de déstabilisation conduisant la protéine à la dégradation.

Il est désormais acquis que la NME joue un rôle important dans la prolifération cellulaire et la progression tumorale. A ce jour, un nombre limité d'inhibiteurs spécifiques a été décrit et aucun n'est prêt à être mis sur le marché. La principale raison expliquant l'échec de nouvelles découvertes de molécules est notre connaissance limitée concernant, (i) le mode d'action moléculaire des composés connus, c'est-à-dire pourquoi l'inhibition de la METAP2 provoque l'arrêt de la croissance des cellules endothéliales et tumorales ainsi que (ii) la signification et le rôle physiologique de la NME dans les différents compartiments cellulaires et (iii) les cibles cellulaires essentielles des composants de la NME. Clairement, comprendre les mécanismes moléculaires qui font de la NME un processus essentiel - en particulier dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs - permettra le développement de nouveaux outils thérapeutiques.

3. Objectifs du doctorat

Dans ce contexte, afin d'améliorer notre compréhension de ce mécanisme essentiel, mon projet de thèse a consisté à dévoiler le(s) rôle(s) physiologique(s) de la NME notamment dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs. L'utilisation de la plante modèle, *A. thaliana*, a constitué un outil de choix pour l'étude de la NME cytoplasmique chez un eucaryote supérieur. Des avancées concernant la physiologie de ce mécanisme et les caractéristiques biochimiques des METAPs ont permis de répondre à des questions concernant tout système biologique. En effet, il était question de mieux comprendre pour la première fois dans un eucaryote supérieur la cascade d'événements conduisant à la mort cellulaire en absence de la NME. Cela a impliqué la compréhension de la spécificité de substrats des METAPs afin de mieux en connaître les cibles. Il m'a fallu également bien identifier les cibles physiologiques les plus dépendantes de ce processus. La description précise des changements métaboliques engendrés par l'inhibition de la NME a permis d'identifier ces cibles. Cela a été rendu possible grâce à un système de modulation de la NME cytoplasmique mis au point chez *A. thaliana* et disponible dès mon arrivée au laboratoire. Les résultats obtenus ont été ensuite transposés et vérifiés dans d'autres modèles y compris humains afin d'en généraliser les conclusions. L'utilisation durant la thèse de différentes approches complémentaires, à différentes échelles cellulaires et impliquant plusieurs organismes modèles a permis de comprendre pour la première fois l'excision de la méthionine N-terminale dans son ensemble.

RESULTATS

Table des matières - Résultats

I. NME, glutathion et protéolyse : acteurs majeurs - Utilisation du modèle <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
<i>1. Introduction</i>	71
<i>2. Résumé de l'article : « Cotranslational Proteolysis Dominates Glutathione Homeostasis to support Proper Growth and Development » (Annexe 1 et [1])</i>	72
<i>3. Contrôles et expériences additionnels effectués</i>	76
A. Contrôle du matériel végétal utilisé et choix de normalisation	76
B. Retour sur les activités antioxydantes et état d'oxydation cellulaire	78
C. NME et fer chez <i>A. thaliana</i>	80
D. NME et métabolisme du glutathion	82
E. La glutathion réductase	84
F. Le NADPH, un cofacteur important	88
G. Activités protéolytiques lors de la diminution de la NME cytoplasmique	89
II. Aspects universels de l'excision de la méthionine N-terminale	91
<i>1. Excision de la méthionine N-terminale et glutathion chez les archées et les champignons</i>	91
<i>2. L'aide d'un modèle simplifié où l'étude de la NME est bien avancée, le chloroplaste</i>	94
A. La NME opère en amont de la protéase FtsH	96
B. L'accumulation des protéines D1 et D2 via FtsH2 est sous contrôle de PDF1B lors de l'inhibition partielle de la synthèse protéique.	98
C. Les protéines D1 et D2 déformylées sont dégradées par FtsH2 en conditions de photo-inhibition	100
<i>3. Protéolyse et excision de la méthionine N-terminale chez <i>H. volcanii</i></i>	101
A. Les protéases TET	102
B. Diminution de la NME et protéase TET	103
<i>4. L'excision de la méthionine N-terminale chez l'Homme, similitudes, différences et valorisation</i>	106
A. L'inhibition de l'excision de la méthionine N-terminale de cellules de mammifères.	108
A.1. HUVECs, modèles d'étude des lignées endothéliales	108
A.2. HCT-116, modèle d'étude de lignées tumorales	110
B. L'expression des METAPs chez les HUVECs et les cellules de la lignée HCT-116	111
C. Excision de la méthionine N-terminale et glutathion chez les cellules humaines	113

D. Cycle cellulaire et complémentation lors de l'inhibition de l'activité de la METAP2 chez les HUVECs	117
5. Spécificité de substrats des méthionine aminopeptidases	120
A. Etude de la spécificité de substrats des METAPs ; Résumé de l'article : « The proteomics of N-terminal methionine cleavage » (Annexe 2 et [275])	121
B. Purification et caractérisation de <i>At</i> METAP1A	121

I. NME, glutathion et protéolyse : acteurs majeurs - Utilisation du modèle *Arabidopsis thaliana*

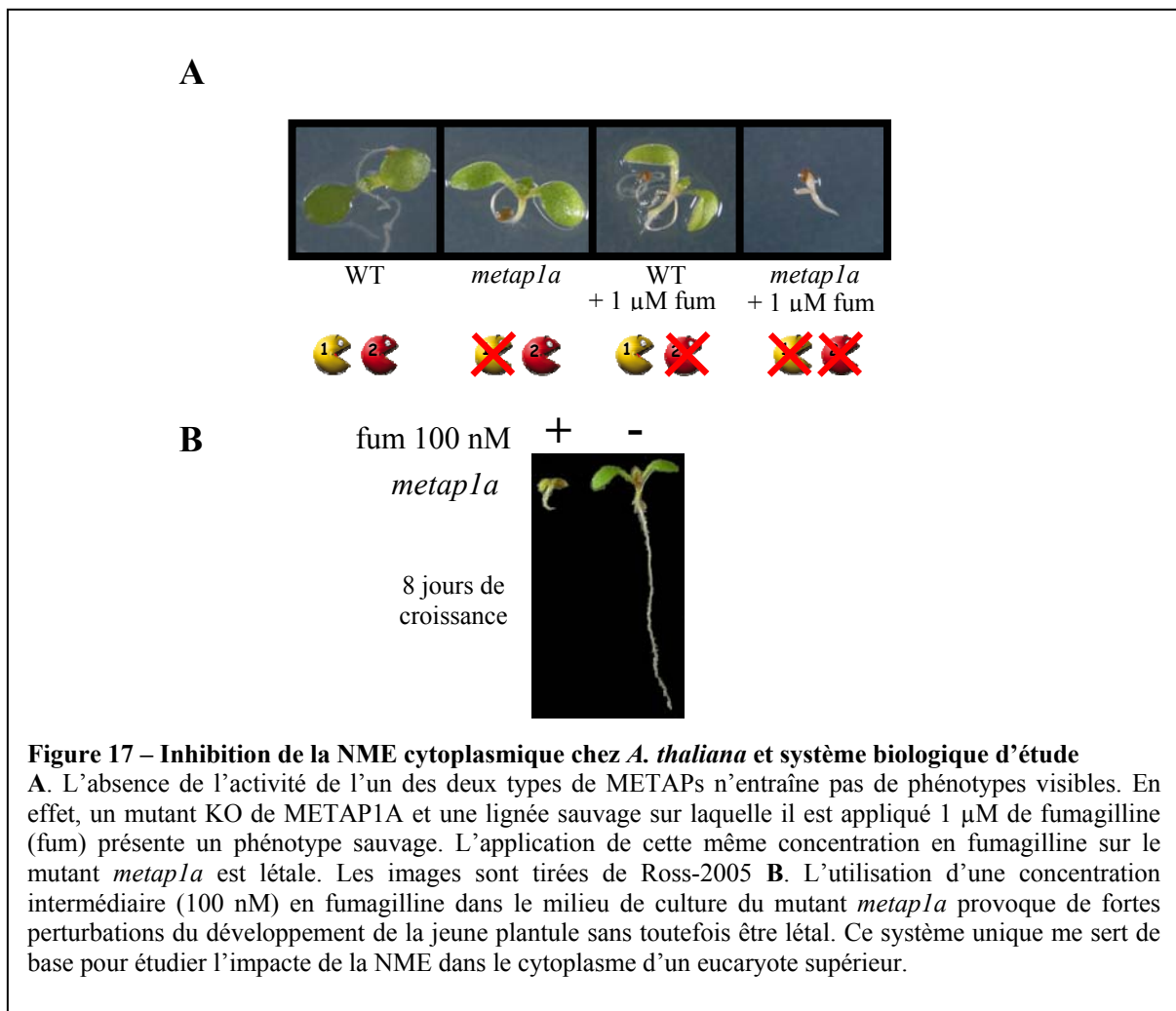
1. Introduction

La NME est un processus essentiel dans tous les organismes vivants et est une cible thérapeutique reconnue pour un nombre important d'affections. Cependant, les bases moléculaires de ce processus restent très peu comprises en particulier dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs. Dans cet objectif, j'ai utilisé la plante *Arabidopsis thaliana* comme système modèle pour étudier l'impact physiologique de la NME dans le cytoplasme d'un eucaryote supérieur. Dans le cytoplasme d'*A. thaliana* il existe une METAP de type 1A (At2g45240) et deux METAP2s : METAP2A et METAP2B (At2g44180 et At3g59990 respectivement). Les METAP1 et 2 ont une spécificité de substrats très similaire *in vitro*. En effet, la METAP1 d'*E. coli* et la METAP2 de *P. furiosus* qui sont homologues à la METAP1 et aux METAP2s d'*A. thaliana* respectivement ont été purifiées et leur activité, testée sur différents peptides substrats, a démontré une spécificité de substrat similaire [275]. Il a été prouvé que l'absence d'activité de l'un des deux types de METAPs chez *A. thaliana* n'induit pas de phénotype visible suggérant la redondance fonctionnelle entre les deux types de METAPs (Fig. 17A) [82]. Cette redondance est également rendue possible car les deux types de METAPs sont exprimées dans tout les tissus et stades de développement de la plante [82]. En outre, il semble que l'activité POEP soit absente des METAP2s d'*A. thaliana* tout comme chez la levure [60]. Des lignées de plantes dont l'expression des deux METAP2s est fortement diminuée par ARNi présentent un phénotype sauvage [82]. Cela suggère que l'activité POEP, essentielle à la traduction protéique (pour revue [276]), n'est pas portée par les METAP2s d'*A. thaliana*. De même, chez la levure, le mutant inactivé pour la METAP2 est parfaitement viable ce qui suggère l'absence d'activité POEP de la METAP2 chez cet organisme [52]. Par conséquent, l'utilisation d'approches permettant de diminuer la quantité de METAP2 chez ces organismes est donc possible.

Afin de diminuer l'activité des METAP2s chez *A. thaliana*, nous pouvons également utiliser des inhibiteurs tels que la fumagilline. La fumagilline inhibe spécifiquement les METAPs de types 2. En effet, la fumagilline se lie à un résidu histidine précis de la METAP2 qui est également présent dans la METAP1 d'*E. coli*. Néanmoins, à cause des résidus entourant cette histidine et de la faible flexibilité de ce résidu dans la METAP1, la fumagilline

n'inhibe pas les METAP1s [46, 97]. De plus, l'application de fumagilline dans le milieu de culture d'un mutant nul de METAP2 chez la levure n'a pas d'effets [52]. En outre, la fumagilline n'inhibe pas l'activité POEP de la METAP2 humaine [277].

Ce chapitre décrit la découverte des événements précoces associés à l'inhibition de la NME cytoplasmique en utilisant *A. thaliana* comme système modèle. Cela a abouti à la parution d'un article (voir Annexe 1). Un résumé de cet article est réalisé dans le sous-chapitre ci-après (2.). Le sous-chapitre 3 décrit les différents contrôles et expériences additionnels associés à cet article mais qui n'ont pas été publiés ou en tant que données supplémentaires.



2. Résumé de l'article: « Cotranslational Proteolysis Dominates Glutathione Homeostasis to Support Proper Growth and Development » (Annexe 1 et [1])

Afin d'étudier le rôle de la NME cytoplasmique chez *A. thaliana*, j'ai utilisé un

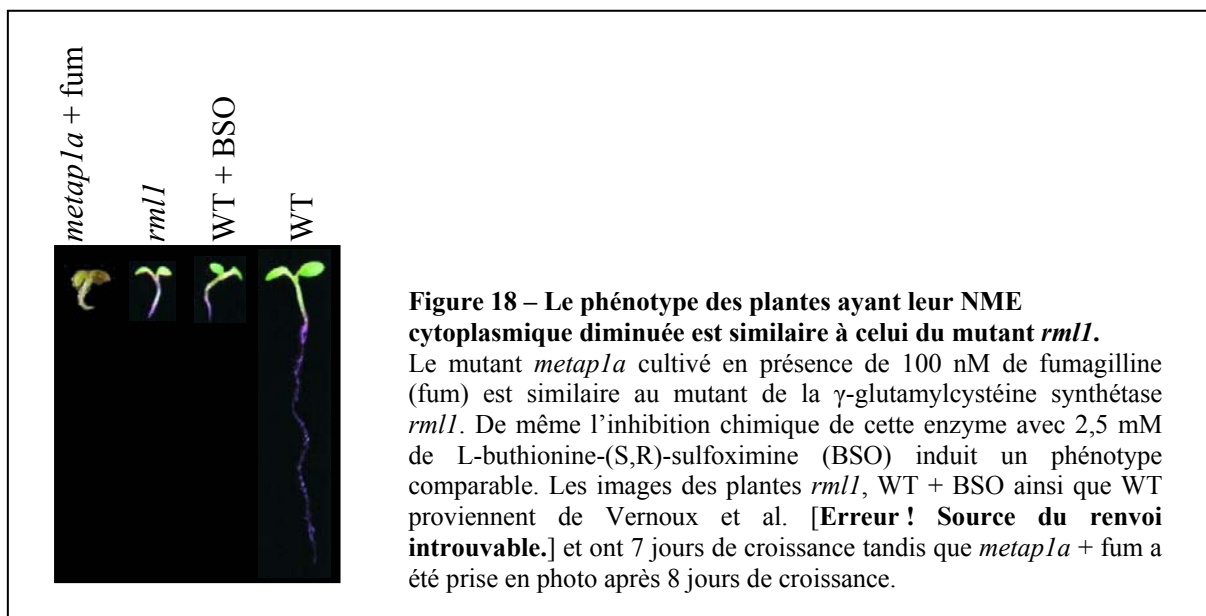
système original mis au point chez ce modèle avant mon arrivé au laboratoire. Ce système repose sur l'utilisation d'un mutant nul de la METAP1A (*metap1a*) et sur la fumagilline, inhibiteur spécifique des METAP2s [82]. L'absence de la METAP1A n'induit pas de phénotypes visibles, c'est le cas également des lignées sauvages ayant de la fumagilline dans leur milieu de culture indiquant la redondance fonctionnelle des deux types de METAPs cytoplasmiques chez *A. thaliana* (Fig. 17.A) [82]. L'insensibilité des plantes WT à la fumagilline suggère que cette molécule n'affecte pas le développement de la plante et n'inhibe pas l'activité de protéines essentielles [82] (Fig. 17.A). La comparaison des profils électrophorétiques bidimensionnelles entre les plantes sauvages et le mutant *metap1a* n'a pas permis de déceler de différences significatives pour plusieurs centaines de spots comparés [82]. Il a également été démontré au laboratoire qu'un niveau minimal d'activité METAP cytoplasmique est requis pour le développement normal de la plante [82].

L'ajout de fumagilline dans le milieu de culture des mutants nuls pour la METAP1A induit une diminution de la croissance de la plantule et ainsi un phénotype nain. La sévérité du phénotype est proportionnelle à la concentration de l'inhibiteur jusqu'à la mort de l'organisme. Par conséquent, la NME cytoplasmique est essentielle chez *A. thaliana* comme dans tous les autres organismes étudiés jusqu'à présent [81] (Fig. 17.A). J'ai utilisé ce système biologique d'étude original afin de comprendre pourquoi la NME est un mécanisme essentiel, c'est-à-dire pourquoi le maintien de la méthionine N-terminale induit un phénotype si drastique. En effet, ce système me permet d'ajuster le niveau de la NME cytoplasmique en jouant sur la concentration de la fumagilline appliquée sur les plantes dépourvues de METAP1A. Nous avons montré que la sévérité du phénotype de la lignée *metap1a* est directement corrélée à la concentration en fumagilline présente dans le milieu de culture et donc à son tour au niveau d'inactivation de la NME. Dans le but de déterminer les composants les plus sensibles à l'inhibition de la NME, j'ai initié une caractérisation fine du mutant *metap1a*. Nous y avons induit une inhibition partielle de la NME cytoplasmique, ce qui provoque un phénotype sévère sans toutefois tuer la plante. Concrètement, ce phénotype est visualisable de manière reproductible en présence de 100 nM de fumagilline appliqué sur le mutant *metap1a* (Fig. 17.B).

L'effet global de l'inhibition de la NME cytoplasmique sur le protéome a été étudié pour identifier les différences en termes d'accumulation et de migration des protéines. Cette inhibition partielle de la NME cytoplasmique a été confirmée par analyse MS/MS de peptides

N-terminaux identifiés. Lors de la diminution de la NME cytoplasmique, nous avons observée une rétention complète ou partielle de la méthionine N-terminale sur un certain nombre de protéines identifiées. Une telle inhibition a été retrouvée pour 40 % des *N-termini*.

Les profils électrophorétiques bidimensionnels issus de ces expériences ne montrent pas de bouleversement total de la migration lors de la diminution de la NME cytoplasmique. En revanche, la caractérisation de 441 spots par MS/MS a révélé une augmentation de la quantité de protéines pour uniquement 11 spots tandis que pour 100 spots la quantité de protéines diminue lors de l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique. La caractérisation de ces protéines différentiellement accumulées nous a permis de constater que la majorité d'entre elles font parties des thiols protéines, c'est-à-dire des protéines qui dépendent de manière directe ou indirecte du glutathion (*e.g.*: de l'état redox de la cellule ou /et de la glutathionylation, une modification post-traductionnelle). De plus, nous avons constaté que le phénotype des plantes ayant leur NME cytoplasmique diminuée est très similaire aux mutants de la γ -glutamyl-cystéine synthétase (Fig. 18), première enzyme de la voie de biosynthèse du glutathion. De même, l'inhibition de l'activité de cette enzyme par la L-buthionine-*S,R*-sulfoximine (inhibiteur spécifique de cette enzyme) induit un phénotype similaire (Fig. 18). Cela mis ensemble avec les analyses protéomiques nous a permis d'émettre l'hypothèse que le phénotype induit par l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique est provoqué par une altération de l'homéostasie du glutathion cellulaire.



Afin de tester cette hypothèse, les plantes dont la NME cytoplasmique est diminuée ont été cultivées en présence de différents métabolites incluant le glutathion. L'application de

glutathion réduit ou de cystéine sur ses plantes restaure un phénotype sauvage. De même, cette capacité du glutathion réduit et de la cystéine à compléter la diminution de la NME cytoplasmique a été également vérifiée chez la levure et une archée démontrant le caractère ubiquitaire de la liaison entre l'inhibition de la NME cytoplasmique et l'homéostasie du glutathion cellulaire. La description des expériences réalisées avec différents métabolites est faite dans les parties suivantes.

Afin de comprendre pourquoi et comment le glutathion réduit (GSH) complète le phénotype des plantes ayant leur NME cytoplasmique diminuée, l'analyse de différents métabolites thiolés a été réalisée dans nos échantillons. De façon surprenante, la majorité des composés thiolés s'accumulent lors de l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique et concerne les formes réduites et oxydées des molécules. Finalement, la constante physiologique importante pour l'homéostasie redox cellulaire, le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est altérée lors de la diminution de la NME cytoplasmique. En effet, ce rapport essentiel pour le développement de la plante augmente durant la croissance de la plantule tandis qu'il reste constant et bas lors de l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique. Par conséquent, le défaut de NME cytoplasmique empêche l'ajustement de l'homéostasie du glutathion à un niveau suffisamment réduit pour assurer un développement correct de la plante.

Une des activités enzymatiques qui influence grandement le rapport GSH/GSSG est la glutathion réductase qui régénère le GSH à partir du GSSG en utilisant le NADPH comme pouvoir réducteur. Ce cofacteur est donc essentiel pour conserver un rapport GSH/GSSG suffisamment réduit. Des expériences de complémentation et des dosages de NADPH ont montré un défaut de NADPH lors de l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique expliquant l'échec des cellules ayant un défaut de NME cytoplasmique à conserver le rapport GSH/GSSG suffisamment haut. De plus, les analyses protéomiques ont conforté ces données car elles ont révélé qu'un ensemble d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du NADPH sont sous accumulées lors de la diminution de la NME cytoplasmique. Les résultats des dosages des différents nicotinamides sont décrits dans la partie F. En outre, le rapport GSH/GSSG étant altéré par les ROS lors d'un stress oxydatif, j'ai vérifié l'état d'oxydation général de la cellule ainsi que l'activité de différentes enzymes antioxydantes. Ces résultats sont décrits en partie B. De même, j'ai essayé d'augmenter la sensibilité à la fumagilline du mutant *metap1a* en supprimant l'activité de la glutathion réductase cytosolique, ces

expériences sont décrits dans la sous partie D.

Le défaut de NADPH explique au moins partiellement l'état oxydé du glutathion cellulaire. Néanmoins, l'augmentation de la quantité de glutathion total (GSH+GSSG) ainsi que l'accumulation des différents composés thiolés notamment la cystéine ne peut pas s'expliquer par le défaut de NADPH. Afin de savoir si la cystéine est le seul acide aminé qui s'accumule dans nos conditions, le dosage des différents acides aminés a été réalisé. Les résultats montrent que beaucoup d'acides aminés s'accumulent lors de la diminution de la NME cytoplasmique et que cette accumulation s'accroît au cours du développement de la plantule. Finalement, une analyse plus large par GC-TOF-MS a confirmé l'augmentation de la quantité d'acides aminés libres cellulaires. Nos analyses protéomiques n'ont pas mis en évidence une accumulation d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés. Au contraire, certaines de ces enzymes sont moins abondantes lors de la diminution de la NME cytoplasmique. C'est le cas notamment de la cystéine synthase et de la glutamine synthétase. Par conséquent, ces données suggèrent fortement que l'augmentation de la quantité d'acides aminés libres cellulaires est due à un niveau de protéolyse plus élevé.

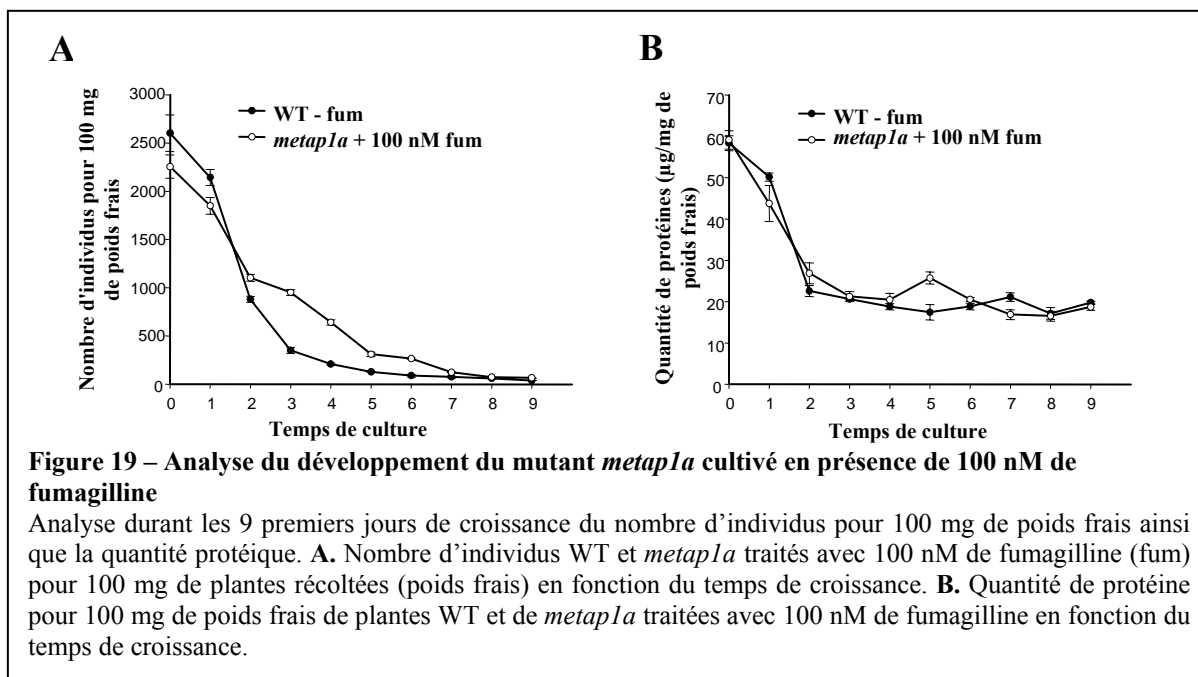
En effet, différentes expériences incluant électrophorèses et chromatographies d'exclusion de taille ont montré indépendamment une augmentation de la quantité de peptides lors de l'inhibition de la NME cytoplasmique. De plus, l'analyse MS/MS de bandes électrophorétiques de bas poids moléculaires fortement accumulées lors de l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique a montré qu'il s'agit majoritairement de produits de dégradation de protéines de plus haut poids moléculaire. Finalement, le dosage de différentes activités protéasiques a été réalisé afin de déterminer qu'elles peuvent être les protéases responsables de cette augmentation de la protéolyse. Les expériences réalisées n'ont pas permis de déceler un changement global de l'activité protéolytique cellulaire. Néanmoins, il y a quelques modifications d'activités liées au protéasome. Dans leur ensemble, ces données appuient l'hypothèse que l'augmentation de la protéolyse est principalement due à l'augmentation du nombre de protéines substrats d'une dégradation rapide.

3. Contrôles et expériences additionnels effectués

A. Contrôle du matériel végétal utilisé et choix de normalisation

Le mutant *metapla* présente un développement affecté en comparaison à une plante

sauvage. Afin, de normaliser correctement toutes nos données et ne pas avoir de biais dus à cette différence phénotypique j'ai décidé d'analyser le nombre d'individus et la quantité de protéines présente pour 100 mg de matériel végétal frais, correspondant à la quantité de matériel couramment utilisée lors de mes analyses. Pour les plantules sauvages et celles ayant un défaut de NME, le nombre d'individus pour 100 mg de poids frais diminue au cours du développement de la plantule (Fig. 19.A), ce qui correspond à la croissance des plantes. Les deux courbes présentent une tendance très similaire avec une légère différence uniquement aux alentours du troisième jour de croissance (Fig. 19.A). Pour ce que concerne la quantité de protéine pour 100 mg de matériel végétal (Fig. 19.B), les courbes décroissent très rapidement ce qui correspond à la germination et la sortie de la radicule de la graine. En effet, les graines ont une grande quantité de protéines notamment celles de réserve. Encore une fois, les courbes sont superposables sur toute la durée de l'analyse (de 0 à 9 jours de croissance). Finalement, le phénotype sévère observé lors de la diminution de la NME cytoplasmique n'est pas si différent en termes de nombre d'individus et de quantité de protéine en comparaison au WT puisque la quantité de protéine ne varie pas pour 100 mg de poids frais et il y a seulement une différence transitoire en terme de nombre d'individus. Des données similaires à celles obtenues avec la plante sauvage ont été observées lorsque que la lignée sauvage est mise en présence de 100 nM de fumagilline ainsi que la lignée *metap1a* qui croît sans fumagilline. Par conséquent, nous avons décidé d'utiliser dans nos expériences entre deux et trois temps de croissance (3, 5 et 8 jours) ce qui permet d'avoir une vision cinétique et dynamique de mes résultats. De plus, étant donné que la quantité de protéines est similaire pour 100 mg de poids frais dans nos deux conditions, j'ai décidé de normaliser mes différents résultats par la quantité de protéines.



B. Retour sur les activités antioxydantes et état d'oxydation cellulaire

Le glutathion sur forme réduite (GSH) est l'antioxydant majeur des cellules. Le GSH agit comme un tampon antioxydant contre les ROS, espèces réactives de l'oxygène, régissant « l'homeostasie » rédox intracellulaire. En effet, les deux états (réduit et oxydé) d'une même molécule forment un « couple rédox ». Les conditions rédox régnant dans la cellule sont évaluées par le rapport des concentrations des formes oxydée et réduite d'un couple rédox prépondérant comme celui du glutathion. C'est le couple glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH-GSSG) qui agit comme un tampon rédox. Une perturbation de l'homéostasie rédox du glutathion est souvent associée à un « stress oxydant ». En général, ce stress est révélé par une augmentation du taux de glutathion oxydé (GSSG), du taux de monodehydroascorbate, des lésions de l'ADN, et une décroissance non seulement du taux des thiols protéiques (SH), de glutathion réduit (GSH) mais aussi une modification des activités glutathion peroxydase (GPx), catalase (CAT), glutathion réductase (GR) et des superoxydes dismutases (SODs). Etant donné que les taux de GSH, GSSG et leur rapport sont affectés dans les plantes ayant un défaut de NME, j'ai voulu vérifier que la diminution de la NME n'est pas associée à un état oxydatif généralisé de la cellule. La carbonylation des protéines est un type d'oxydation très fréquent et est un marqueur connu de l'état d'oxydation de la cellule [278, 279, 280]. La détection de ces groupements est aisée notamment par la conjugaison du

dinitrophenylhydrazine sur les groupements carbonyles, suivie d'une détection avec un anticorps reconnaissant le conjugué formé [278]. En utilisant cette technique pour déterminer l'état oxydatif général de la cellule dans nos différentes conditions, nous avons observé que l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique n'induit pas une oxydation généralisée de la cellule. En effet, pas de différence d'accumulation de protéines carbonylées n'est observée dans nos conditions (Fig. 20). Néanmoins, des groupements carbonyles sont détectés dans toutes les conditions, ce qui est en accord avec d'autres études ayant montré une augmentation de la carbonylation protéique durant les premiers jours du développement de la plantule [281, 282]. Par conséquent, ces données montrent que l'inhibition partielle de la NME n'induit pas une oxydation cellulaire généralisée. Ces données ont été confirmées par des mesures de l'activité de l'ascorbate peroxydase et de la catalase. L'ascorbate peroxydase et la catalase sont responsables de la réduction et de la dismutation de l'eau oxygénée respectivement. Les résultats ne montrent pas de modifications de l'activité ascorbate peroxydase et une faible diminution de l'activité catalase lorsque la NME est diminuée partiellement par rapport au sauvage (Fig. 21).

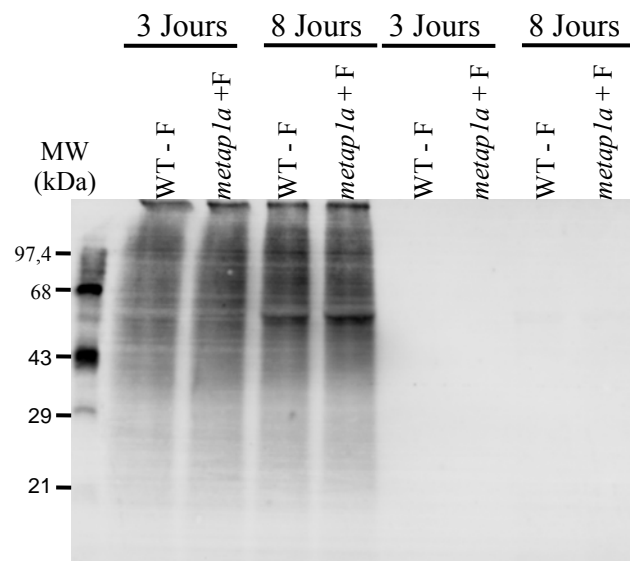
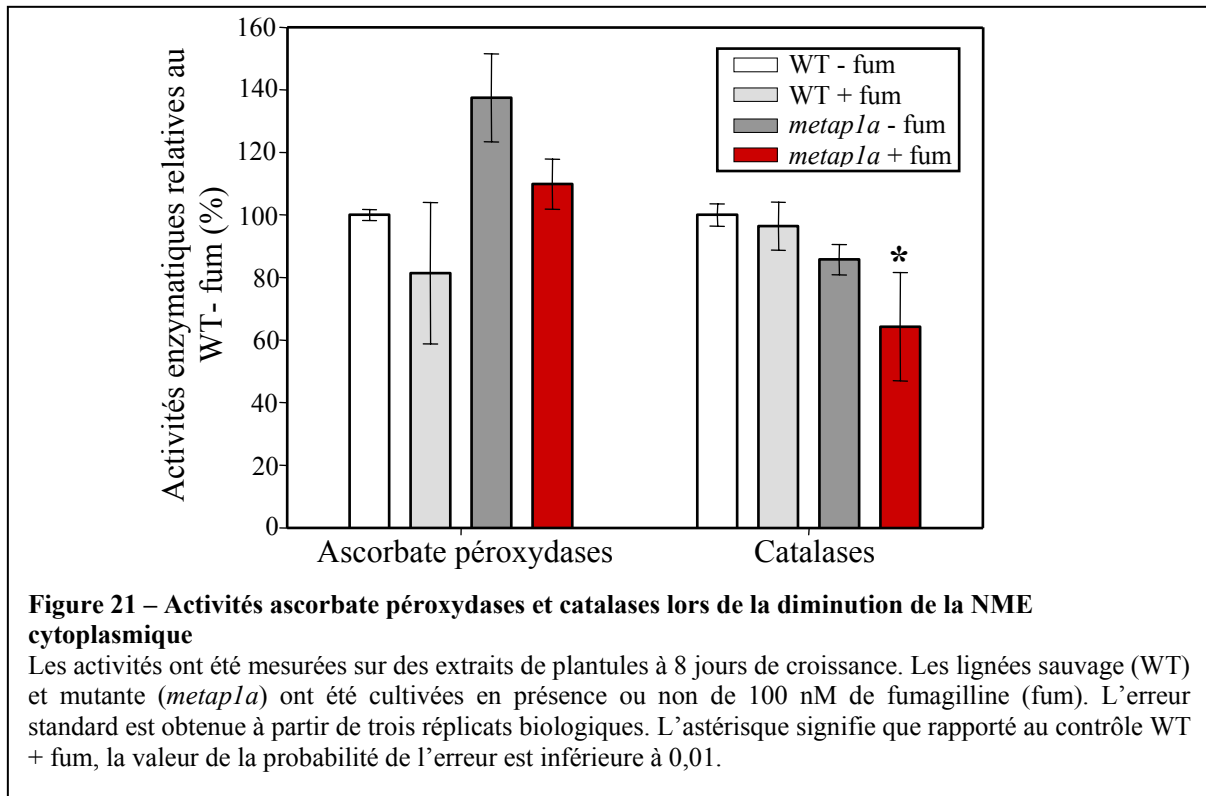


Figure 20 – Etat d'oxydation protéique lors de la diminution de la NME cytoplasmique

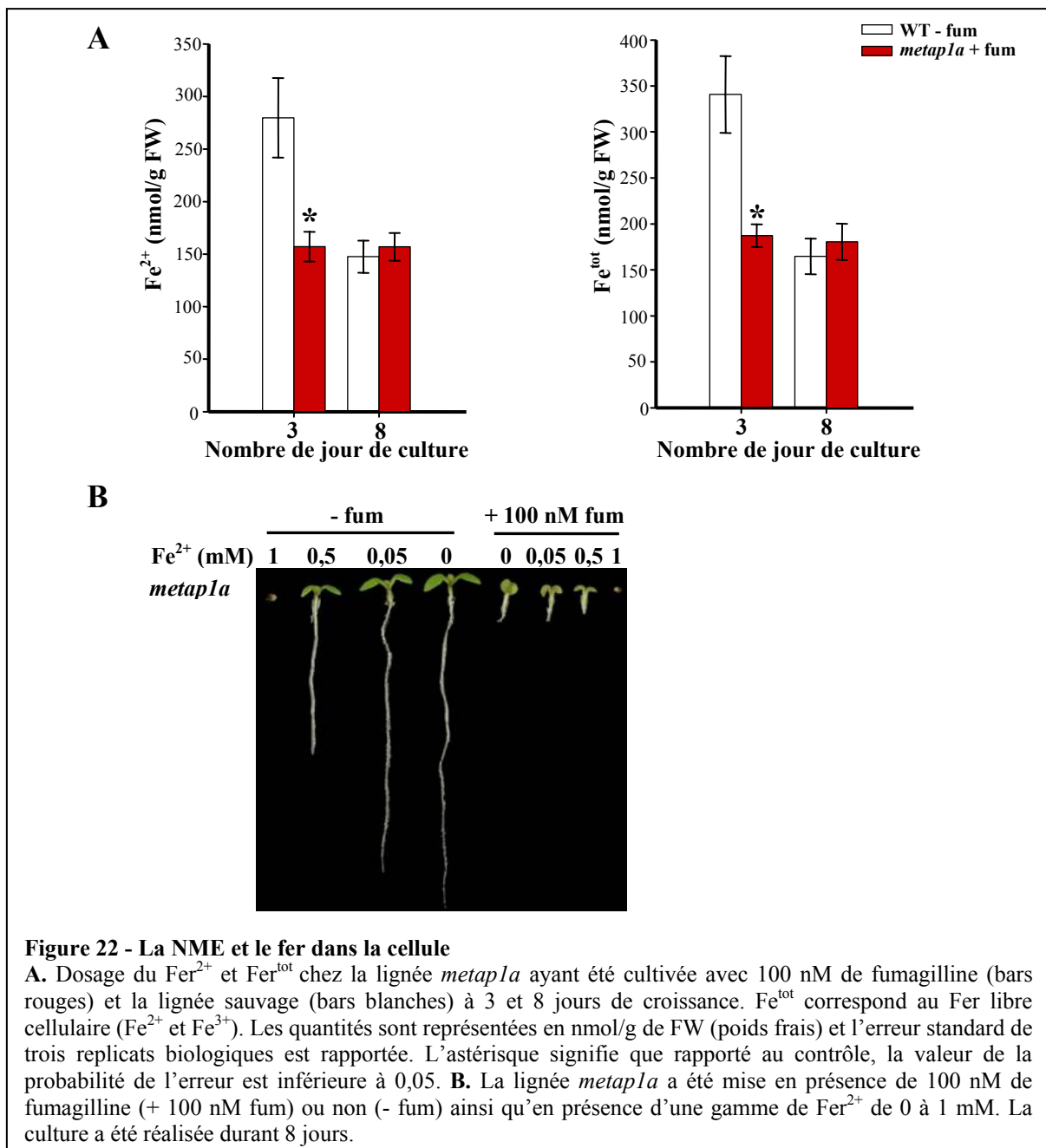
Le niveau de carbonylation des protéines a été analysé par western blot pour les échantillons sauvages (WT) ainsi que pour le mutant *metap1a* cultivé en présence de 100 nM de fumagilline (F) après 3 et 8 jours de culture. Un western blot représentatif est montré. Les quatre échantillons de gauche ont subi le même traitement sauf la dérivation et constitue donc le contrôle de spécificité de l'anticorps.



C. NME et fer chez *A. thaliana*

Le pool de fer labile est le fer cellulaire disponible et a plusieurs fonctions au sein de la cellule: (i) utilisé pour le transport, (ii) régule l'expression de certains gènes (récepteur transferrine, ferritine...), (iii) régule l'activité des protéines contenant du fer et (iiii) est impliqué dans la réaction de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$). En outre, la maturation des protéines à centre [fer/S] est essentielle. En effet, l'absence d'une protéine impliquée dans la maturation de ces centres est létale et il a été suggéré récemment que cette maturation fasse intervenir le glutathion [283]. C'est dans ce contexte que j'ai étudié le fer cellulaire lorsque la NME cytoplasmique est diminuée. Le Fe^{3+} est très peu abondant par rapport au Fe^{2+} . J'ai utilisé un chélateur chromogène dérivé de la phénanthroline permettant de quantifier directement le Fe^{2+} . Les résultats montrent que la quantité de Fe^{2+} et plus généralement de Fe^{tot} est réduite de moitié lors de la diminution de la NME cytoplasmique à 3 jours de croissance mais que dès 8 jours les niveaux sont redevenus similaires (Fig. 22A). De plus des expériences de complémentation ont été menées avec du Fe^{2+} et ne montre pas de complémentation et un effet néfaste sur les plantes contrôles (Fig. 22B). Une absence de complémentation a également été observée avec le Fe^{3+} [1] ainsi qu'un effet très néfaste sur

les plantes contrôles. La lignée sauvage se comporte de façon similaire aux plantes *metapla* qui ont été cultivées sans fumagilline vis-à-vis du fer. Etant donné que la quantité de fer cellulaire est perturbée uniquement transitoirement lors de la diminution de la NME cytoplasmique et que nous n'avons pas observé de complémentation, nos données suggèrent que le fer libre cellulaire n'est pas la cause du phénotype constaté.



D. NME et métabolisme du glutathion

Comme je l'ai décrit précédemment, afin de vérifier notre hypothèse qu'une diminution de la NME cytoplasmique induit une perturbation de l'homéostasie du glutathion cellulaire j'ai testé l'effet de l'ajout dans le milieu de culture du glutathion réduit. L'ajout de cette molécule ainsi que son précurseur limitant, la cystéine restaure un phénotype sauvage dans le mutant nul *metap1a* cultivé en présence de fumagilline [1]. Nous avons également démontré que cette complémentation est indépendante d'une interaction entre les thiols et la fumagilline. De plus, une complémentation du phénotype a été également observée lorsque d'autres inhibiteurs des METAP2s ont été utilisés ou quand le glutathion a été ajouté dans le milieu de culture de lignées ARNi ciblant l'expression des trois METAPs cytoplasmiques simultanément et ayant un phénotype comparable au mutant *metap1a* cultivé en présence de fumagilline.

Pour comprendre comment le glutathion complète et par quelle(s) voie(s), j'ai réalisé une série de tests de complémentation en utilisant des intermédiaires de la biosynthèse du glutathion et notamment ceux impliqués dans la biosynthèse de la méthionine (Fig. 23 et [1]). Dans ce contexte, il faut rappeler qu'un des produits de réaction de la NME est la méthionine qui est relâchée dans la cellule et qu'une interaction entre la NME et le métabolisme de cet acide aminé a déjà été suggérée chez la levure [80] et *A. thaliana* [81]. Etant donné qu'il s'agit d'un acide aminé coûteux à produire, les méthionines clivées par la NME seront réutilisées dans la cellule. La méthionine est comme le glutathion, un métabolite soufré. Dans le métabolisme, la cystéine se situe entre la méthionine et le glutathion. En prenant en compte les informations précédentes, j'ai essayé de compléter le phénotype avec de la méthionine. Elle semble compléter très partiellement et transitoirement mais de façon reproductible le défaut de développement à des concentrations allant de 80 à 500 μM . Cependant, elle inhibe la croissance aussi bien sur des plantules sauvages que mutantes (Fig. 23 et [82]). En effet, il a été précédemment suggéré que la méthionine à forte concentration inhibe l'activité des deux types de METAPs chez *A. thaliana* [82]. Ensuite, j'ai testé des dérivés de la méthionine. Le devenir métabolique majeur de la méthionine chez les plantes inclut son incorporation dans les protéines mais également son adénosylation pour former la *S*-adénosylméthionine (donneur universel de groupement méthyle) et sa méthylation pour produire la *S*-méthylméthionine (forme majeure de transport de soufre dans beaucoup de plantes [284]). Les tests de complémentation réalisés avec ces deux composés montrent qu'ils

se comportent comme la méthionine (Fig. 23). La cystathionine et l'homocystéine font parties de la voie de transsulfuration conduisant à la synthèse de méthionine à partir de la cystéine (Fig. 23 et revue dans [285]). Ces molécules induisent une complémentation partielle significative (Fig. 23). L'*o*-acétylsérine précurseur de la cystéine se comporte comme la méthionine (Fig. 23). Parmi ces métabolites, c'est l'homocystéine qui complète le mieux le défaut de développement (Fig. 23). De récentes données ont suggéré grâce à des approches de marquages qu'une voie de transsulfuration inverse peut exister chez les plantes. Elle permettrait de synthétiser de la cystéine à partir de la méthionine en subissant l'action de la méthionine γ -lyase et passerait notamment par différents intermédiaires notamment le méthanethiol et la *S*-methylcystéine (Fig. 23 et [286, 287]). Néanmoins, nos résultats montrent que la *S*-methylcystéine ne complète pas le phénotype des plantes *metap1a* + 100 nM de fumagilline et provoque une forte inhibition de la croissance des plantes contrôles (Fig. 23).

Finalement, le glutathion (composé thiolé non protéique majeur dans la cellule) étant largement impliqué dans le control de l'homéostasie redox cellulaire, nous avons testé l'effet réducteur du GSH en utilisant des réducteurs synthétiques tels que le dithiotreitol pour des tests de complémentation. J'ai observé une complémentation partielle et transitoire correspondant à la restauration de l'un des défauts provoqué par l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique (Fig. 23) et correspond très probablement à la fonction réductrice de ces molécules. L'aspect partiel et transitoire confirme que la molécule glutathion est importante pour la complémentation et pas uniquement sa fonction de réducteur. J'ai également testé l'ascorbate qui est un autre tampon redox cellulaire important. Aucune complémentation n'a été observée tout comme avec la principale forme oxydée du glutathion, le GSSG (Fig. 23). Ainsi, seul le glutathion réduit et la cystéine sont capables de restaurer un phénotype sauvage dès la germination ou sur des plantes déjà établies.

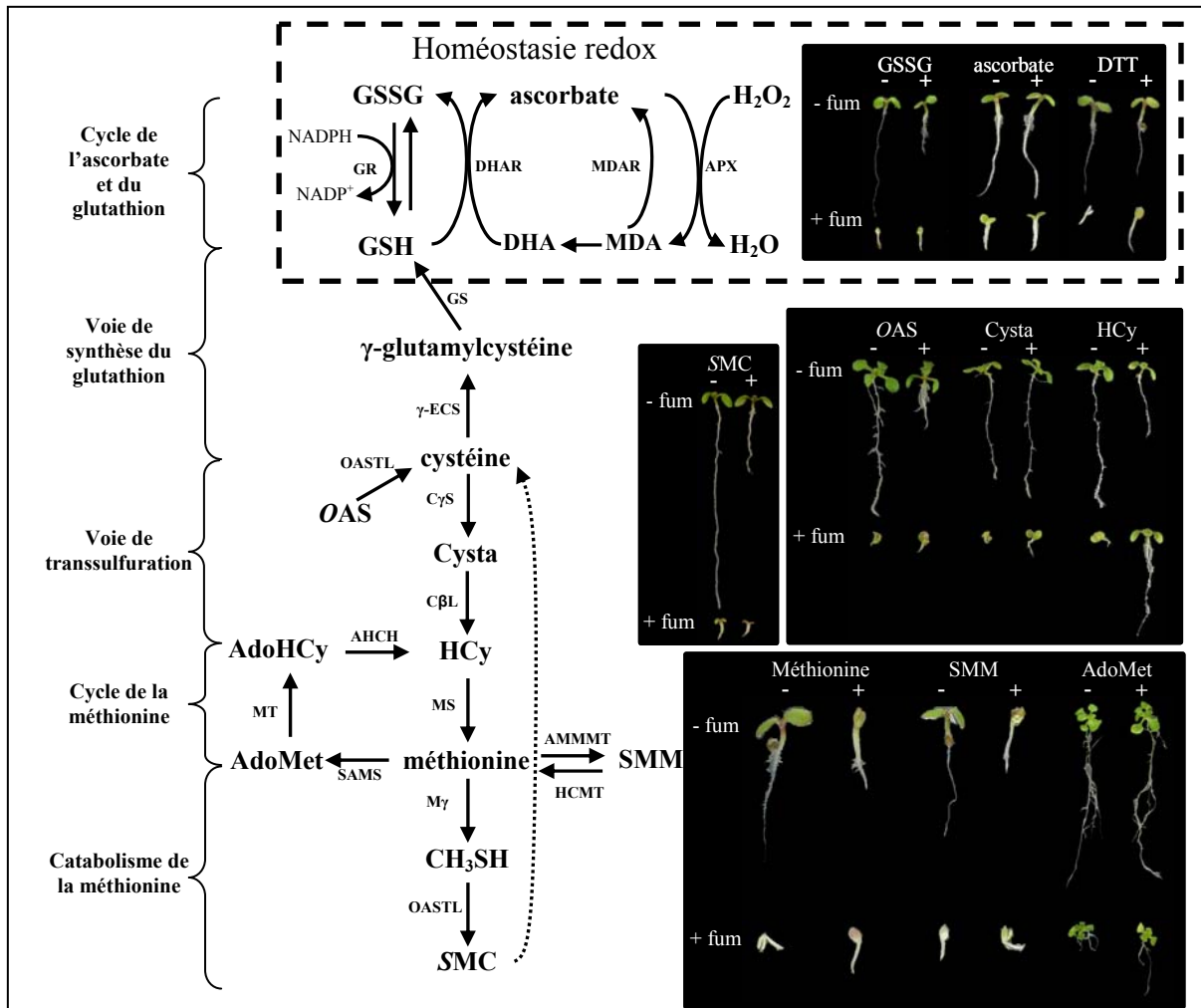


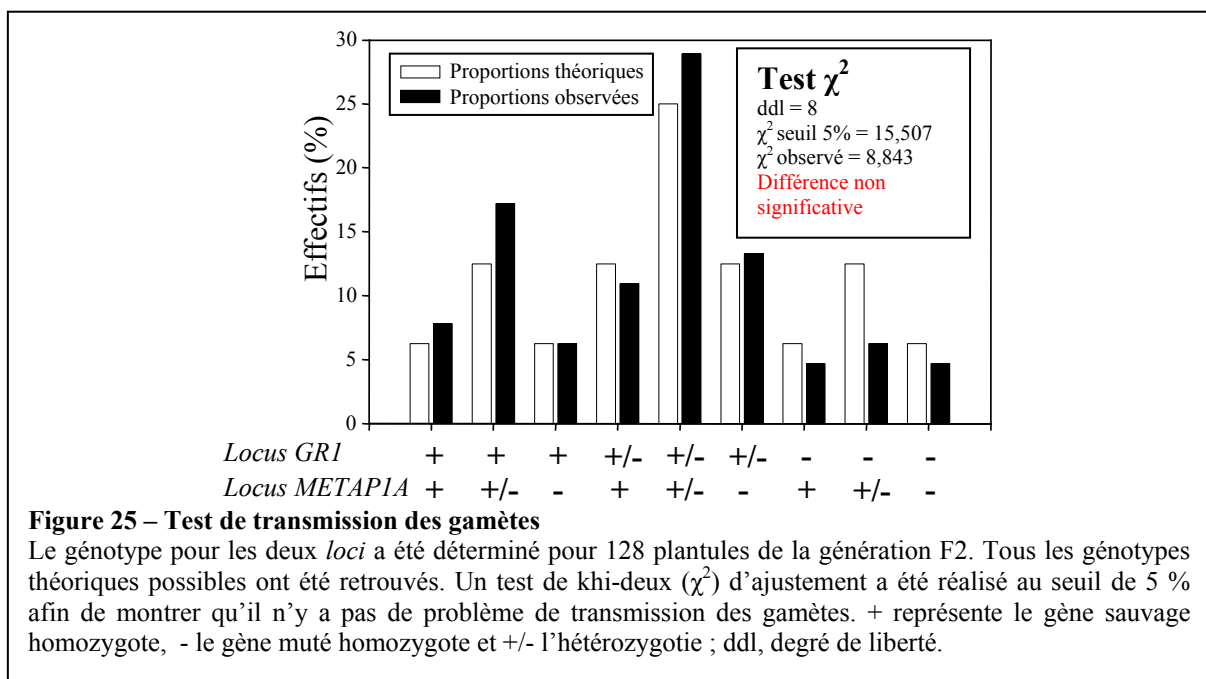
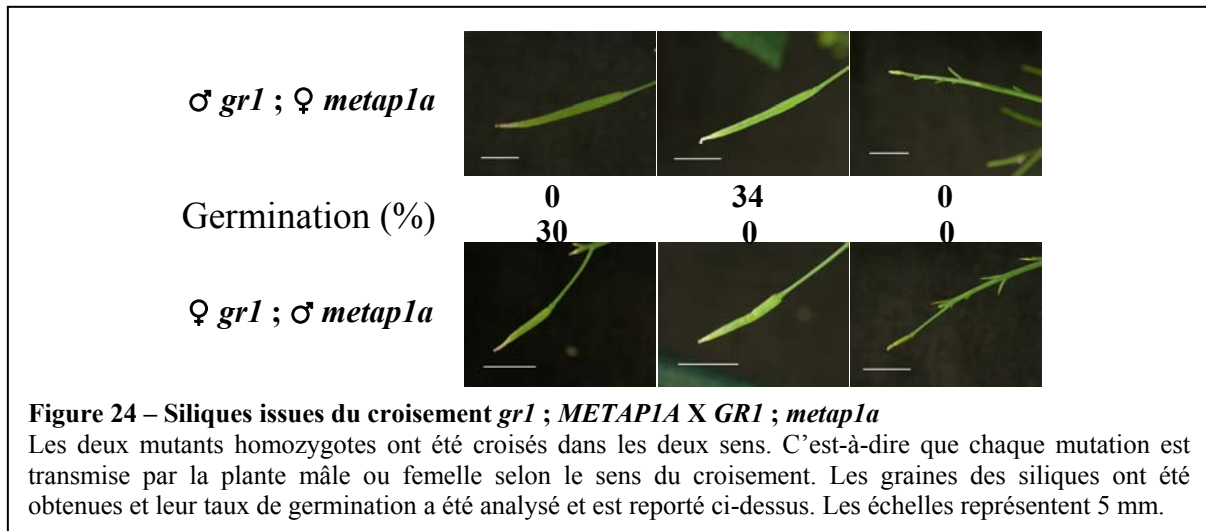
Figure 23 – Métabolisme de la cystéine et tests de complémentation.

Schéma simplifié de voies métaboliques liées à la méthionine, la cystéine et au glutathion. Les photos représentent les tests de complémentation de différents métabolites. Le mutant *map1a* a été cultivé en présence (+ fum) ou non (- fum) de fumagilline et avec (+) ou sans (-) le composé indiqué. La concentration en composé utilisé est celle qui ayant donné les meilleurs résultats de complémentation. La ligne en pointillé indique une voie de transsulfuration inverse récemment découverte [Erreur ! Source du renvoi introuvable.]. Les photos sont représentatives de plusieurs expériences indépendantes. CγS, cystathionine γ-synthase; CβL, cystathionine β-lyase; MS, méthionine synthase; SAMS, S-adenosyl-méthionine synthétase; MT, méthyltransférase; AHCH, AdoHCy hydrolase; OASTL, O-acétylsérine-thiol-lyase; γ-ECS, γ-glutamylcystéine synthétase; GS, glutathion synthétase; GR, glutathion réductase; DHAR, dehydroascorbate réductase; MDAR, monodehydroascorbate réductase; APX, ascorbate peroxydase; HCMT, HCy S-méthyltransférase; AMMMT, AdoMMet S-méthyltransférase; MγL, méthionine γ-lyase. GSH, glutathion réduit; GSSG, glutathion disulfide; DHA, dehydroascorbate; MDA, monodehydroascorbate; OAS, O-acétylsérine; Cysta, cystathionine; HCy, homocystéine; AdoHCy, S-adenosyl-homocystéine; AdoMet, S-adenosyl-méthionine; SMM, S-méthyl-méthionine; SMC, S-méthyl-

E. La glutathion réductase

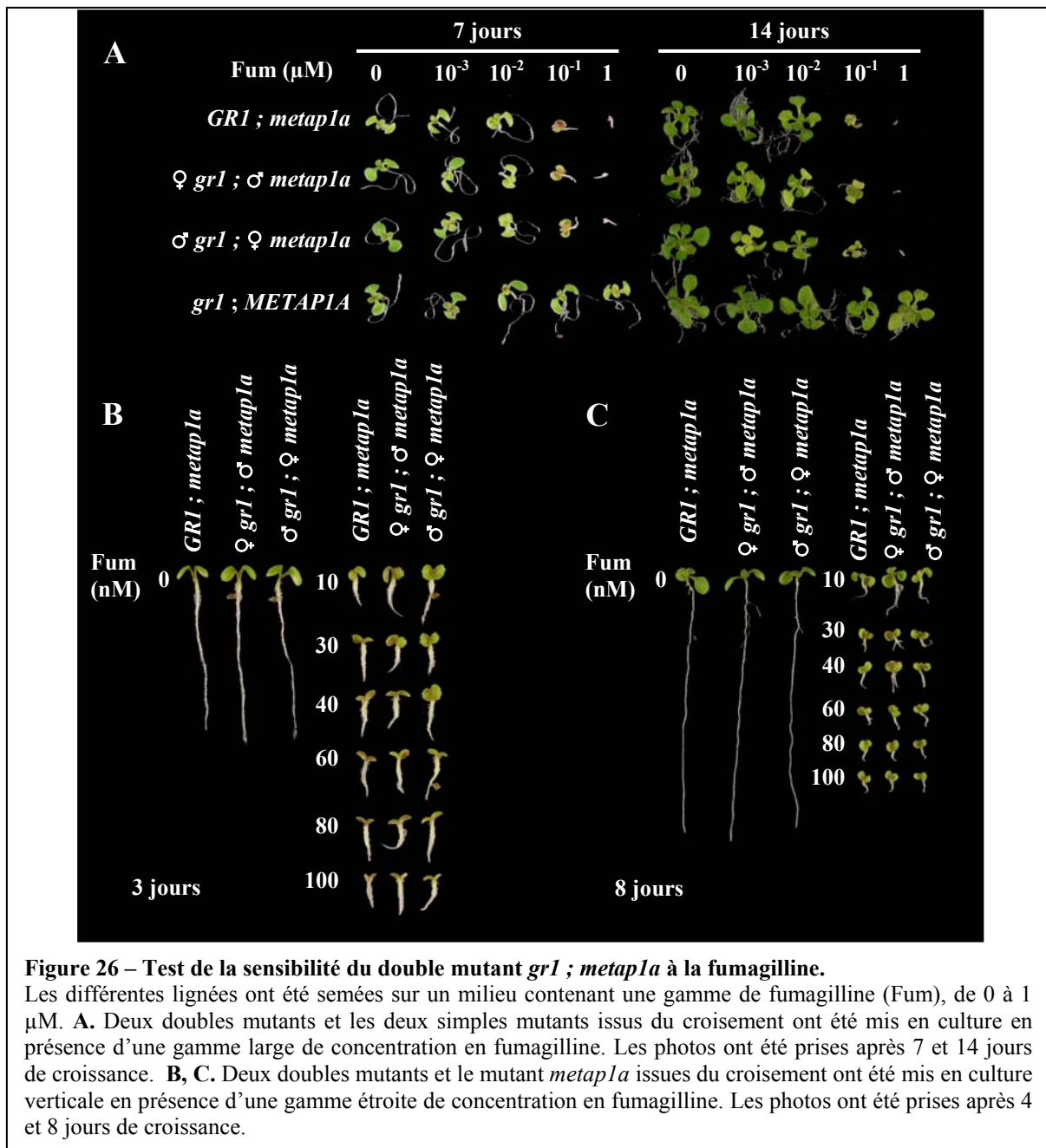
La glutathion réductase (GR) est l'enzyme responsable de la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) par conséquent c'est un acteur majeur dans le

maintien de l'état d'oxydoréduction du glutathion cellulaire. Les dosages des thiols métabolites réalisés chez les plantes ayant leur NME cytoplasmique diminuée ont montré une accumulation du GSSG [1]. Par conséquent, une absence de l'activité glutathion réductase cytoplasmique devrait accentuer le phénotype des plantules ayant leur NME cytoplasmique diminuée ou les rendre plus sensibles au traitement par la fumagilline. Pour tester cela, le Pr G. Noctor (Institut de Biologie des Plantes; Université Paris-Sud-11 ; Orsay) m'a fourni un mutant d'insertion pour le *locus* de la glutathion réductase cytosolique (GR1; At3g24170 ; lignée SALK_060425.22.65.x). Après vérification que la lignée porte effectivement l'insertion, elle a été croisée avec notre lignée *metap1a*. Le croisement a été réalisé dans les deux sens. C'est-à-dire que chaque allèle muté est transmis par la plante mâle ou femelle selon le sens du croisement. Cela avait pour intention de m'assurer que la transmission des allèles était identique quelle que soit l'origine de la mutation (maternelle ou paternelle). Les siliques issues du croisement présentent un gradient de phénotypes allant de la silique bien développée à une silique avortée dès le début de son développement quelque soit le sens du croisement (Fig. 24). La capacité des graines à germer a été testée. Seules les graines issues des siliques ayant un développement normal ont germé pour les deux sens de croisement. Cependant, le taux de germination est bas, un tiers des graines ont passé le stade de la germination (Fig. 24). Etant donné que les simples mutants de départ sont homozygotes au niveau du *locus* muté, cette génération (F1) est hétérozygote pour les *loci* codant la *gr1* et la *metap1a*, ce que j'ai vérifié. L'autofécondation de ces lignées F1 produit des graines ayant différents génotypes. Les deux gènes codant ces enzymes n'étant pas situés sur le même chromosome, il ne peut y avoir de liaison génétique. Par conséquent, je devais retrouver dans la génération F2 les 9 génotypes théoriques dont le double mutant homozygote dans des proportions de $1/16^{\text{ème}}$ si il n'y a pas de problème de transmission de gamètes ou de létalité précoce. Le génotypage des deux *loci* pour 128 plantules F2 m'a permis d'identifier 6 plantes portant la double mutation homozygote pour les deux sens de croisement confondus. J'ai également pu obtenir tous les génotypes théoriques. Un test de Chi2 (à 5%) m'a permis de conclure que la distribution des génotypes observés suit la distribution théorique (Fig. 25). Par conséquent, il n'y a pas de problèmes de transmission des gamètes mutants. Les plantes doubles mutantes homozygotes sont viables et fertiles.



Le double mutant ainsi que les simples mutants issus du croisement ont été placés en milieu de culture en présence d'une gamme large de fumagilline et leur phénotype a été observé. Comme attendu, le simple mutant *metap1a* est sensible à la fumagilline et le simple mutant *gr1* ne l'est pas. Un double mutant pour chaque sens de croisement ont été utilisés et présentent un phénotype similaire à celui des plantes *metap1a* (Fig. 26A). Cependant, j'ai pu observer qu'à 1 et 10 nM de fumagilline les deux doubles mutants présentent une coloration foliaire plus pâle que les simples mutants (Fig. 26A). Afin de voir si effectivement le double mutant présente une sensibilité accrue à la fumagilline, ils ont été cultivés en présence d'une gamme de fumagilline plus étroite, de 1 à 100 nM. Les expériences ne montrent pas de différences significatives de phénotype entre les doubles mutants et le simple mutant *metap1a*

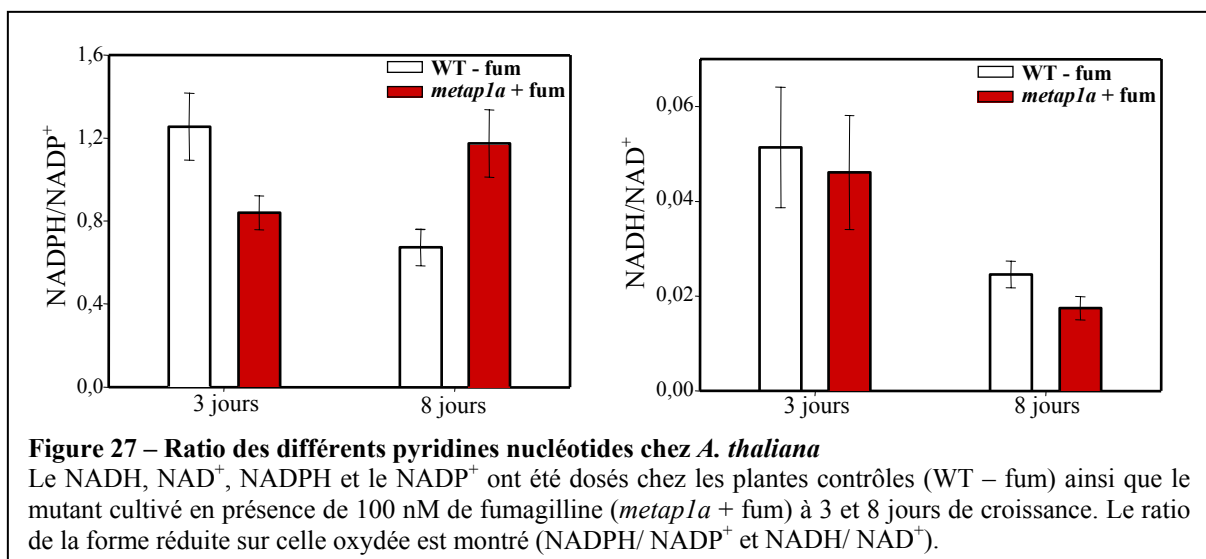
(Fig. 26.B, C). Par conséquent, l'absence de GR1 n'aggrave pas le phénotype de plantes ayant leur NME cytoplasmique diminuée. Le simple mutant *gr1* ne présente lui-même pas de phénotype visible en condition standard de culture. En outre, il a récemment été montré que le GSSG peut être réduit par un système impliquant le NADPH et les thiorédoxines et est indépendant de la glutathion réductase [288]. Enfin, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que la glutathion réductase chloroplastique (GR2) complémente le défaut de GR1 dans nos doubles mutants.



F. Le NADPH, un cofacteur important

Etant un réducteur puissant et abondant, le NADPH est au cœur du système antioxydant chez les plantes ; il y participe notamment comme cofacteur essentiel à l'activité de la glutathion réductase. Cette enzyme régénère la forme réduite du glutathion à partir de la forme disulfide. J'ai pu montrer que les plantules ayant leur NME cytoplasmique diminuée possèdent une quantité de NADPH plus faible que le contrôle durant les premiers stades de développement [1]. Etant donné que le GSSG s'accumule lorsque la NME cytoplasmique est

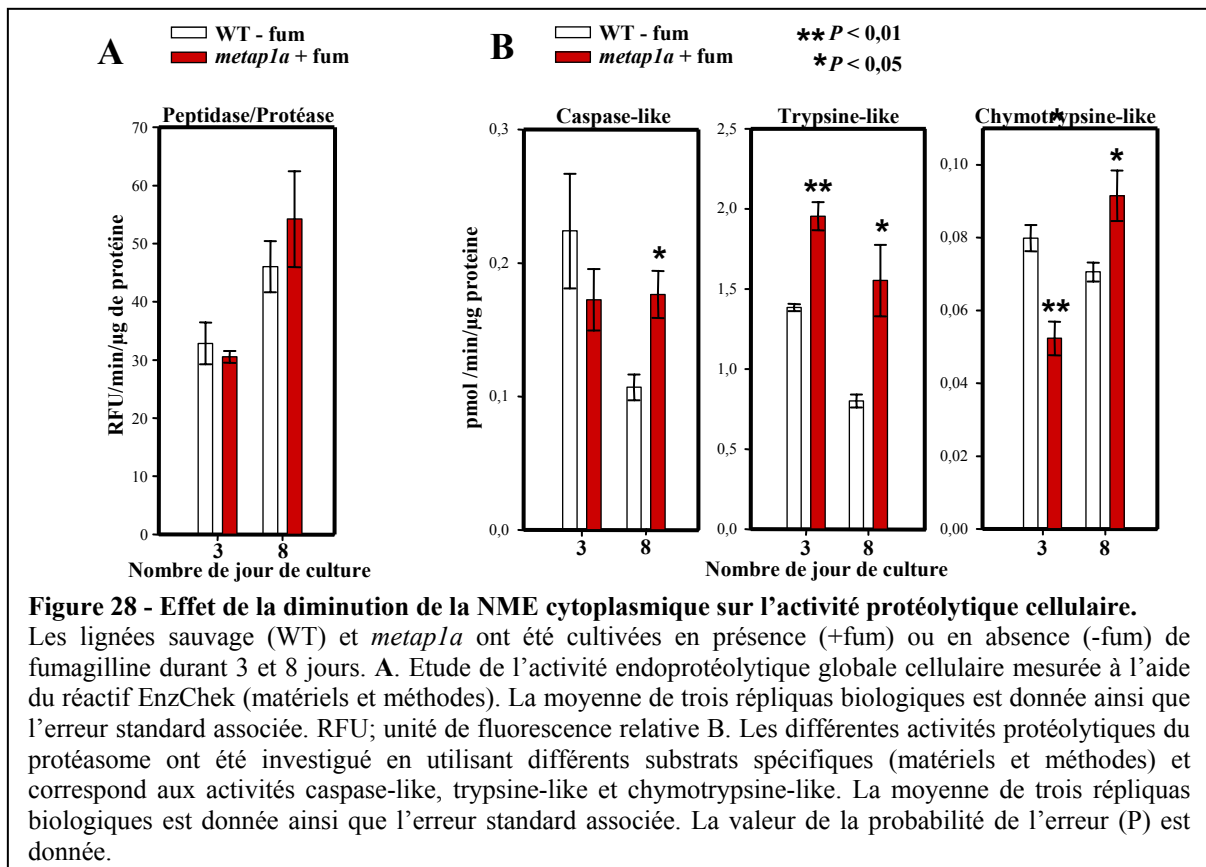
diminuée et qu'il n'y a pas une réduction de la quantité de glutathion réductase, ce faible taux de NADPH est très probablement limitant pour l'activité glutathion réductase cellulaire [1]. Ainsi, une déplétion en NADPH peut être une des causes de l'augmentation du GSSG dans la cellule lors de l'inhibition partielle de la NME. Cela a été appuyé par la complémentation du défaut du phénotype du mutant *metap1a* en présence de fumagilline que j'ai pu observer en ajoutant du NADPH dans le milieu de culture mais pas avec d'autres pyridines nucléotides [1]. En effet, le pool de nicotinamides adénines dinucléotides phosphate (NADPH et NADP^+) est perturbé lorsque la NME cytoplasmique est diminuée. Dans les plantes contrôles, le rapport de la forme réduite sur celle oxydée diminue durant le développement tandis qu'il varie peu lorsque la NME est diminuée (Fig. 27 et [1]). Tandis que le rapport $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ est perturbé, le rapport NADH/NAD^+ présente une tendance très similaire aux plantules sauvages au cours du développement, ce qui démontre encore la spécificité de la perturbation du pool de $\text{NADP}(\text{H}^+)$ lors de l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique (Fig. 27).



G. Activités protéolytiques lors de la diminution de la NME cytoplasmique.

La diminution du niveau de NME cytoplasmique entraîne une augmentation de la protéolyse. En effet, une accumulation des produits de dégradation a été constatée (voir [1]). Afin de découvrir quelles sont les activités protéolytiques impliquées dans cette dégradation des protéines ne subissant pas la NME cytoplasmique j'ai dans un premier temps mesuré l'activité endoprotéolytique globale. Les résultats (Fig. 28A) ne montrent pas un changement de l'activité endoprotéasique cellulaire. J'ai ensuite étudié plus précisément à l'aide de

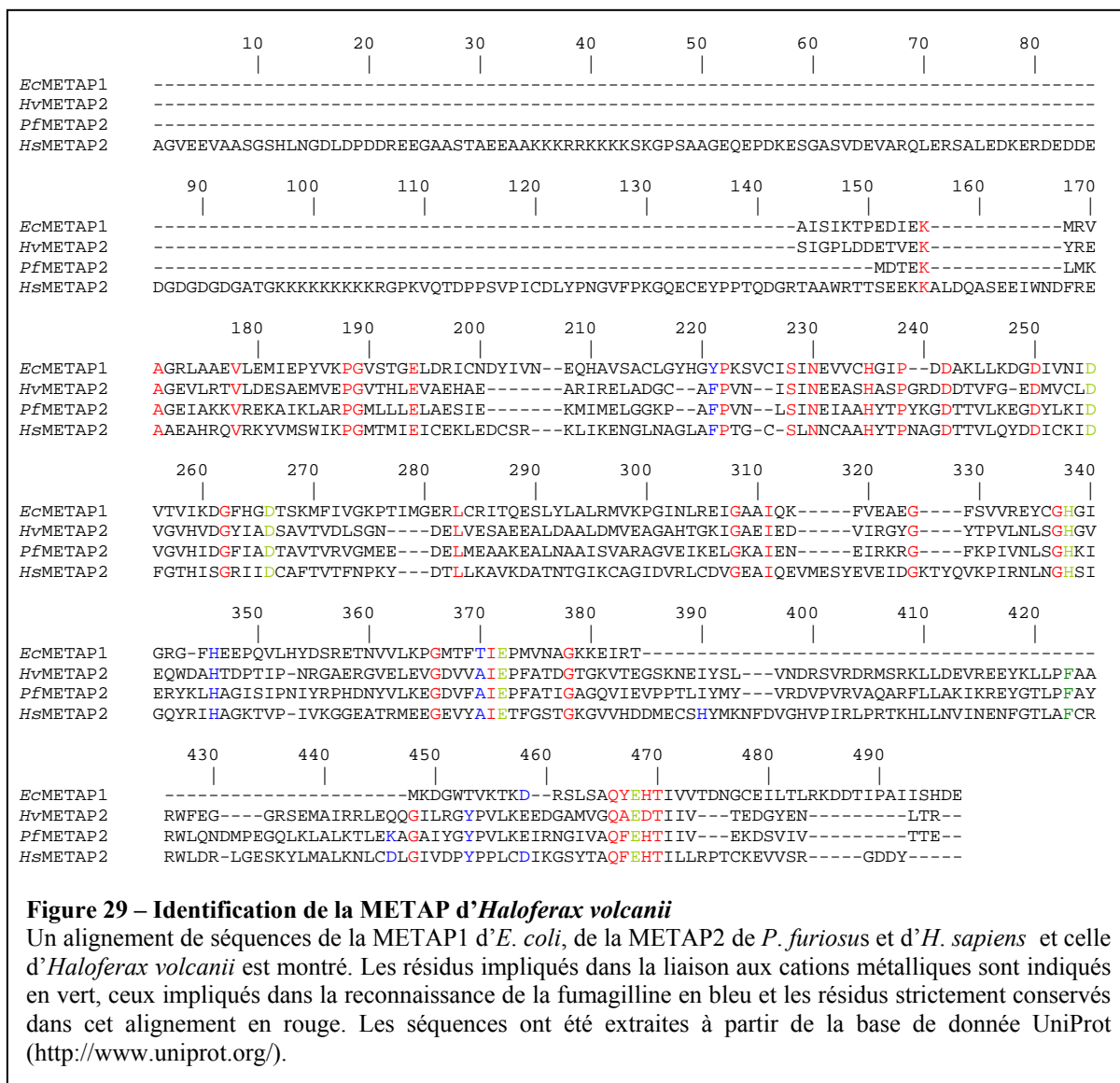
substrats spécifiques les différentes activités portées par le protéasome (activité caspase, trypsine et chymotrypsine). Les résultats montrent (Fig. 28B) quelques modifications mineures de ces activités en particulier à 8 jours de croissance. En effet, à ce stade, ces trois activités augmentent d'un facteur d'environ 1,5 pour mutant *metap1a* qui a été cultivé en présence de fumagilline en comparaison aux plantules contrôles du même temps de croissance. Néanmoins, nous ne pouvons écarter la contribution de protéases autre que le protéasome dans la mesure de chacune de ces activités. Cependant, ces résultats démontrent que la diminution de la NME cytoplasmique entraîne une modification du profil des activités protéolytiques cellulaires avec probablement l'implication du protéasome. Cela nous fournit des pistes pour continuer l'investigation des protéases impliquées dans les événements consécutifs à l'inhibition de la NME cytoplasmique.



II. Aspects universels de l'excision de la méthionine N-terminale

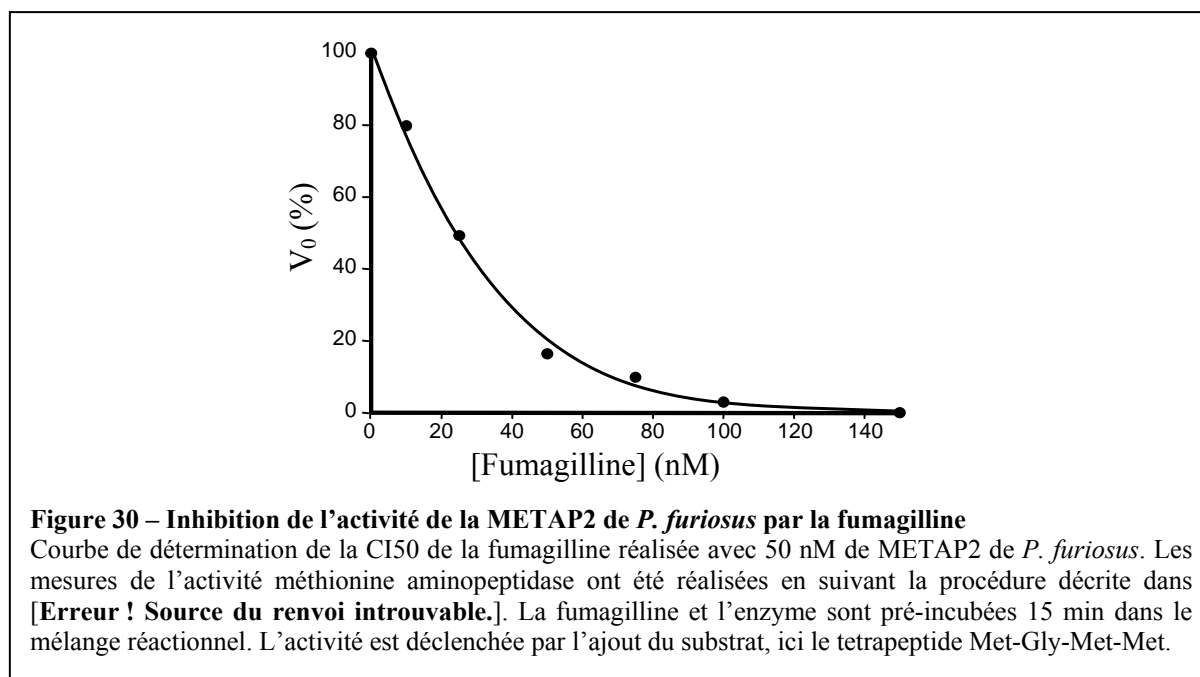
1. Excision de la méthionine N-terminale et glutathion chez les archées et les champignons

La capacité du GSH à compléter le défaut de développement induit par la diminution de la NME cytoplasmique a également été observée chez *S. cerevisiae* en utilisant un système analogue à celui utilisé chez *A. thaliana* [1]. La levure possède une METAP de chaque type. L'utilisation d'une lignée mutante pour le gène codant la METAP1 ($\Delta metap1$) nous permet de moduler la NME cytoplasmique avec la fumagilline, inhibiteur spécifique des METAP2s. La lignée $\Delta metap1$ présente un taux de croissance réduit par rapport à la lignée sauvage [79]. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénotype notamment la concentration en méthionine libre pouvant inhiber l'activité de la METAP2 ou une spécificité de substrat différentielle (Voir Introduction). Néanmoins, cette lignée est parfaitement viable. Ainsi, seul une METAP2 assure la NME dans le mutant $\Delta metap1$. Par conséquent, l'utilisation de la fumagilline permet de moduler directement le niveau de NME dans de telles cellules. Lorsque cette lignée est cultivée en présence d'une concentration en fumagilline dépassant 10 nM, aucune croissance n'est observée confirmant le caractère essentiel de la NME chez la levure [1, 52]. L'utilisation d'une concentration moins élevée en fumagilline (5 nM), n'inhibant pas totalement la NME, réduit le taux de croissance du mutant $\Delta metap1$ sans toutefois l'arrêter totalement [1]. Les tests de complémentations réalisés ont montré que le GSH ainsi que la cystéine restaure le taux de croissance des levures $\Delta metap1$ cultivées avec 5 nM de fumagilline [1].



Les archées possèdent uniquement le type 2 des METAPs, il est donc aisé de moduler leur NME cytoplasmique avec la fumagilline. *Haloferax volcanii* est une archée halophile modérée (optimal de croissance 1,7-2,5 M de NaCl) qui est largement utilisée comme modèle car elle est facilement cultivable et il existe désormais de nombreux outils génétiques, biochimiques et moléculaires [289, 290]. Lors de cette étude, le génome d'*H. volcanii* n'était pas encore complètement séquencé. Néanmoins, les contigs étaient accessibles à la communauté au fur et à mesure de l'avancement du séquençage et cela m'a permis d'identifier comme attendu une seule METAP2 en utilisant la séquence en acides aminés de celle de *Pyrococcus furiosus* (Fig. 29) dont la structure était déjà résolue [291, 47, 48, 49]. Le séquençage d'*H. volcanii* a été terminé en 2010. Une nouvelle recherche de séquences codant

une METAP a été réalisée et n'a pas permis de trouver une METAP2 additionnelle ou la présence d'une METAP1. L'alignement de séquence de la METAP identifiée chez *H. volcanii* montre clairement les caractéristiques d'une METAP de type procaryotique avec l'absence du domaine additionnel N-terminal présent chez les METAPs eucaryotiques (Fig. 3). De plus, la présence d'un domaine de 57 acides aminés inséré dans le domaine catalytique l'identifie formellement comme une METAP de type 2 (Fig. 29). Les METAPs de *P. furiosus* et d'*H. volcanii* présentent 42,57% d'identité de séquence et les résidus impliqués dans la liaison aux cations métalliques et ceux dans la reconnaissance de la fumagilline sont conservés (Fig. 29). Ces informations ainsi que la sensibilité d'*H. volcanii* à la fumagilline indiquent la présence d'une seule METAP2 comme chez les autres archées étudiées jusqu'à présent. En outre, j'ai pu démontrer que la fumagilline inhibe *in vitro* l'activité de la METAP2 de *P. furiosus* avec une valeur de concentration inhibant 50 % de l'activité enzymatique (CI_{50}) de 25 nM pour 50 nM d'enzyme (Fig. 30). Ceci est cohérent avec les données de la littérature considérant que la fumagilline est un inhibiteur de type suicide et présentant donc une affinité apparente inférieure à 1 nM [50, 46].



L'utilisation de la fumagilline sur *H. volcanii* induit une diminution du taux de croissance jusqu'à un effet cytotoxique démontrant le caractère essentiel de la NME également chez les archées [1]. En utilisant une concentration intermédiaire en fumagilline

(50 nM), le taux de croissance de l'archée est diminué. Chez les archées halophiles, il a été suggéré que le thiol non protéique majeur est la γ -glutamylcystéine (présente en quantité de l'ordre du millimolaire), précurseur directement en amont du glutathion [292]. Il a été proposé que la γ -glutamylcystéine soit plus stable dans les conditions halophiles que le glutathion [293]. Il a aussi été rapporté que cette molécule et la bis- γ -glutamylcystine réductase peuvent constituer l'analogie fonctionnel chez les archées halophiles du système glutathion/glutathion réductase présent dans les autres cellules [293]. Finalement, en 2009 il a été découvert qu'*H. volcanii* possède un ORF qui permet la synthèse et l'accumulation de γ -glutamylcystéine. Lorsque cet ORF est exprimé dans une souche d'*E. coli* qui ne possède pas de glutamylcystéine ligase fonctionnel, il restaure la synthèse de glutathion [294]. Ainsi, l'ensemble des données disponibles indique que sa fonction est identique à celle du glutathion dans les autres organismes. En effet, l'ajout de glutathion réduit ou de cystéine dans le milieu de culture restaure le taux de croissance de l'archée [1]. Ainsi, en utilisant des systèmes qui permettent d'inhiber partiellement la NME cytoplasmique, j'ai pu démontrer que le lien entre la NME cytoplasmique et le glutathion est une caractéristique très conservée à travers le vivant.

2. L'aide d'un modèle simplifié où l'étude de la NME est bien avancée, le chloroplaste

Un nombre important et grandissant d'études appuie l'hypothèse de l'interaction entre NME et protéolyse. De même, le signal de dégradation le mieux documenté est la voie de l'azote N-terminale et relate la demi-vie protéique en fonction du résidu N-terminal de la protéine. Néanmoins, il existe encore peu de preuves expérimentales directes reliant la NME à la dégradation des protéines. A ma connaissance, une seule étude traite de l'influence de la NME et la dégradation dans un protéome donnée. Cette étude a été réalisée au laboratoire dans le chloroplaste et démontre que la NME influence la demi-vie de protéine clés, notamment la protéine D2 du photosystème II [240]. La méthionine N-terminale maintenue agissant comme un signal de déstabilisation. Dans le chapitre I, j'ai pu démontrer que l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique induit une perturbation de l'homéostasie du glutathion qui a pour origine une augmentation des protéines substrats de la protéolyse (Chapitre 1, [1] Annexe 1). Cela constitue la première étude décrivant un tel lien *in vivo* dans

un protéome cytoplasmique eucaryotique. Cependant, pour aller plus loin dans cette étude et pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires directement en aval de la NME, j'ai participé à un projet visant à comprendre la relation entre protéases et NME dans le chloroplaste. En effet, le chloroplaste est un bon modèle car la NME chloroplastique et son impacte y sont bien caractérisés [240]. De plus, la NME y est aisément blocable grâce aux inhibiteurs de peptide déformylases. Cette partie est actuellement en révision en vue d'une publication. Ci-après, les principaux résultats sont décrits sous la forme d'un résumé approfondi.

En 2003, il a été démontré au laboratoire que l'inhibition de la NME chloroplastique conduit à la déstabilisation du photosystème II (PSII) par l'intermédiaire de la dégradation rapide des protéines D1, D2 CP43, CP47 et PsbH [240]. Dans le chloroplaste, la NME est inhibée en utilisant l'actinonine qui cible spécifiquement l'activité peptide déformylases. Les METAPs ne peuvent pas agir lorsque la méthionine N-terminale est formylée [32] [295]. Ainsi le blocage de l'activité peptide déformylase conduit à bloquer la NME dans ce compartiment. Dans ce projet, je me suis focalisé sur l'identification de la protéase responsable de la dégradation des composants du PSII dépendante de la NME. Plusieurs protéases existent dans le plaste mais trois se distinguent des autres car elles sont impliquées à différents niveaux dans la dégradation des composants majeurs du PSII : ClpP, FtsH et DegP2. Il a déjà été montré précédemment au laboratoire que ClpP n'est très probablement pas impliquée [240]. Dans ce projet, nous avons choisi de tester cette fois l'impact de FtsH étant donné qu'elle agit tout comme la NME sur un jeu de substrats communs.

Les mécanismes relatifs au devenir spatio-temporel de la protéine D1 sont déjà très bien décrits. Lorsque les plantes sont exposées à la lumière, D1 subit invariablement des dommages oxydatifs, ce qui rend le PSII non fonctionnel : c'est la photo-inhibition. Afin que le PSII retrouve son activité, des complexes protéolytiques spécifiques dégradent la protéine D1 endommagée et permet ainsi à une protéine D1 nouvellement synthétisée d'être incorporée dans le PSII au cours du cycle de réparation de D1 [296]. Beaucoup d'études ont examiné le renouvellement de D1 et se sont focalisées sur la détection des protéases impliquées dans la dégradation de D1. Le meilleur candidat jusqu'à présent est la famille de protéase FtsH (pour *Filamentation temperature sensitive H* protease) [297, 298, 299, 300, 296, 301].

Le gène *FTSH* code une protéine essentielle à la viabilité d'*E. coli* [302]. Chez *A. thaliana*, il existe 12 gènes codant des protéines FtsH et les produits de 9 de ces gènes ont été identifiés dans le chloroplaste [303]. Parmi ces protéines, quatre isoformes (FtsH1, FtsH2, FtsH5 et FtsH8) s'accumulent dans les feuilles d'*A. thaliana* en conditions normales de croissance [304]. Les différentes sous-unités FtsH forment une structure hexamérique active. FtsH1 et FtsH5 (sous-unités de type A), FtsH2 et FtsH8 (sous unités de type B) sont des couples d'isoformes très étroitement reliées évolutivement et interchangeableables [297, 305]. La structure est composée de deux sous-unités de type A et 4 sous-unités de type B [297, 305]. D'autres structurations des sous-unités FtsHs ont été découvertes mais leur accumulation est moindre.

A. La NME opère en amont de la protéase FtsH

Afin d'identifier la machinerie protéolytique impliquée dans la dégradation des composants du PSII dépendante de la NME, nous avons croisé un mutant nul *ftsh2* qui accumule une quantité significativement réduite de complexes FtsH, du fait de l'absence de FtsH2 [303], et une lignée dépourvue de PDF1B, le mutant nul *pdf1b*. Le mutant *ftsh2* présente un phénotype « variegata » caractérisé par une coloration blanche foliaire sectorisée correspondant à un échec de la biogenèse chloroplastique. Le mutant *pdf1b* est moins grand et plus pâle que les plantes sauvages. De manière surprenante, en condition normale de croissance, les doubles mutants obtenus *pdf1b ftsh2* ne présentent pas le phénotype « variegata » mais sont similaires aux plantes *pdf1b* (Fig. 31). Par conséquent, la mutation *pdf1b* est un suppresseur du phénotype « variegata ». Ces données montrent que PDF1B et FtsH2 interviennent dans une même voie avec PDF1B agissant en amont de FtsH2 lors de la biogenèse chloroplastique. Des lignées *pdf1a ftsh2* ont également été obtenues et ont un phénotype similaire à celui du mutant *ftsh2*. Ce résultat confirme les précédentes données sur la localisation de ces protéines, chloroplastique pour FtsH2 [303] et mitochondriale pour PDF1A [60]. De plus, la complémentation du phénotype « variegata » a également été observée en inhibant l'activité des PDFs chloroplastiques en présence d'actinonine, inhibiteur spécifique de la déformylation chloroplastique [240].

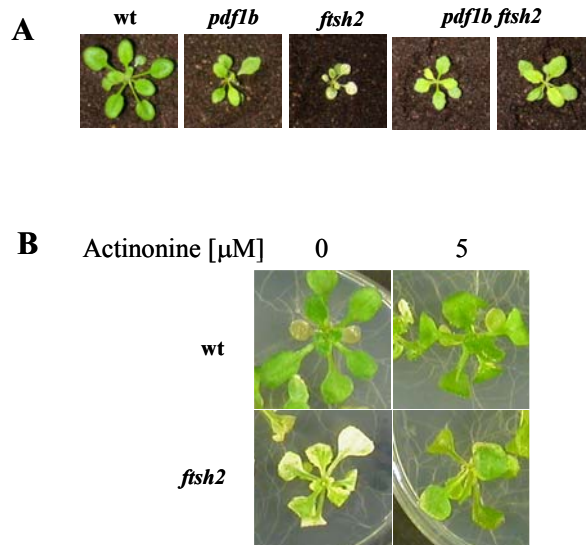
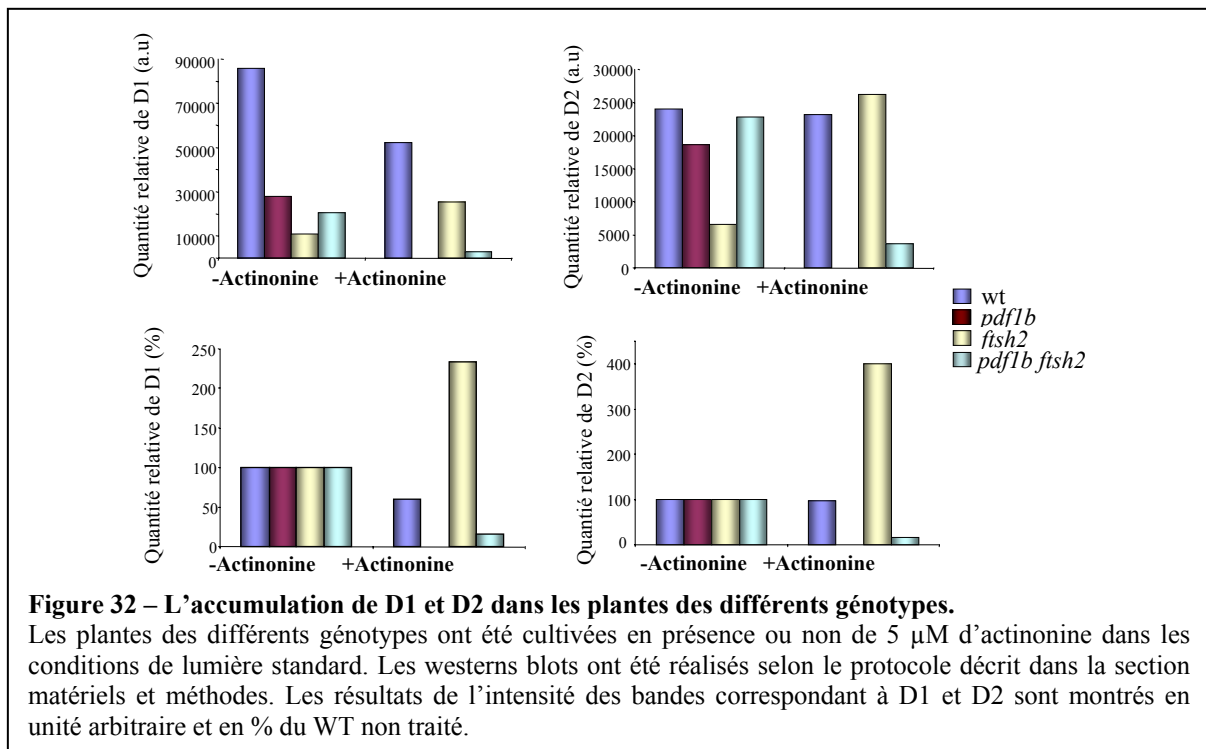


Figure 31 – L’analyse génétique des doubles mutants *pdf1b ftsH2* positionne PDF1B en amont de FtsH2 et agissant dans la même voie.

A. Photographie de plantes wt, *pdf1b*, *ftsH2* et *pdf1b ftsH2* âgées de trois semaines cultivées en condition standard de lumière. Les doubles mutants ont été obtenus à partir de l’autofécondation de lignées hétérozygotes *pdf1b pdf1b ftsH2 ftsH2* générées par un croisement des mutants simple *pdf1b* et *ftsH2* (deux lignées différentes de double mutant sont montrées). Le génotypage des différents *loci* a été réalisé par analyse PCR de l’ADN génomique. **B.** Les lignées wt et *ftsH2* ont été cultivées en condition normale de lumière en présence ou non de 5 µM d’actinonine.

De plus, des analyses par western blot de l’accumulation des protéines D1 et D2 montrent que l’application d’actinonine sur les plantes sauvages produit les mêmes effets que la mutation *pdf1b* sur l’accumulation de D1 et de D2. De plus, dans le double mutant *ftsH2 pdf1b* et le mutant simple *pdf1b*, l’actinonine induit une très forte réduction de l’accumulation de D1 et de D2. Cependant, l’application d’actinonine sur mutant *ftsH2* induit un niveau de D1 et D2 plus élevé que dans le double mutant et que la lignée *pdf1b* (Fig. 32). Ces données suggèrent que l’accumulation des formes formylées de D1 et D2 est dépendante de l’expression de FtsH2. De manière cohérente, le niveau de D1 et D2 augmente dans le mutant *ftsH2* traité avec la concentration en actinonine qui supprime le phénotype « variegata » et atteint le niveau de D1 et D2 du double mutant (Fig. 32).



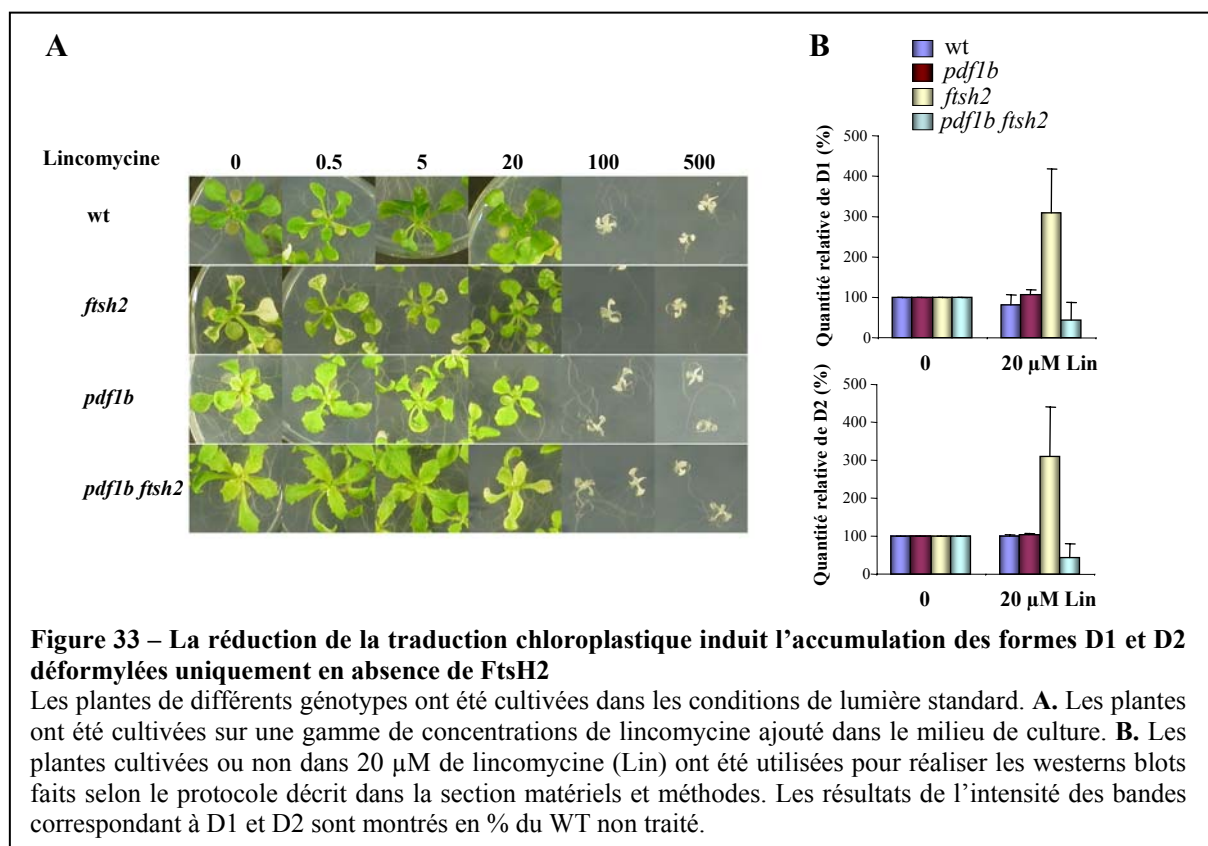
B. L'accumulation des protéines D1 et D2 via FtsH2 est sous contrôle de PDF1B lors de l'inhibition partielle de la synthèse protéique.

Les résultats précédents montrent que PDF1B et FtsH2 interviennent dans la même cascade dans le cadre de la biogenèse du chloroplaste. Nous avons alors étudié l'accumulation des protéines D1 et D2, les deux substrats communs aux deux processus protéolytiques, dans les différentes lignées et conditions par différentes approches.

Un inhibiteur connu de l'élongation de la traduction, la lincomycine, a été utilisé pour bloquer la synthèse protéique chloroplastique. A forte concentration, l'inhibiteur de la synthèse protéique a un effet létal sur tous les génotypes (Fig. 33). Néanmoins, en utilisant une concentration sub-létale (20 μ M) nous avons observé la disparition du phénotype « variegata » chez le mutant *ftsH2* (Fig. 33). Cela est en conformité avec les données de la littérature où l'utilisation d'autres inhibiteurs de la synthèse protéique chloroplastique produit le même effet [306].

L'utilisation de 20 μ M de lincomycine en condition standard de culture ne modifie pas l'accumulation des protéines D1 et D2 chez les plantes sauvages et le mutant *pdf1b* par rapport aux plantes non traitées à la lincomycine (Fig. 33). En revanche, cette inhibition

partielle de la synthèse protéique chloroplastique induit une très forte augmentation de la quantité de D1 et de D2 dans le mutant *ftsh2* (Fig. 33) tandis que l'accumulation de ces deux protéines diminue jusqu'à deux fois dans le double mutant (Fig. 33). Ces données suggèrent que, lorsque la NME et les enzymes FtsH sont complètement actives comme dans les plantules sauvages, une réduction partielle de la synthèse protéique n'influence pas l'accumulation de D1 et D2. Ceci est aussi le cas lorsque la NME est affectée ou quand les deux processus protéolytiques sont inhibés (par exemple dans le mutant *pdf1b* et le double mutant *pdf1b ftsh2*). Au contraire, quand D1 et D2 sont maturées correctement par la NME et que la protéase FtsH2 est absente, les deux sous unités du PSII s'accumulent. Ceci suggère que la protéase FtsH assurent la dégradation de D1 et D2 correctement maturées par la NME. Par contre, les formes formylées de D1 et D2 semblent être prises en charge par plusieurs protéases incluant FTSH2.

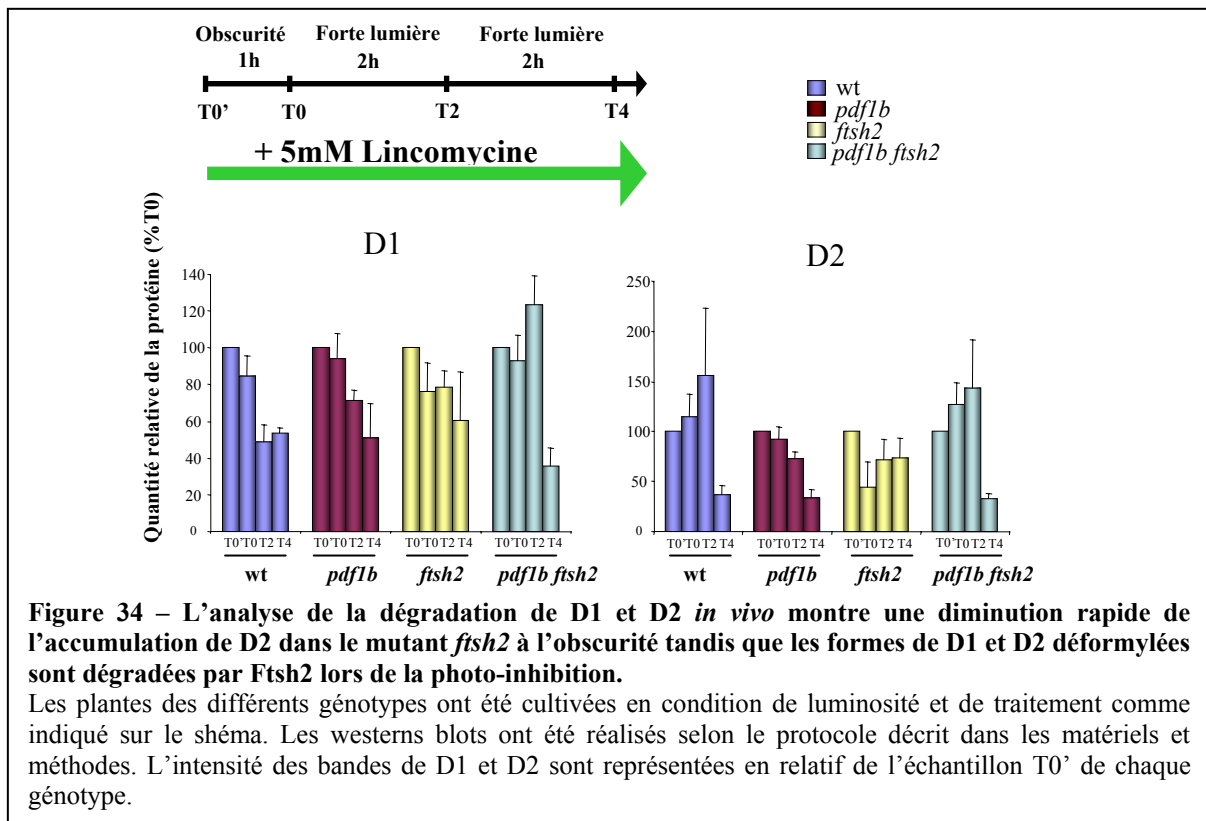


C. Les protéines D1 et D2 déformylées sont dégradées par FtsH2 en conditions de photo-inhibition

Il est possible de suivre *in vivo* la dégradation de D1 et D2 en incubant des feuilles détachées avec leurs pétioles plongés dans une solution de lincomycine à haute concentration pendant un temps court [298, 307]. Nous avons utilisé ce système pour étudier la dégradation de D1 et de D2 dans nos quatre lignées ainsi qu'en condition de photo-inhibition.

Nous avons pu montrer qu'à l'obscurité la protéine D2 subie une rapide dégradation uniquement dans le mutant *ftsh2*. Nous avons alors émis deux hypothèses non exclusives : i) l'absence de la protéase FtsH2 augmente l'activité protéolytique d'autres protéases, ii) FtsH2 joue un rôle de chaperon pour les protéines nouvellement synthétisés. Nous avons pu montrer également que dans des conditions de photo-inhibition les formes correctement maturées par la voie NME sont dégradées exclusivement par les protéases FtsH (Fig. 34).

L'ensemble de nos données indique que les formes de D1 correctement déformylées sont substrats de FtsH2 dans deux conditions : le contrôle qualité des protéines en générale et le cycle de réparation du PSII durant la photo-inhibition. Les formes formylées de D1 semblent être aussi des substrats de FtsH2 uniquement lors de la photo-inactivation de PSII et que son implication est mineure dans le contrôle qualité de la protéine D1. Les tendances obtenues avec la protéine D2 sont similaires à celles décrites pour D1 (Fig. 34).



Par conséquent, les polypeptides D1 et D2 doivent subir la NME pour que FtsH2 assure son rôle de contrôle qualité de ces protéines ainsi que pour intervenir dans le cycle de réparation du PSII. En revanche, lorsque D1 et D2 restent formylées, leur dégradation n’est plus assurée uniquement par le complexe FTSH [240].

A notre connaissance, il s’agit de la première évidence dans le chloroplaste d’un lien entre la nécessité d’action de la NME et le contrôle de la dégradation d’un substrat spécifique. Bien que cette étude se base sur un complexe particulier, elle a permis de mieux comprendre le caractère essentiel de la NME pour le destin d’un sous ensemble de protéines.

3. Protéolyse et excision de la methionine N-terminale chez *H. volcanii*

Dans le premier chapitre des résultats, j’ai pu inhiber la NME chez *H. volcanii* et montrer un lien entre ce processus et le métabolisme des thiols. Les données obtenues avec le modèle *A. thaliana* montrent que cette perturbation du métabolisme des thiols a pour origine une augmentation des substrats de la protéolyse [1]. Afin d’investiguer la relation entre NME et protéolyse chez les archées, nous avons utilisé un mutant d’une peptidase dénommée TET (tetrahedral aminopeptidase) chez *H. volcanii*. Ce mutant a été initialement décrit dans la

thèse de C. Norais (IGM, Université Paris-Sud, Orsay, équipe du Dr Hannu Myllykallio et IBS, Institut Joseph Fourier, Grenoble, équipe du Dr B. Franzetti ; 2003-2007).

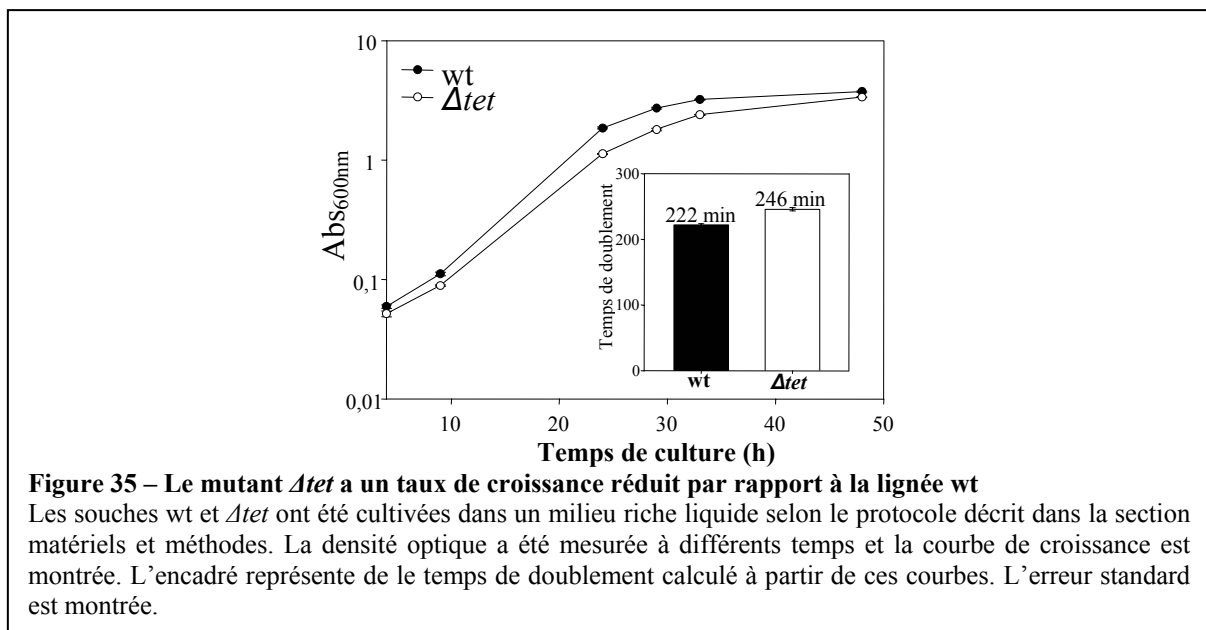
A. Les protéases TET

Les protéases TET ont été initialement découvertes et isolées chez *Haloarcula marismortui*, une archée halophile [308]. La séquence protéique de *HmTET* est homologue au produit du gène *CelM* qui a été initialement décrit comme une endoglucanase [309]. TET s'accumule sous forme dodécamérique dont chaque monomère a un poids moléculaire de 42 kDa. La protéase TET porte une activité aminopeptidase à large spectre et ses substrats sont des peptides courts. Le complexe présente une structure tétraédrique avec l'activité aminopeptidase qui est au sein de la cavité centrale. Cette dernière est accessible par différents canaux [308]. La structure de l'homologue de la peptidase TET chez *Pyrococcus horikoshii* (*PhTET2*) a été ensuite résolue. Cette étude a permis de montrer que les canaux conduisant à la cavité protéolytique ont un diamètre maximal de 10 Å, ce qui restreint l'accès à la cavité uniquement aux petits peptides [310]. Finalement, une peptidase TET additionnelle a été identifiée chez cet organisme et a été initialement décrite comme une « deblocking aminopeptidase » appelée *PhTET1*. Cette peptidase montre une préférence pour les acides aminés acides en position N-terminale [311, 312]. Ces deux peptidases TET présentent la structure caractéristique tétraédrique. Une analyse de leur spécificité de substrats révèle un spectre large. Néanmoins, une préférence pour la leucine en position N-terminale a été observée pour *PhTET2* [313]. Finalement, le mécanisme d'attraction et d'orientation des substrats a été décrit [314]. Plus généralement, il a été montré que TET fait partie de la voie de dégradation du protéasome en dégradant les petits peptides qui en sont issus. Cela a conduit à proposer que la protéase TET soit un analogue fonctionnel de la protéase Tricorn [314]. Il a également été démontré que *PhTET1* s'assemble en deux structures quaternaires différentes, en tétraèdre de 12 sous-unités et en octaèdre à 24 sous-unités [312]. Récemment, une troisième protéase TET, *PfTET3*, a été identifiée et sa structure tridimensionnelle a été résolue [315]. Sa spécificité de substrat a également été étudiée et montre une forte préférence pour les résidus basiques en position N-terminale. De manière intéressante, les trois *PhTET* présentent une spécificité de substrats différente et complémentaire, ce qui permet de dégrader l'ensemble des peptides générés par la machinerie protéolytique.

B. Diminution de la NME et protéase TET

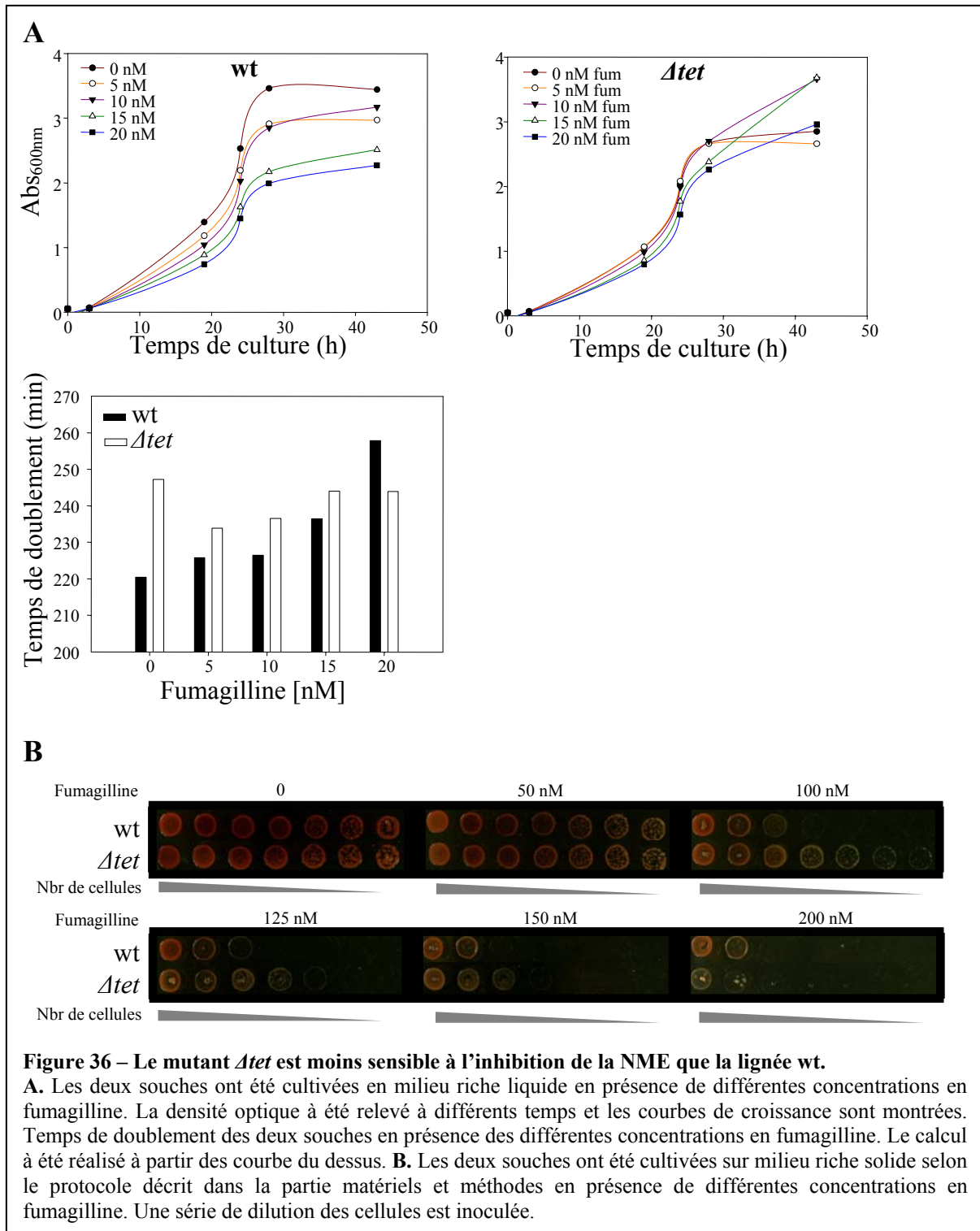
Nous avons précédemment montré que le maintien de la méthionine N-terminale chez *A. thaliana* augmente la protéolyse cellulaire en enrichissant l'ensemble des protéines destinées à être dégradées [1]. Néanmoins, les acteurs impliqués dans la dégradation de cet ensemble de protéines restent à être identifiés dans le cytoplasme. L'utilisation de mutants des différentes voies de protéolyses est une stratégie prometteuse pour découvrir ces acteurs et montrer une liaison directe entre la NME et la(les) voie(s) protéolytique(s) impliquée(s). C'est dans ce contexte que le mutant TET chez *H. volcanii* a été utilisé.

Le mutant TET en condition de culture classique dans un milieu riche a un taux de croissance légèrement réduit par rapport à la lignée WT (Fig. 35). Ce résultat est en accord avec la précédente description du mutant réalisé par C. Norais. Par conséquent, soit la protéine TET n'a pas une fonction essentielle car son absence n'affecte que très peu la croissance cellulaire soit il existe un/des analogues fonctionnelle dans la cellule permettant de palier à l'absence de cette protéase.



Si la dégradation des protéines induite par la diminution de la NME est réalisée par une voie protéolytique impliquant TET, on s'attend à ce que le mutant TET bloque cette dégradation et ralentisse ainsi la protéolyse. Par conséquent, dans une telle situation le mutant *Atet* doit être moins sensible à l'inhibition de la NME. Afin de tester cette hypothèse, j'ai mis en culture ce mutant dans un milieu contenant de la fumagilline. La culture des lignées

sauvage et *Δtet* en présence de différentes concentrations en fumagilline révèle que la mutation *Δtet* rend l'archée moins sensible à la fumagilline que la souche WT. En effet, on observe qu'avec 100 nM de fumagilline dans le milieu de culture, le mutant *Δtet* croît plus rapidement que la souche parentale sauvage (Fig. 36). La résistance accrue à la fumagilline induite dans le mutant *Δtet* renforce très fortement l'impact des données obtenues chez *Arabidopsis* qui montrent une stimulation de l'activité protéolytique cellulaire en association avec l'inhibition de la NME.



Lorsque ces expériences ont été menées, le séquençage du génome d'*H. volcanii* n'était pas encore complètement achevé, puisqu'il a été publié cette année [316]. Une analyse récente par blastp m'a permis de trouver un gène codant une séquence protéique ayant plus de 30% d'identité avec la séquence de la protéase TET connue d'*H. volcanii*. Cette séquence est

annotée sur le serveur UniProtKB comme étant homologue à la protéase TET. Un alignement de cette séquence avec les protéases TET déjà caractérisées montre clairement l'origine commune des toutes ces protéases avec les résidus impliqués dans la catalyse et dans la liaison aux métaux qui sont conservés (Fig. 37). Ainsi, ces données suggèrent vraiment que la séquence retrouvée (annotée D4GUF7) soit une protéase TET supplémentaire. C'est la première fois à notre connaissance que plus d'un gène tet peut vraiment exister chez les archées halophiles bien que trois gènes codant pour des protéases TET ont été décrit chez l'hyperthermophile *Pyrococcus horikoshii* [311, 315, 310, 312].

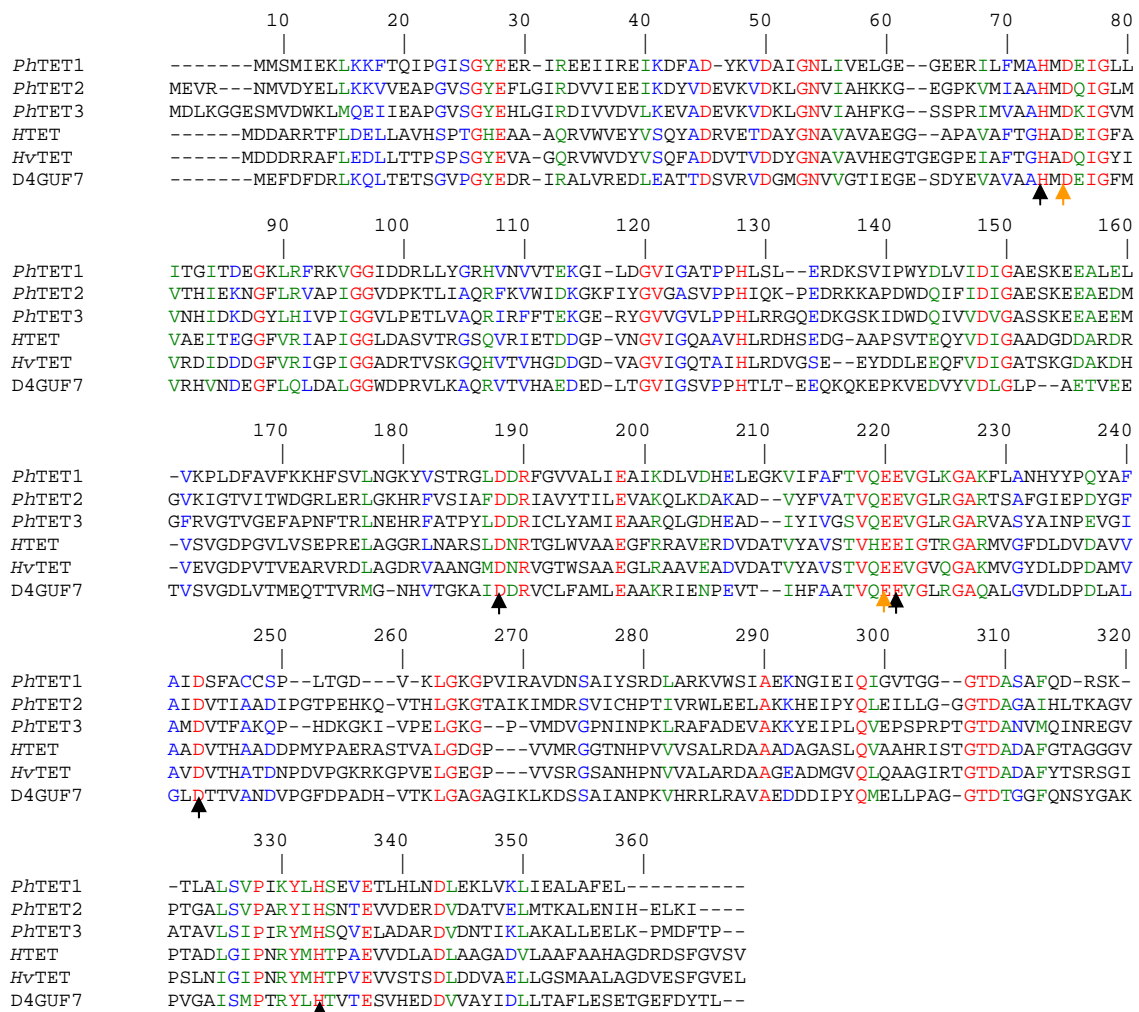


Figure 37 – Alignement de séquences de différentes protéines TET.

L'alignement de séquences a été réalisé avec clustalW et les séquences ont été obtenues sur la base de donnée UniProtKB. Les séquences des trois TET caractérisées chez *Pyrococcus horikoshii* sont montrées ainsi que celle d'*halobacterium* et les deux séquences retrouvées chez *Haloferax volcanii*. Les flèches oranges montrent les résidus catalytiques, les noires les résidus impliqués dans la liaison de l'ion métallique catalytique.

4. L'excision de la méthionine N-terminale chez l'Homme, similitudes, différences et valorisation

Dès les années 1990 plusieurs études ont montré que la NME est un processus essentiel chez les mammifères. De plus, une spécificité cellulaire a pu être mise en évidence entre les différentes lignées vis-à-vis de la sensibilité aux inhibiteurs de METAP2. En effet, certaines sont hypersensibles à l'inhibition de la METAP2, c'est le cas des cellules endothéliales [95]. En outre, le niveau d'expression des METAP2s est connu pour être régulé durant la prolifération cellulaire et la tumorigenèse. Ces résultats suggèrent que la METAP2 joue un rôle prépondérant dans de telles lignées. En outre, différentes molécules ciblant l'activité METAP2 et qui inhibent la prolifération de différentes lignées cellulaires *in vitro* et *in vivo* ont été découvertes mais aucune n'est aujourd'hui prête à être mise sur le marché. En effet, beaucoup de questions restent encore sans réponse comme par exemple pourquoi certaines lignées cellulaires de mammifères sont hypersensibles à l'inhibition de l'activité des METAP2s. Plus généralement, la principale raison reconnue comme responsable de cette situation est notre manque de connaissance concernant les mécanismes moléculaires qui font de la NME un processus essentiel. En effet, la cascade d'évènements qui a lieu après l'inhibition de l'activité des composants de la NME reste encore largement énigmatique.

L'utilisation du système expérimentale mis au point chez *A. thaliana* m'a permis de mettre en évidence des événements moléculaires qui ont lieu consécutivement à l'inhibition de la NME cytoplasmique. J'ai pu montrer que l'inhibition de la NME cytoplasmique chez *A. thaliana* conduit à la perturbation de l'homéostasie du glutathion cellulaire. Cette perturbation a pour origine une augmentation de la protéolyse cellulaire. J'ai également pu généraliser mes conclusions en étudiant la NME sur d'autres modèles tels que la levure *S. cerevisiae* et une archée. Etant donné que la NME constitue une cible thérapeutique attractive, il m'est apparu important d'étudier la NME dans des lignées cellulaires humaines afin de vérifier les résultats que j'ai pu obtenir sur d'autres modèles. Pour cela, j'ai étroitement collaboré avec J. Bignon dans l'équipe de J. Bakala (Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette) qui m'a permis de réaliser ces expériences.

A. L'inhibition de l'excision de la méthionine N-terminale de cellules de mammifères.

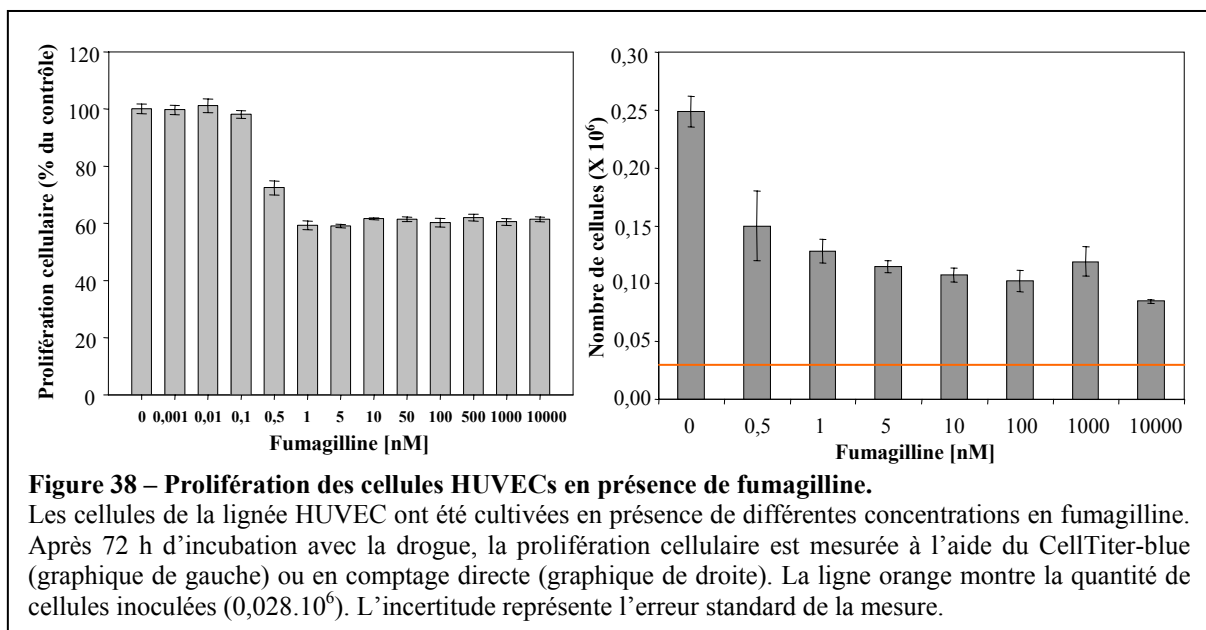
A.1. HUVECs, modèles d'étude des lignées endothéliales

La littérature est relativement abondante concernant les inhibiteurs des METAP2s et leurs effets sur différentes lignées cellulaires normales et pathologiques de mammifères. Néanmoins, il reste difficile d'avoir une vision claire de l'effet de ces inhibiteurs sur des cellules de mammifères. Cela est principalement dû au manque d'uniformité des différentes expériences. Par exemple, il existe de nombreuses lignées cellulaires qui peuvent être cultivées dans au moins autant de différentes conditions. De plus, différents inhibiteurs peuvent être utilisés (voir Introduction).

Les HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sont néanmoins reconnue pour être très sensibles aux inhibiteurs des METAP2s. Il s'agit d'une lignée de cellules primaires endothéliales. Nous avons donc décidé d'utiliser principalement cette lignée. J'ai utilisé deux méthodes différentes mais complémentaires pour visualiser la prolifération cellulaire pour différentes conditions de traitement des cellules avec la fumagilline. Une méthode de comptage cellulaire directe et précise mais ne permettant pas de faire des analyses à grande échelle et nécessitant beaucoup de cellules. La deuxième méthode est une mesure indirecte de la prolifération cellulaire mais permet par exemple l'utilisation de microplaques de 96 puits et donc peu de cellules consommées. Cette méthode indirecte très utilisée est réalisée avec le CellTiter-blue (Promega). Concrètement, les cultures cellulaires sont mises en présence de résazurine qui sera réduite en un composé fluorescent, la résorufine par les cellules vivantes.

L'application de fumagilline dans le milieu de culture de ces cellules inhibe leur prolifération (Fig. 38), en accord avec les résultats déjà rapportés dans la littérature [95]. La visualisation de la prolifération cellulaire réalisée avec le CellTiter-blue et en microplaque de 96 puits montre une réduction d'environ 40 % de la prolifération cellulaire lorsque les cellules sont mises en présence de 1 nM de fumagilline et après 72h d'incubations (Fig. 38). Les concentrations supérieures en fumagilline ne semblent pas réduire davantage la prolifération cellulaire. Ces données confirment également l'effet cytostatique de la fumagilline sur les HUVECs puisque la quantité de cellules ne diminue pas en deçà de la quantité de cellules

inoculées à l'origine (Fig. 38). Lorsque l'on réalise cette expérience en plaque de 24 puits et en comptant directement le nombre de cellules après 72 d'incubation avec la fumagilline, nous observons une réduction de la prolifération allant jusqu'à 60% pour des concentrations en fumagilline de l'ordre du nanomolaire (Fig. 38). Cette différence peut s'expliquer par le fait que la mesure de la prolifération cellulaire avec le CellTiter-blue est indirecte et qu'il est donc très probable qu'un biais existe à ce niveau. Néanmoins, dans nos conditions expérimentales, la fumagilline inhibe de 50 % la prolifération des HUVECs de façon cytostatique pour des concentrations en inhibiteur de l'ordre du nanomolaire. Une concentration en fumagilline de 5 nM sera désormais utilisée pour traiter les HUVECs et constituera mon modèle d'étude de la NME cytoplasmique chez les HUVECs.



De manière surprenante, la lignée cellulaire endothéliale EA.hy926, une lignée dérivée de la lignée HUVEC, est beaucoup moins sensible à la fumagilline (Fig. 39). L'ajout de 10 μ M de fumagilline dans le milieu de culture ne provoque que 40% de réduction de leur prolifération (Fig. 39). Ce résultat est intéressant car ces cellules partagent à cause de leur origine beaucoup de point commun avec les HUVECs qui elles sont hypersensibles à la fumagilline. Par conséquent, c'est dans le peu de différences entre ces deux lignées qu'il y a le ou les responsables de cette sensibilité différentielle à la fumagilline. Toutefois, il faut remarquer que les milieux de cultures utilisées pour ces deux lignées sont différents et que leur composition exacte n'est pas connue. Il faudrait parvenir à cultiver ces deux lignées dans les mêmes conditions pour établir si les différences sont associées ou non au milieu du

culture.

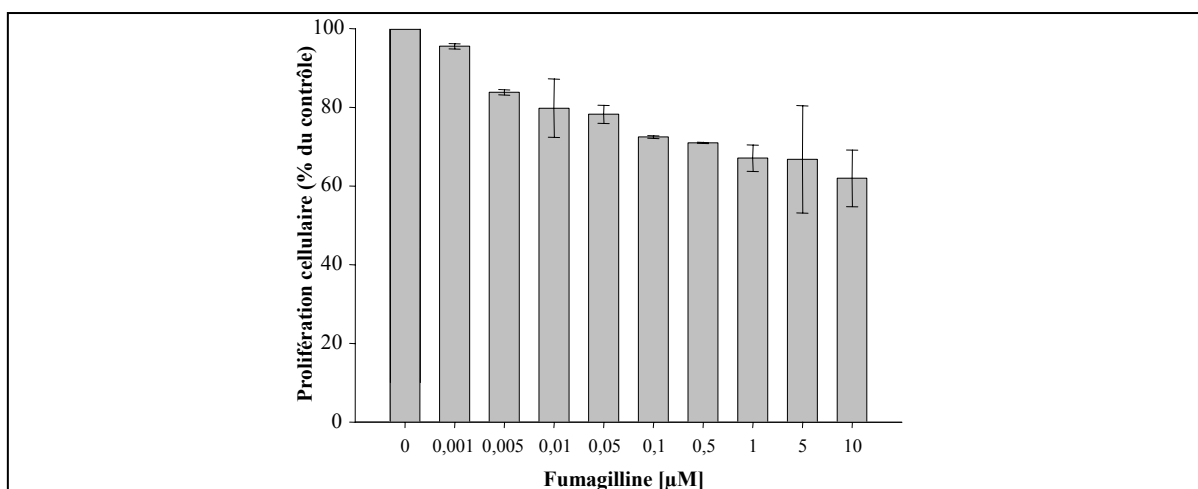


Figure 39 – Prolifération des cellules EA.hy926s en présence de fumagilline.

Les cellules de la lignée EA.hy926 ont été cultivées en présence de différentes concentrations en fumagilline. Après 72 h d'incubation avec la drogue, la prolifération cellulaire est mesurée à l'aide du CellTiter-blue. L'incertitude représente l'erreur standard de la mesure.

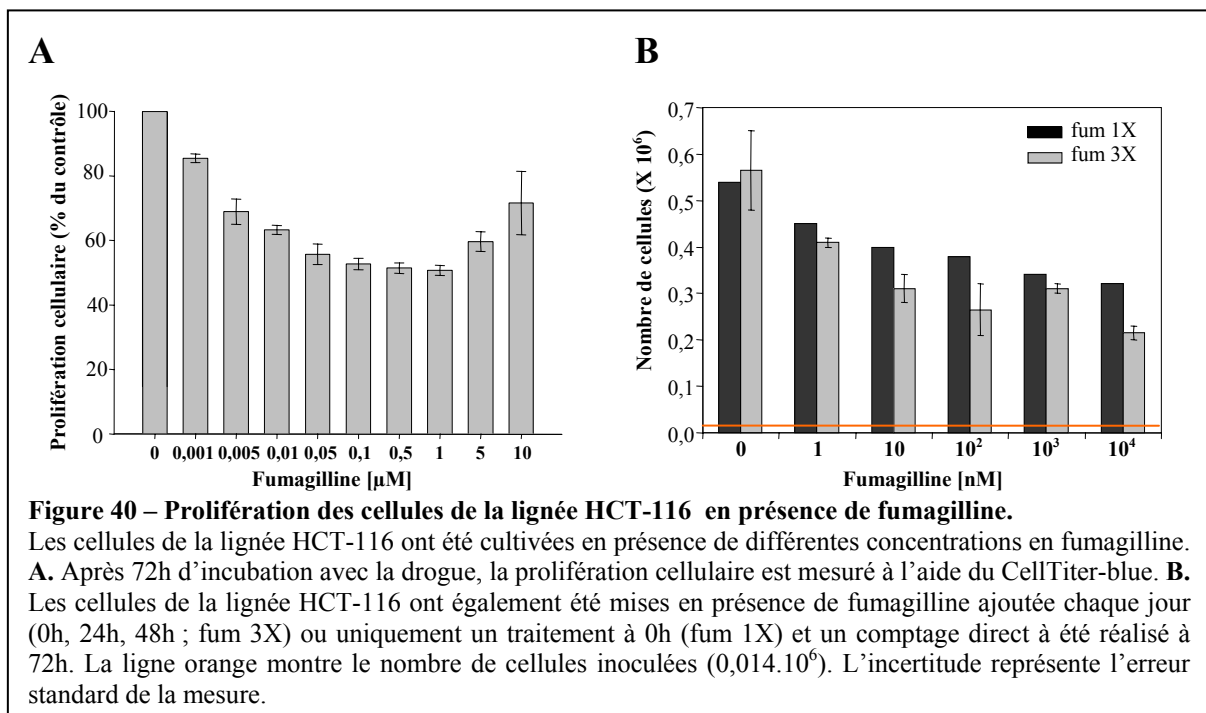
A.2. HCT-116, modèle d'étude de lignées tumorales

J'ai également testé la réponse d'autres lignées cellulaires à la fumagilline car la littérature rapporte un effet antiprolifératif ou non selon le type cellulaire utilisé. La lignée cellulaire HCT-116 est une lignée tumorale de cancer du colon bien différenciée. Les tests de prolifération de cette lignée en présence de fumagilline réalisés avec le CellTiter-blue et en comptage direct montrent que cette lignée est de trois ordres de grandeur moins sensible à la fumagilline que les HUVECs (Fig. 40A). En effet, il faut 1 µM d'inhibiteur pour diminuer au maximum de 50 % la prolifération cellulaire (Fig. 40A).

Il a été rapporté durant les essais cliniques que les composés de la classe de la fumagilline, exemplifié par le TNP-470 présentent une demi-vie dans le plasma sanguin très faible (environ 7 min). Parmi les hypothèses, il a été suggéré que la fumagilline soit dégradée/métabolisée par des époxydes hydrolases [317, 318]. J'ai alors décidé de caractériser et comparer après 72h de culture l'effet sur la lignée HCT-116 de l'application d'une seule dose initiale de fumagilline et l'effet obtenu quand les applications de fumagilline sont répétées plusieurs fois pendant les 72h. Cela représente l'ajout de 3 doses de fumagilline durant les 72h d'incubations (traitement à 0 h, 24 h et 48 h). Avec ce type d'expérience, je m'attendais à observer des effets drastiques avec les applications répétées de fumagilline si

une dégradation rapide de la fumagilline avait lieu pendant les 72h. Pourtant, la comparaison de la prolifération des cellules traitées de cette façon avec celle des cellules ayant été traitées une seule fois ne montre pas d'importantes différences (Fig. 40B). Le triple traitement diminue de 10 % la prolifération cellulaire par rapport au simple traitement. Dans toutes ces conditions, l'efficacité de la fumagilline sur la lignée HCT-116 reste faible par rapport à celle constatée sur les HUVECs. Par conséquent, ces résultats suggèrent que la demi-vie de la fumagilline dans nos conditions n'est pas la cause de sa faible efficacité à inhiber la prolifération cellulaire de cellules HCT-116.

Une concentration en fumagilline de 1 μM sera désormais utilisée pour traiter les cellules de la lignée HCT-116 et constituera mon modèle d'étude de la NME cytoplasmique chez ces cellules.



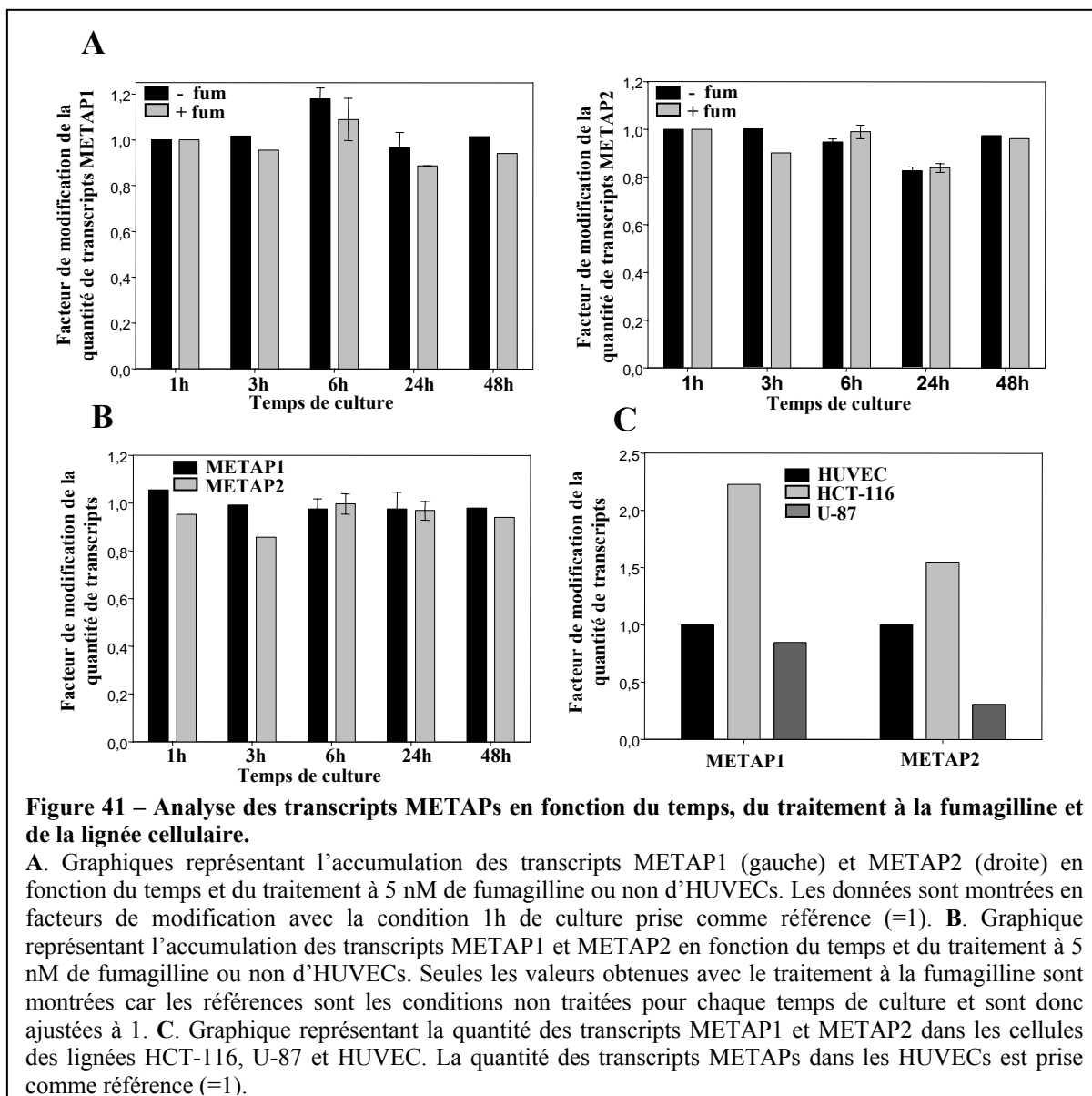
B. L'expression des METAPs chez les HUVECs et les cellules de la lignée HCT-116

Une des explications avancées pour justifier l'hypersensibilité à la fumagilline de la lignée cellulaire HUVECs repose sur une éventuelle expression différentielle des deux types de METAPs. Il a été suggéré que plus les METAPs sont abondantes, plus la cellule à la

capacité de résister à la fumagilline. Par exemple, une sous expression de METAP1 dans une lignée cellulaire rendrait ces cellules très sensibles à la fumagilline car le faible niveau de METAP1 pourrait ne plus suffire à assurer le taux de NME nécessaire à la vie cellulaire.

Dans ce contexte, une analyse des transcripts METAP1 et METAP2 accumulés chez les HUVECs cultivées en présence de 5 nM de fumagilline ou non et à différents temps d'incubation en présence de la drogue a été réalisée récemment. Les résultats préliminaires montrent qu'entre 1 et 48 heures de culture avec ou sans fumagilline, la quantité de transcripts de METAP1 et de METAP2 ne varie pas (Fig. 41A, B). Cette analyse par PCR quantitative a été réalisée de manière à écarter tout biais en choisissant dans un premier temps 10 gènes de références avant de conserver les quatre plus stables en comparaison aux premières données accumulées par northern blot. Ces données suggèrent que les transcripts METAPs ne sont ni induits durant la prolifération ni par le traitement à la fumagilline. Ces résultats diffèrent des données présentées dans la littérature indiquant l'induction de la METAP2 durant la prolifération cellulaire.

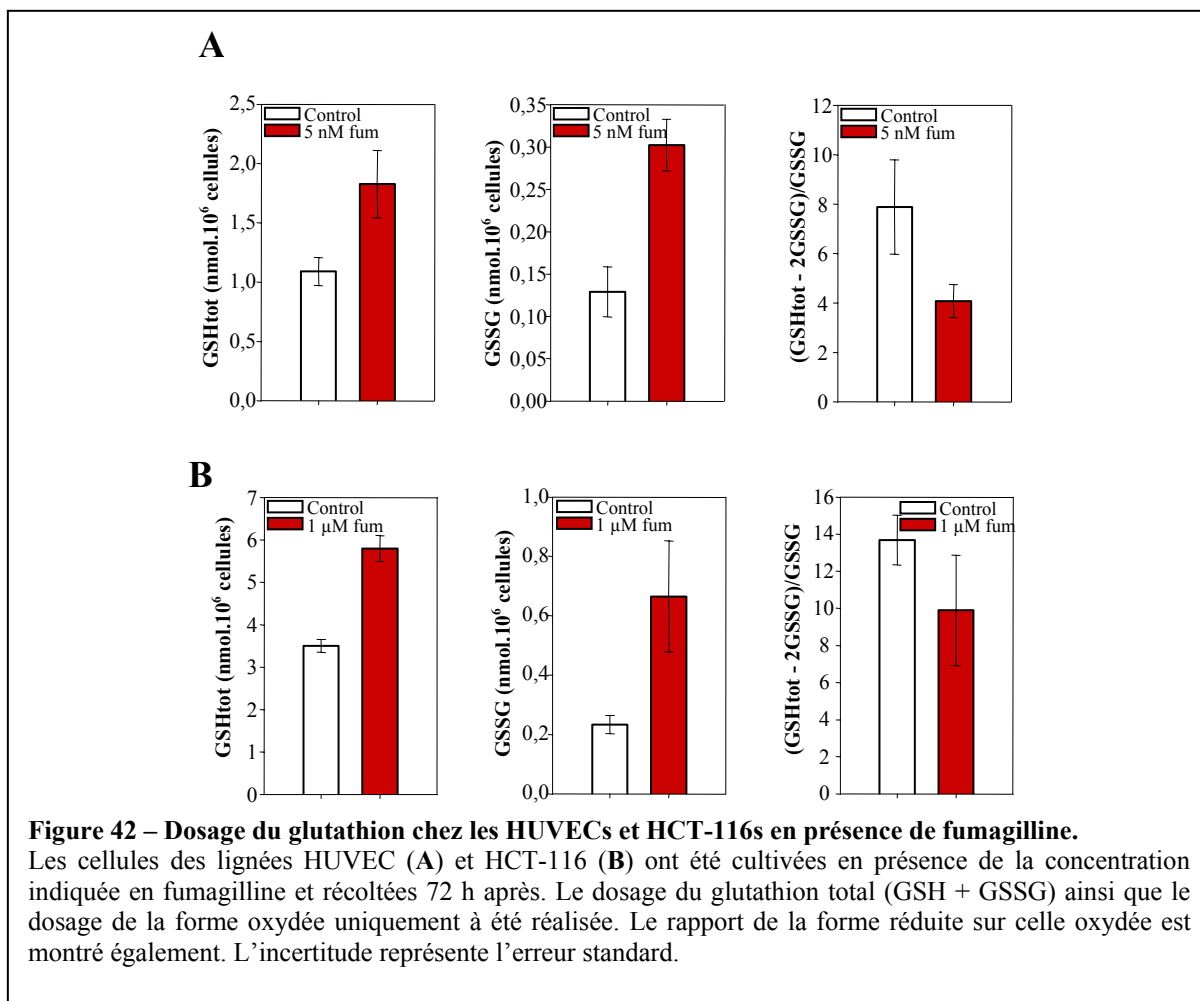
Enfin, une analyse des transcripts dans différentes lignées cellulaires non traitées à la fumagilline a été réalisée. Dans les cellules de la lignée HCT-116, mes données montrent que par rapport aux HUVECs, la quantité de transcript METAP1 y est plus que doublée et que celle de METAP2 est augmentée d'un facteur 1,5 (Fig. 41C). Le niveau plus important de METAPs dans la lignée HCT-116 pourrait donc être la cause de leur faible sensibilité à la fumagilline. Un résultat intéressant a été obtenu avec la lignée U-87 - une lignée de glioblastomes humains à morphologie épithéliale - qui montre un niveau de transcripts METAP1 égal à celui des HUVECs mais avec un niveau de transcript trois fois inférieur pour la METAP2 par rapport aux HUVECs (Fig. 41C). Cette lignée sera bientôt testée pour sa sensibilité à la fumagilline; je m'attends à ce qu'elle soit au moins autant sensible à la drogue que les HUVECs. Ces résultats bien qu'encourageants doivent être consolidés notamment en étudiant l'accumulation de ces enzymes au niveau protéique. Ces analyses sont actuellement en cours au laboratoire.



C. Excision de la méthionine N-terminale et glutathion chez les cellules humaines

Les cellules des lignées HCT-116 et HUVEC ont été cultivées en présence de 1 μ M et 5 nM de fumagilline respectivement sur la base des tests réalisés précédemment. Ces concentrations inhibent la croissance cellulaire de manière reproductible. Afin de comprendre les conséquences de l'inhibition de la METAP2 dans les cellules humaines et de voir si comme chez les plantes, les archées et les champignons il existe un lien entre l'inhibition de la NME cytoplasmique et le glutathion, j'ai quantifié les différentes formes majoritaires de glutathion dans les conditions traitées et non traitées pour les HUVECs et les cellules de la

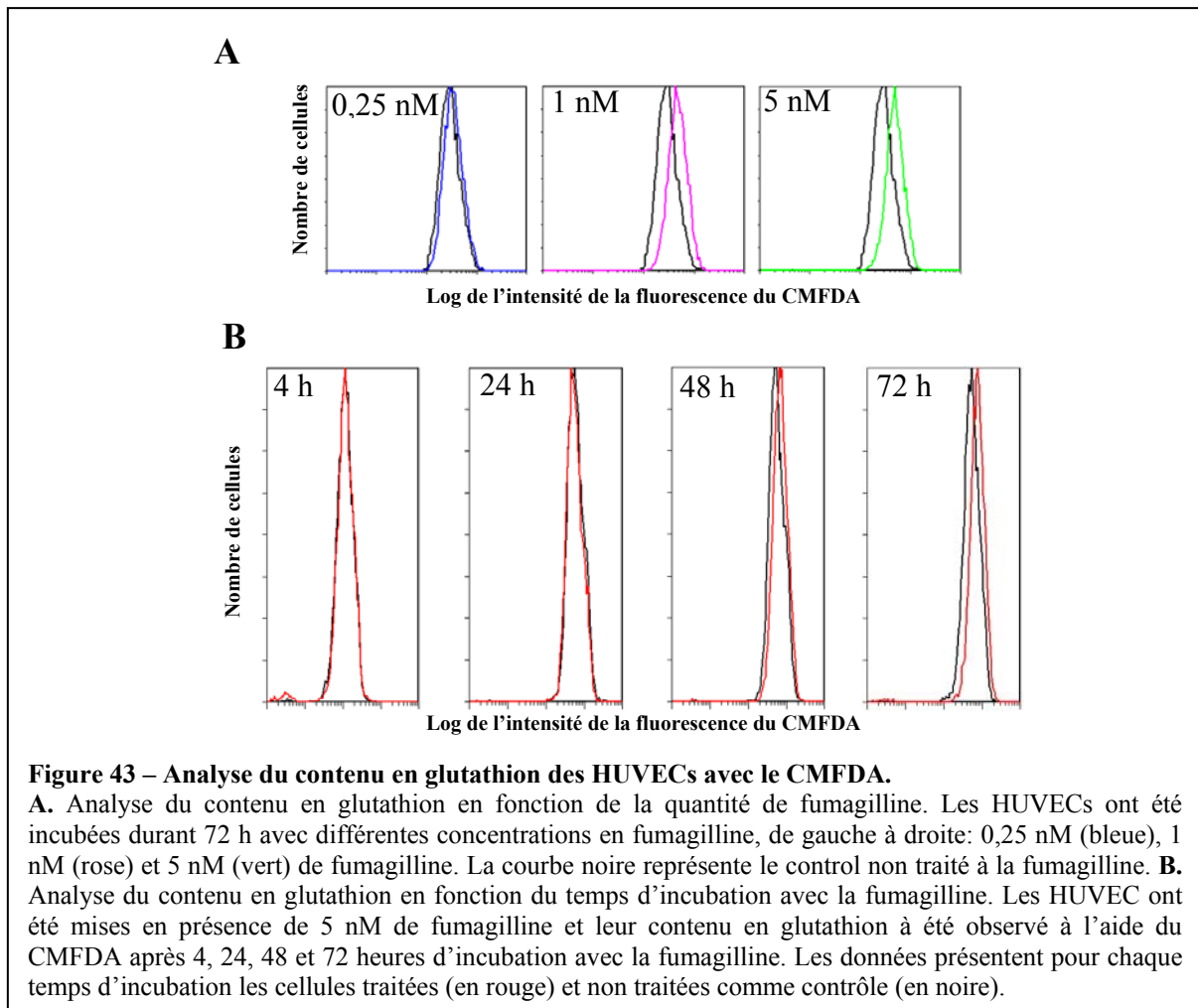
lignée HCT-116. L'utilisation d'une méthode de dosage à recyclage m'a permis de quantifier directement la forme réduite du glutathion (GSH) et le pool total de glutathion (glutathion réduit + glutathion oxydé). Ainsi, je peux indirectement connaître la quantité de la principale forme oxydée du glutathion (GSSG). Avec ces données, le calcul du rapport GSH/GSSG a été réalisé. Ce rapport est directement lié à l'état d'oxydation du couple GSH/GSSG. De manière intéressante, la quantité total de glutathion cellulaire augmente dans les HUVECs et les cellules de la lignée HCT-116 lorsqu'elles sont traitées à la fumagilline (Fig. 42). La forme oxydée du glutathion augmente dans les deux lignées lorsqu'elles sont traitées avec de la fumagilline. Lorsque l'on s'intéresse au rapport GSH/GSSG, on constate qu'il est plus faible lorsque les HUVECs sont en présence de fumagilline ; cela signifie qu'en proportion, le pool de glutathion cellulaire est plus enrichi en forme oxydée que dans la condition contrôle. Chez les cellules de la lignée HCT-116, le rapport n'est pas significativement plus bas, ce qui suggère une moindre oxydation du couple GSH/GSSG lorsque ces cellules sont traitées par rapport aux HUVECs. Ces résultats sont très intéressants et pourraient constituer une des explications de la résistance accrue de la lignée HCT-116 par rapport aux HUVECs. En effet, ces données montrent que les cellules de la lignée HCT-116 qui sont trois ordres de grandeur plus résistante à la fumagilline que les HUVECs sont capables d'une meilleure adaptation au niveau du pool de glutathion, ce dernier est affecté mais les HCT-116s semblent mieux contrôler cette perturbation que les HUVECs (Fig. 42).



Afin de contrôler ces résultats par une approche *in vivo*, j'ai utilisé un marqueur fluorescent spécifique des thiols non protéiques. Il s'agit du CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacétate). Le CMFDA à travers les glutathion-S-transférases réagit avec le glutathion. De ce fait, il est largement utilisé pour quantifier les thiols non protéiques, dont la forme principale est le glutathion. Ce marqueur permet donc une quantification sur des cellules vivantes. Les manipulations ont été réalisées avec les HUVECs traitées ou non avec 5 nM de fumagilline. Les résultats montrent que le traitement des cellules à la fumagilline provoque à 72 heures une augmentation significative de la quantité des thiols non protéiques. La perturbation est dose dépendante et la différence d'accumulation des thiols non protéiques est d'un facteur d'environ 1,5-2 pour 5 nM de fumagilline. De manière intéressante, la quantification de différentes formes du glutathion réalisée précédemment a révélé une augmentation du pool total de glutathion d'un facteur de 1,6 ce qui est en accord avec le dosage réalisé *in vivo* à l'aide du CMFDA (Fig. 43A ; 5 nM).

J'ai également utilisé le CMFDA pour quantifier l'accumulation des thiols à différents

temps d'incubation des HUVECs avec la fumagilline (Fig. 43B). Cette expérience montre que la perturbation du pool de glutathion a lieu que tardivement durant l'incubation des cellules avec la fumagilline (Fig. 43B). En effet, la perturbation commence à être visible à partir de 48h d'incubation avec la drogue. Ces résultats suggèrent que l'application de la fumagilline a pour conséquence une modification progressive qui conduit à l'augmentation de la quantité de glutathion.

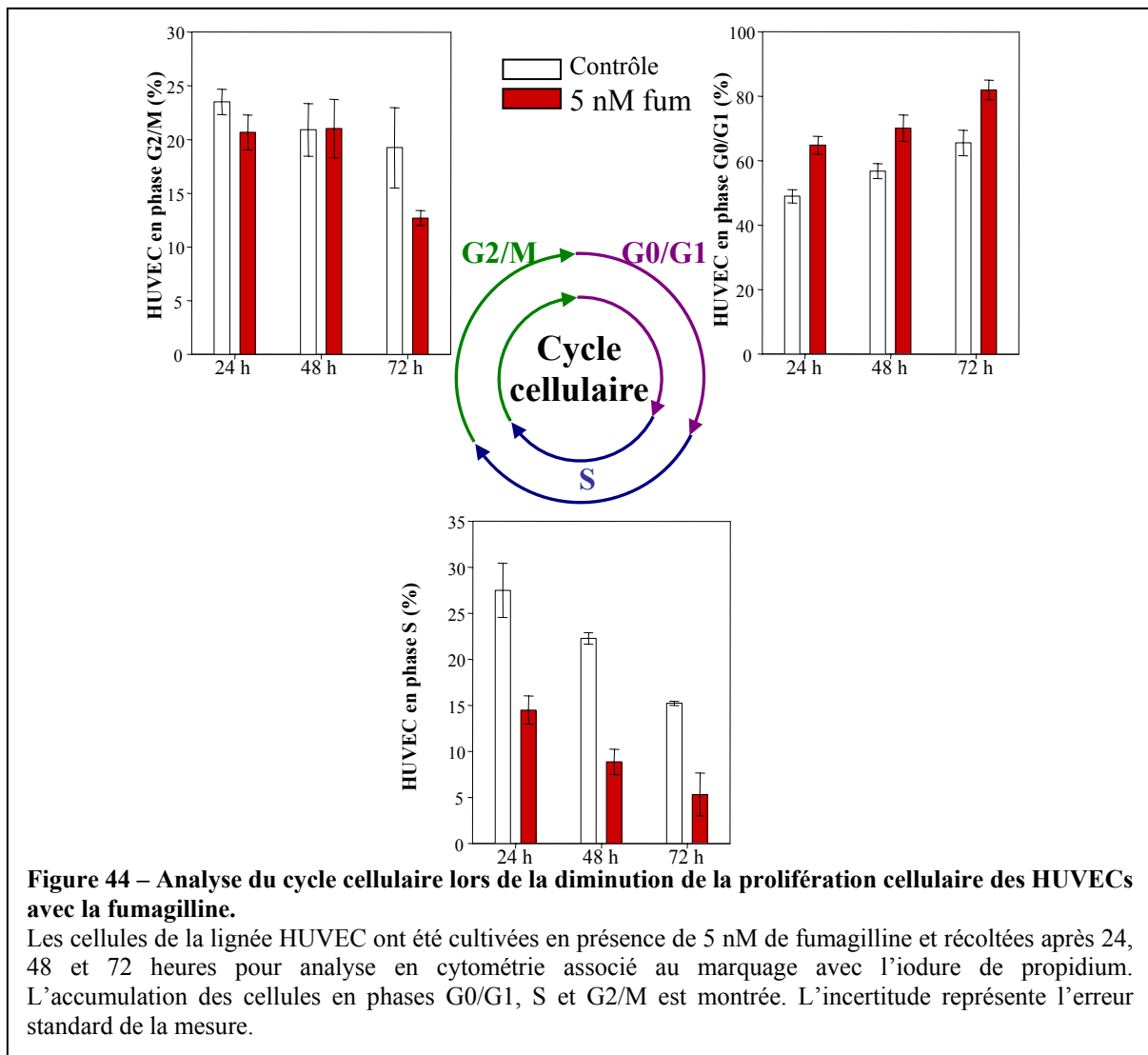


L'ensemble de ces données démontre que l'inhibition des METAP2s dans les HUVECs induit une perturbation de l'homéostasie du glutathion identique à celle que j'ai pu aussi observer chez *A. thaliana*. De manière intéressante, j'ai pu observer également une altération de l'homéostasie du glutathion dans un type cellulaire beaucoup plus résistant à la fumagilline (HCT-116) mais qui semble être contenue par la cellule. Cela constitue donc une nouvelle piste pour expliquer les différences de sensibilités entre les différentes lignées cellulaires.

D. Cycle cellulaire et complémentation lors de l'inhibition de l'activité de la METAP2 chez les HUVECs

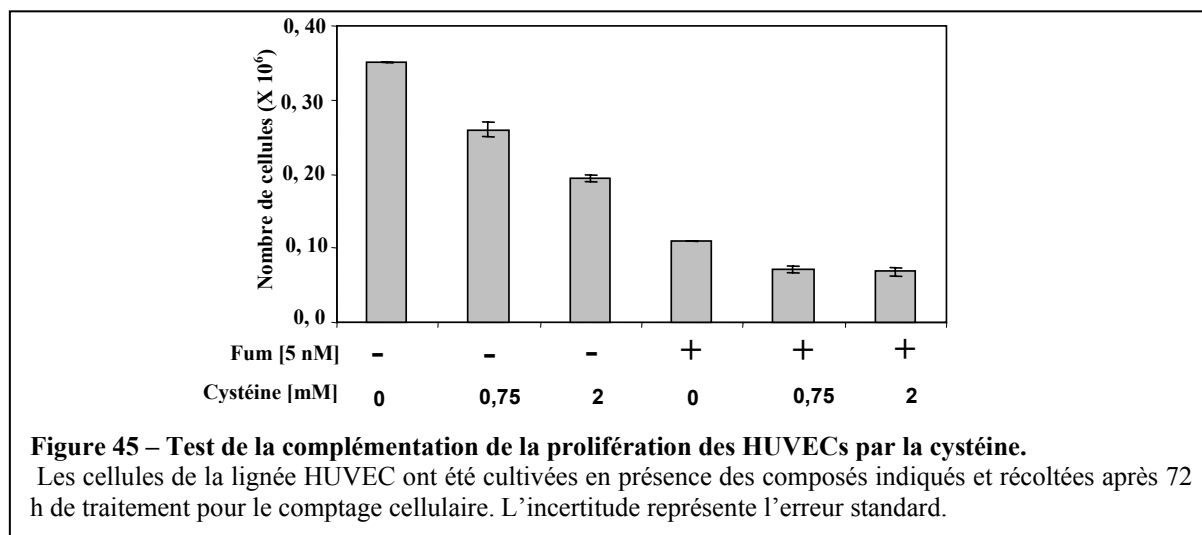
La fumagilline diminue fortement le taux de croissance de certaines lignées cellulaires humaines telles que les HUVECs. Afin de comprendre comment la fumagilline réduit la croissance cellulaire, une analyse du cycle cellulaire a été réalisée. Dans cet objectif, un marquage avec de l'iodure de propidium a été réalisé pour des HUVECs traitées ou non avec 5 nM de fumagilline. L'iodure de propidium est un agent intercalant et fluorescent qui s'incorpore dans l'ADN ; l'intensité du marquage obtenu est donc proportionnel à la quantité d'ADN cellulaire. Par conséquent, cela permet de suivre les différentes phases du cycle cellulaire. La phase G1/G0 est caractérisée par une quantité N d'ADN. Puis vient la phase S durant laquelle la synthèse d'ADN a lieu, par conséquent une quantité allant de N à 2N est visualisée. Enfin, les cellules en phase G2/M, située après la synthèse et avant la mitose, possèdent une quantité 2N d'ADN. L'utilisation d'un cytomètre permet de quantifier le signal issu de chaque cellule.

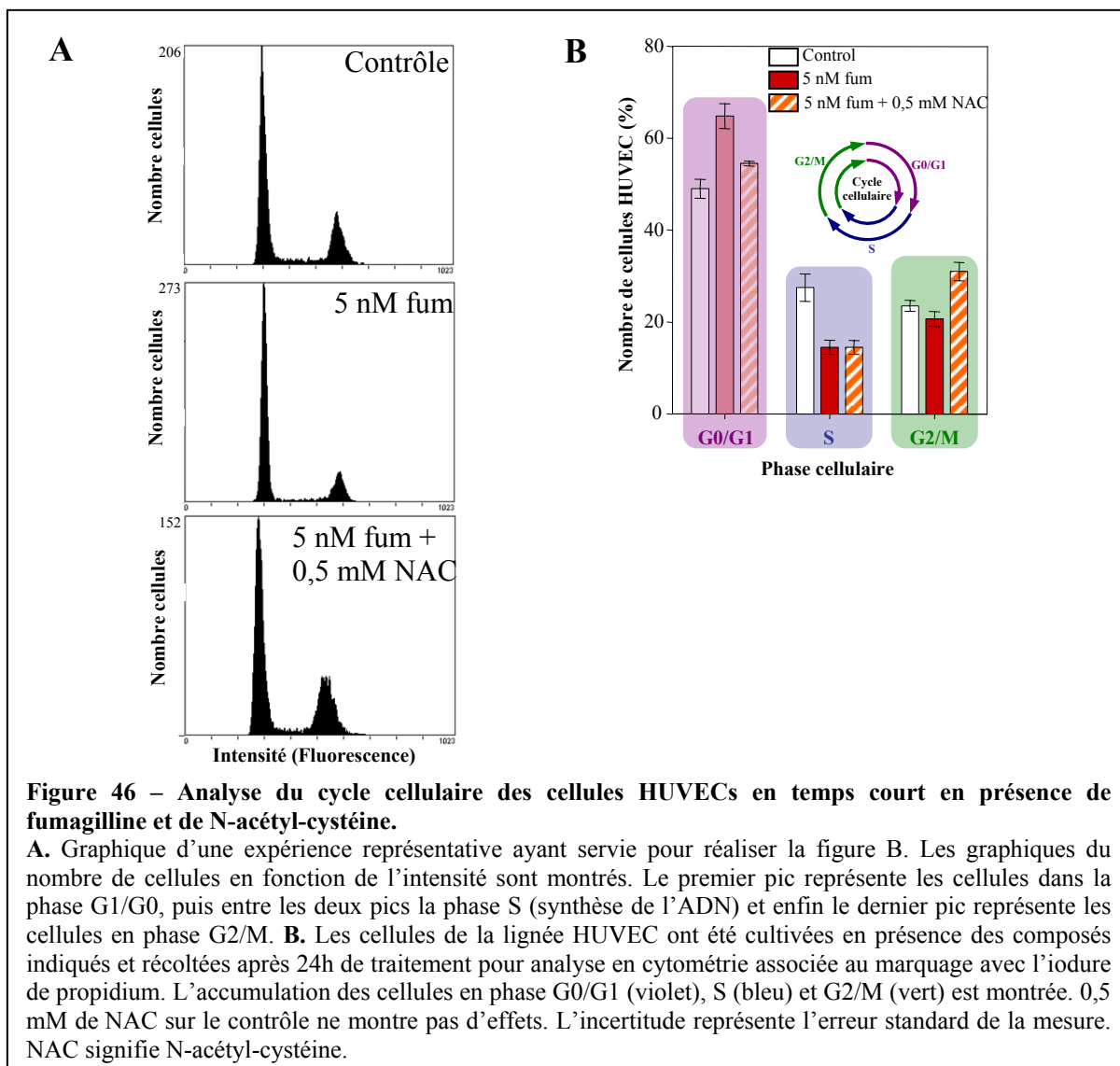
Les données obtenues montrent une accumulation de cellules en phase G0/G1 lorsque ces dernières sont traitées avec 5 nM de fumagilline (Fig. 44). Ce blocage en phase G0/G1 est aisément visualisé après 72h d'incubation avec la drogue. Des mesures à différents temps d'incubation ont également été réalisées ; elles montrent que le nombre de cellules en phase G0/G1 est augmenté dès 24h en présence de fumagilline par rapport au contrôle. Ce blocage s'accroît ensuite avec l'augmentation du temps d'incubation avec l'inhibiteur (Fig. 44). La quantité de cellules en phase S diminue également. Une diminution de la quantité de cellules en phase G2/M et après 72 h d'incubation avec la fumagilline est aussi constatée (Fig. 44). Les HUVECs cultivées sans inhibiteur présentent aussi un certain blocage en G0/G1 au fur et à mesure de la culture cellulaire. Ce phénomène est lié à la prolifération cellulaire, le nombre de cellules augmentant dans la culture induit un ralentissement de la division cellulaire, c'est l'inhibition de contact [319]. Ces résultats sont cohérents avec les premières analyses réalisées il y a 15 ans qui ont conduit les auteurs à conclure également à un blocage drogue-dépendant du cycle cellulaire en fin de phase G0/G1 [161].



Afin d'étudier le métabolisme redox dans nos conditions j'ai cultivé les HUVECs en présence de fumagilline et de différentes molécules incluant cystéine et N-acetyl-cystéine (un agent anti-oxydant non-naturel très puissant). Cependant, la cystéine n'a pas d'effet positif sur la prolifération des HUVECs traitées à la fumagilline (Fig. 45). Néanmoins, étant donné le temps de division cellulaire des HUVECs (environ 17 h), il faudrait un effet très fort et rapide de ces molécules pour observer une complémentarité sur la prolifération cellulaire. Par conséquent, nous avons décidé de tester l'effet de ces molécules sur le cycle cellulaire après 24 heures d'incubation avec la fumagilline. En effet, le blocage du cycle cellulaire est visualisé dès 24 heures et de façon reproductible (Fig. 44). Le glutathion réduit et la cystéine n'ont pas permis de mettre en évidence de complémentarité. L'application simultanée de 5 nM de fumagilline et de 0,5 mM de N-acetyl-cystéine produit des résultats intéressants. En effet, dans ces conditions le nombre de cellules en G0/G1 revient à un niveau comparable au

contrôle (Fig. 46). Cependant, une perturbation persiste toujours pour ce qui concerne le nombre de cellules en phase S. Des expériences complémentaires sont en cours afin de compléter ces données. Ensembles, ces données montrent que la diminution de la prolifération cellulaire des HUVECs consécutive à l'application de la fumagilline est liée à un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 et que l'utilisation de N-acetyl-cystéine permet de surpasser cette inhibition.





5. Spécificité de substrats des méthionine aminopeptidases

Cette partie fait référence aux données que j'ai accumulés au cours de mon travail de thèse concernant la spécificité de substrats des METAPs *in vitro*. Etant donné qu'une partie de ce travail a été publiée fin 2006 [275], j'ai choisi d'intégrer cet article sous la forme d'un résumé. En revanche, j'ai introduit le travail que j'ai effectué ces derniers mois concernant la purification de la METAP1A d'*A. thaliana* et l'étude de sa spécificité de substrat *in vitro*.

A. Etude de la spécificité de substrats des METAPs ; Résumé de l'article : « The proteomics of N-terminal methionine cleavage » (Annexe 2 et [275])

La redondance fonctionnelle observée avec les deux types de METAPs cytoplasmiques d'*Arabidopsis* et l'hétérogénéité des résultats publiés jusqu'à présent nous a conduits à initier une étude très détaillée de la spécificité de substrats de ces enzymes. Etant donné que nous ne disposions pas au début de ma thèse de formes purifiées des METAPs d'*Arabidopsis*, nous avons décidé de commencer à déterminer les règles de clivages des METAP1s et METAP2s procaryotiques. Des archétypes des METAPs, la METAP d'*E. coli* pour la METAP1 et la METAP de *P. furiosus* pour la METAP2 - ont été mis en présence d'un ensemble cohérent de peptides substrats et leur capacité à cliver le premier acide aminé a été mesurée. Ce travail m'a permis de proposer pour la première fois une vision robuste de la spécificité de substrats des deux types de METAPs. Nous avons d'abord constitué une banque ordonnée de plus de 120 peptides de 2 à 6 acides aminés de long. Ces formes présentent une spécificité remarquablement similaire qui prend en compte non seulement l'acide aminé qui suit la première méthionine (P1') mais aussi les acides aminés suivants. Nous avons démontré qu'en position P1', les acides aminés Val et Thr sont très peu efficaces, et que le clivage avec certains acides aminés en P2' et/ou P3' est impossible. En effet, les résidus tels que la proline et le glutamate influencent très négativement le clivage de la méthionine initiatrice. Ces données ont été confrontées à des données de séquences N-terminales obtenues chez *E. coli* et montrent un profil de clivage de la méthionine N-terminale tout à fait comparable à la spécificité de substrats déduite des analyses *in vitro*. Une interface informatique de prédiction en ligne (TermiNator) a été conçue au laboratoire sur ces bases. Ces données ont fait l'objet d'une publication en 2006 [275] et TermiNator fait partie des nouveaux sites de prédiction de modifications post-traductionnelles disponibles sur le site Swiss-prot (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/index.html>).

B. Purification et caractérisation de AtMETAP1A

Le cytoplasme d'*A. thaliana* possède trois METAPs: METAP1A (At2g45240), METAP2A (At2g44180) et METAP2B (At3g59990). Les deux types de METAPs sont fonctionnellement interchangeables chez *A. thaliana* [82]. La METAP d'*E. coli* (type 1) et

celle de *P. furiosus* (type 2) ont une spécificité de substrats très similaire [275]. Afin de vérifier que les METAPs d'*A. thaliana* ont une spécificité de substrats similaire, la purification de ces METAPs cytoplasmiques a été entreprise.

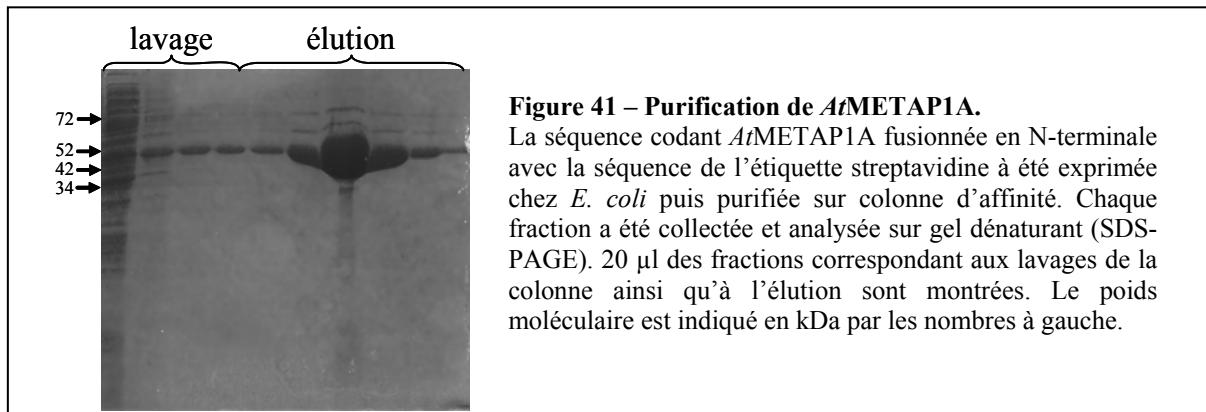
Les clones des ADNc codant les METAPs nous ont été fournis par la base de données d'*A. thaliana* TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>). Les séquences des clones DKLAT2G45240 (*AtMETAP1A*), DKLAT2G44180 (*AtMETAP2A*) et DKLAT3G59990 (*AtMETAP2B*) ont été vérifiées par séquençage et ont été ensuite utilisées pour les sous clonages (voir matériels et méthodes). J'ai décidé d'utiliser une stratégie de type « tag d'affinité » pour purifier les METAPs. La technologie étiquette streptavidine (strep-tag) a été retenue plutôt que l'étiquette histidine car les METAPs sont des metalloprotéases et l'étiquette histidine est connue pour sa capacité de fixation des cations. Elle risque donc de perturber ou d'abolir l'activité enzymatique de la protéine purifiée.

Les séquences entières des trois METAPs ont été sous clonées dans le plasmide pet-51b+ (Novagen). Le strep-tag a été positionné en N-terminale de la séquence des METAPs car l'activité est portée par un domaine en position C-terminale dans la protéine. Les trois enzymes ont pu être sous clonées ainsi (matériels et méthodes).

Le plasmide pet-51b+ contenant la séquence de *AtMETAP1A* a été intégré dans les bactéries d'expressions BL21 (Invitrogen). Une colonie de transformants a servi pour la réalisation de la culture d'expression. Plusieurs températures pour l'induction de l'expression ont été testées et finalement 20°C a été retenue. L'expression a donc été induite à 20°C à l'aide de 0,3 mM d'IPTG lorsque dans la densité optique à 600 nm a atteint approximativement 0,6 ; la culture est ensuite poursuivie. Les bactéries sont finalement récupérées 15 h après l'ajout de l'IPTG. Les cellules sont lysées par sonication et l'extrait protéique obtenu est appliqué à 4°C sur une résine Streptavidine et puis élué. Les fractions ont été analysées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Fig. 47). La présence dans les fractions d'éluion d'une bande de forte intensité migrant à environ 50 kDa (Fig. 47) suggère que *AtMETAP1a* a été purifiée étant donnée que sa masse moléculaire théorique est de 46,3 kDa. Une migration apparente d'environ 50 kDa a aussi été observée pour la METAP1 de levure [320]. Après une seule étape de purification *AtMETAP1a* a pu être purifiée à 90 % d'homogénéité (Fig. 47). Les trois fractions d'éluion contenant les bandes les plus intenses ont été rassemblées et dialysées.

Les tests d'expression pour *AtMETAP2A* et *AtMETAP2B* se sont révélés non

concluants pour le moment et ils ne m'ont pas permis d'entamer leur purification. Cette difficulté peut s'expliquer par l'extension N-terminale des METAP2s qui apparaît largement non structurée dans d'autres organismes dont la structure a été résolue [46]. De plus, le domaine N-terminal des METAP2s est dispensable pour leur activité [67]. Des tests d'expressions avec une forme tronquée en N-terminale des *AtMETAP2* sont en cours au laboratoire.



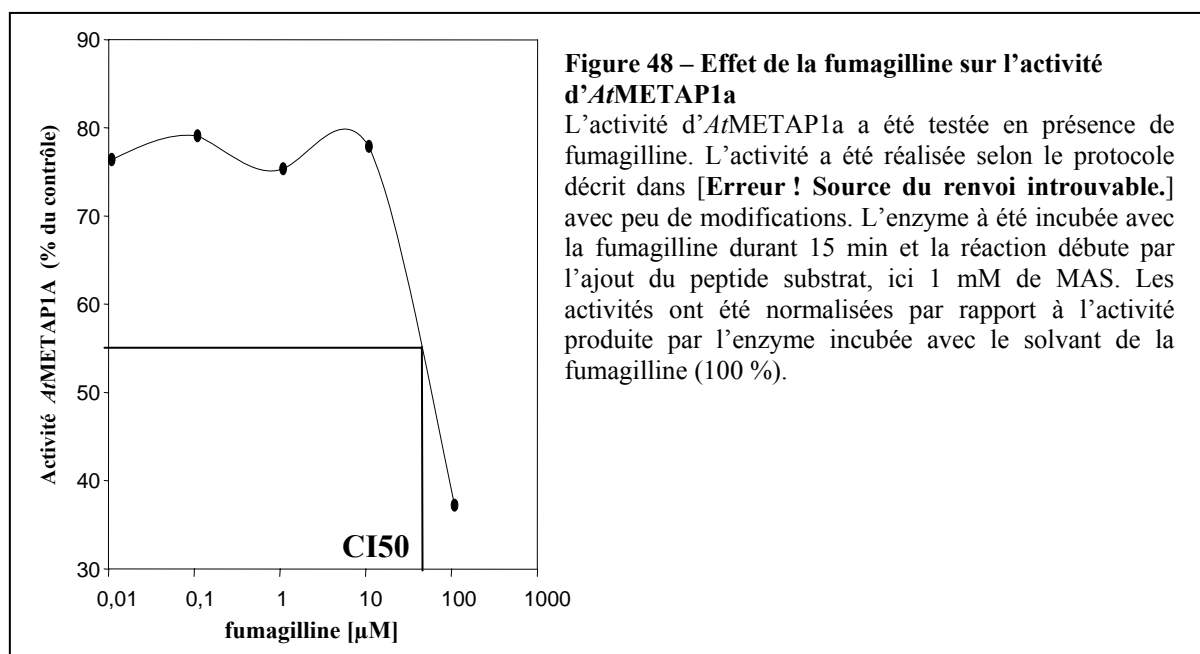
L'activité de l'enzyme *AtMETAP1A* purifiée a été essayée en utilisant le test d'activité décrit dans [275]. Avec le substrat MAMKS, l'enzyme purifiée montre une valeur d'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) de $280\,200 \pm 56\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ associé à un K_m de $29 \pm 15 \mu\text{M}$ et un k_{cat} de $8,4 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$ (Tab. 2) ; ces valeurs sont très similaires aux valeurs obtenues avec la METAP d'*E. coli* (efficacité catalytique de $81\,700 \pm 8\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; K_m de $50 \pm 10 \mu\text{M}$; k_{cat} de $3,9 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ [275]). Par conséquent, l'enzyme que j'ai purifiée est active et de manière similaire à la METAP d'*E. coli*. Un test avec le tripeptide AAA n'a pas détecté de clivage ($< 0,002 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) ce qui confirme le caractère spécifique de l'enzyme pour la méthionine en position P1 (Tab. 2). De plus, le dipeptide MA a une activité catalytique non mesurable ($< 0,002 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Tab. 2) confirmant les données déjà obtenues sur l'influence de la taille du peptide utilisé [275].

Peptide	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}.s^{-1}$)
MAMKS	$0,029 \pm 0,015$	$8,4 \pm 0,3$	280244 ± 56049
AAA	nm	nm	<0,002
MA	nm	nm	<0,002
MVS	$4,8 \pm 1,9$	$0,12 \pm 0,02$	24 ± 1
MTS	$2,9 \pm 0,9$	$0,55 \pm 0,07$	188 ± 10
MAS	$0,85 \pm 0,18$	$6,7 \pm 0,5$	7875 ± 854
MSS	$1,3 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,5$	3479 ± 461
MGs	$1,2 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,1$	1481 ± 121
MKS	nm	nm	<0,002
MDS	nm	nm	<0,002

Table 2 – Paramètres catalytiques du clivage de la méthionine N-terminale par *At*METAP1A pour les peptides substrats utilisés

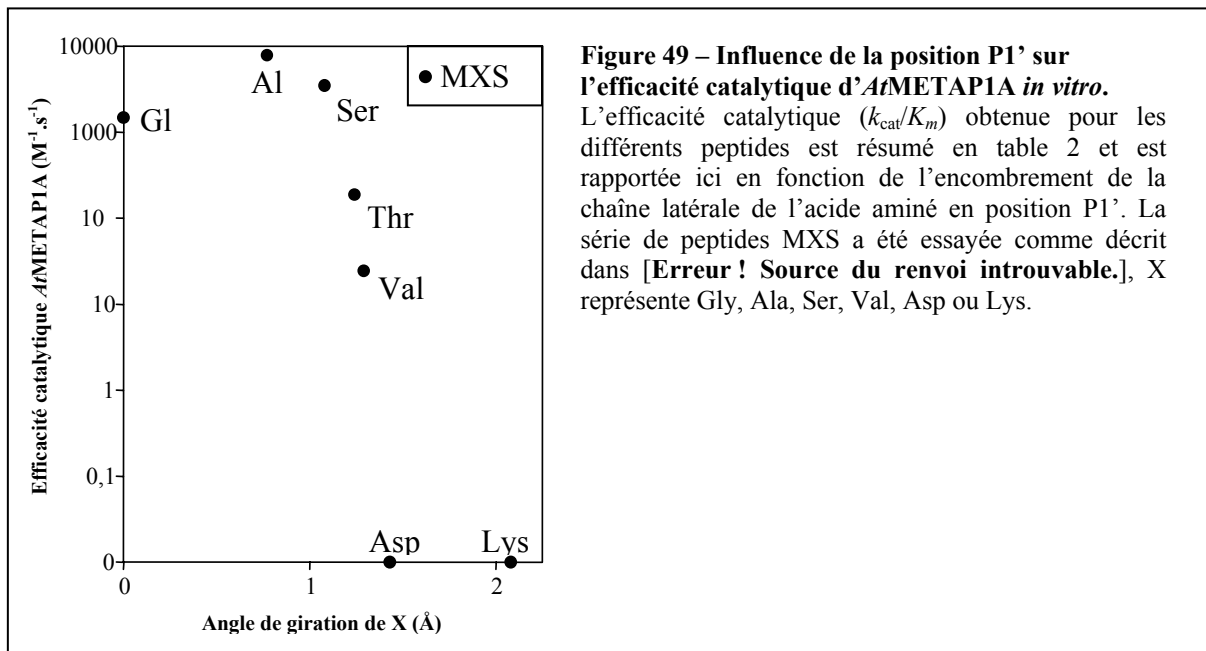
L'activité de *At*METAP1A purifiée a été essayée en utilisant une série de peptides substrats. Le K_m , k_{cat} et l'efficacité catalytique du clivage (k_{cat}/K_m) sont montrés. Le test utilisé est celui décrit dans Frottin et al. [Erreur ! Source du renvoi introuvable.]. nm signifie non mesurable: avec la sensibilité du test et la plus forte concentration en enzyme utilisée, pas de clivage de la methionine n'a été observé; <0,002 est la plus basse valeur détectable.

En outre, la fumagilline inhibe *in vitro* très faiblement l'enzyme que j'ai purifiée. En effet, 100 μ M de fumagilline est nécessaire pour diminuer de 60 % l'activité enzymatique en présence de 50 nM d'enzyme (Fig. 48). Cela signifie que le CI50 est de l'ordre de 50 μ M. Rappelons que pour la même concentration de *Pf*METAP2, 25 nM de fumagilline inhibe 50 % de l'activité enzymatique (Fig. 30). Par conséquent, ces données appuient l'hypothèse que la METAP purifiée se comporte comme une METAP de type 1, une forme très peu sensible à la fumagilline.



Afin de vérifier si la spécificité de substrats est également similaire à la celle de la

forme bactérienne, différents peptides ont été testés. Les peptides utilisés font partie de la série MXS, qui a déjà été utilisée auparavant, X étant l'acide aminé variable. L'observation des résultats obtenus avec cette série montre que l'efficacité catalytique de l'enzyme est dépendante de l'encombrement de la chaîne latérale en position P1' (représenté par l'angle de giration) (Fig. 49). En effet, les acides aminés tels que G, A et S favorisent le clivage de la méthionine N-terminale. Des acides aminés plus encombrants tels que T et V diminuent l'efficacité catalytique du clivage d'un ou deux ordres de grandeurs. Enfin, des acides aminés plus imposants ne permettent pas le clivage à cette position (Fig. 49). La confrontation de ces données avec celles précédemment obtenues pour la METAP d'*E. coli* montre une similarité très forte du profil obtenu [275]. Ainsi, à la position P1', la spécificité de substrats de AtMETAP1A est similaire à celle d'*E. coli* et est fortement dépendante de l'encombrement de la chaîne latérale.



DISCUSSION

Table des matières - Discussion

Maturation, destinée cellulaire des protéines et thérapeutique	128
I. La NME, une spécificité de substrats très conservée	129
1. <i>Spécificité de substrats des METAPs procaryotiques</i>	130
2. <i>Spécificité de substrats des METAPs cytoplasmiques d' A. thaliana</i>	131
3. <i>Le cas de la spécificité de substrats des METAPs cytoplasmiques chez l'Homme</i>	134
II. Evénements physiologiques associés à l'inhibition de l'excision de la méthionine N-terminale dans le cytoplasme d'un eucaryote supérieur	134
1. <i>Le glutathion comme une cible physiologique de la NME</i>	134
III. Le maintien de la méthionine N-terminale, signal de dégradation	139
1. <i>Le maintien de la méthionine N-terminale des protéines dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs : un rôle déstabilisant</i>	139
2. <i>L'influence de l'apparition de la méthionine N-terminale sur d'autres voies : ubiquitination N-terminale et N-α-acétylation</i>	141
3. <i>La situation dans le chloroplaste, un modèle d'étude de la NME</i>	144
4. <i>H. volcanii, un modèle d'étude des voies associées à la NME</i>	146
IV. L'excision de la méthionine N-terminale chez les mammifères, cycle cellulaire et glutathion	147
1. <i>L'homéostasie rédox et le cycle cellulaire</i>	148
2. <i>D'autres cibles de la NME</i>	151
V. L'excision de la méthionine N-terminale : processus ubiquitaire et voies associées conservées	154
1. <i>Le glutathion</i>	154
2. <i>La protéolyse</i>	156
VI. Conclusions - perspectives	156

Maturation, destinée cellulaire des protéines et thérapeutique

La NME, processus ubiquitaire, est essentiel à la survie de tout organisme. Ce processus de maturation protéique est le premier événement protéolytique affectant une protéine. Il s'agit d'un événement co-translationnel bien que la dynamique mise en place au voisinage du ribosome reste encore largement énigmatique. Les METAPs sont les principales enzymes responsables de la diversité du résidu N-terminal. La spécificité de substrats des METAPs est bien définie et a été étudiée en combinant des approches réalisées *in vitro* avec des enzymes purifiées à des données de séquence N-terminale issues de protéines produites *in vivo*.

Il y a plus de dix ans, les METAPs ont été identifiées comme cibles de composés d'importance thérapeutique, stimulant ainsi les recherches concernant la NME. Néanmoins, du fait de l'essentialité de ce processus, de la redondance fonctionnelle et du nombre de cibles de la NME, peu d'éléments étaient connus sur le rôle de la NME dans le cytoplasme d'un eucaryote supérieur. Ainsi, pourquoi le maintien de la méthionine N-terminale provoque la mort de l'organisme est resté longtemps sans réponse. Au début des années 2000 quelques données produites en utilisant des protéomes simplifiés ont suggéré que la méthionine N-terminale pouvait être un signal de déstabilisation d'une protéine. Néanmoins, la situation dans le cytoplasme d'un eucaryote supérieur était largement incomprise malgré le besoin impératif de connaissances fondamentales sur ce mécanisme pour pouvoir développer des applications thérapeutiques pertinentes.

En utilisant un organisme eucaryote supérieur modèle, *A. thaliana*, pour lequel un système permettant de moduler l'activité de la NME cytoplasmique avait été mis au point, j'ai pu montrer que la diminution de la NME cytoplasmique entraîne une augmentation de la protéolyse, le maintien de la méthionine initiatrice pouvant donc aussi être un signal de déstabilisation dans le cytoplasme eucaryotique. Cette plus forte propension des protéines à être dégradées accroît la concentration intracellulaire d'acides aminés libres, augmentant en conséquence la synthèse du glutathion. Le rapport GSH/GSSG est perturbé lors de la diminution de la NME cytoplasmique à cause de l'augmentation du GSH et une quantité de pouvoir réducteur limitante pour réduire suffisamment de GSSG en GSH. Cette perturbation de l'homéostasie du glutathion a pu être vérifiée chez les plantes, mammifères, levures et archées où l'ajout de glutathion réduit ou de son précurseur limitant permet de restaurer un

phénotype sauvage malgré la diminution de la NME cytoplasmique. La nature de la ou des protéase(s) et le(s) mécanisme(s) de ciblage des protéines déstabilisées par l'inhibition de la NME cytoplasmique ne sont toujours pas identifiés mais impliquent probablement le protéasome. En outre, en utilisant un système où les cibles physiologiques de la NME étaient déjà caractérisées - le chloroplaste - nous avons pu montrer que l'absence de NME pour certains substrats (D1 et D2) provoque une perte de leur capacité à être reconnue par la protéase FtsH. Dans les cellules de mammifères, l'inhibition de la NME cytoplasmique est également associée à un blocage du cycle cellulaire. Dans ces cellules, une corrélation entre la perturbation du glutathion cellulaire et la résistance à l'inhibition de l'activité des METAP2s a été constatée ce qui fournit une piste supplémentaire pour expliquer la différence de sensibilité des cellules de mammifères aux inhibiteurs de METAP2s.

I. La NME, une spécificité de substrats très conservée

La NME est un processus qui affecte la majorité des protéines et qui a lieu dès que les premiers résidus de la protéine émergent du tunnel de sortie du ribosome. La NME est la principale voie responsable de la diversité de l'acide aminé N-terminal. Les méthionines initiateuses sont N-formylées chez les eubactéries et dans les organites eucaryotiques et cela empêche l'action des METAPs [32]. Cependant, le groupement formyle est retiré systématiquement par les peptide déformylases (PDFs). Les PDFs ayant une spécificité de substrats restreinte à la méthionine formylée, il en résulte que virtuellement toutes les protéines seront déformylées ce qui permet l'action des METAPs. Chez les archées [271, 321] et dans le cytoplasme eucaryotique la méthionine initiateuse n'est pas formylée [21], la voie de la NME est donc uniquement assurée par des METAPs. Dans tous les compartiments cellulaires où a lieu la NME c'est donc l'action des METAPs qui détermine la nature du résidu N-terminal. Les METAPs présentent une spécificité de substrats qui a fait l'objet de différentes études par le passé. Néanmoins, le manque d'uniformité des expériences réalisées ainsi que l'apparition de données *in vivo* de séquences N-terminales ne permettaient pas d'avoir une vision claire de la spécificité de substrats des deux types de METAPs.

1. Spécificité de substrats des METAPs procaryotiques

En utilisant les enzymes purifiées d'*E. coli* pour la METAP1 et de *P. furiosus* pour la METAP2 en combinaison avec un ensemble cohérent de peptides substrats, j'ai pu confirmer que la position P1' (acide aminé suivant la méthionine initiatrice, nomenclature dite de Schechter [83]) est le déterminant majeur du clivage de la méthionine N-terminale. C'est l'encombrement de la chaîne latérale du résidu à cette position qui dicte la spécificité de substrats des METAPs. Les résidus peu encombrants tels que Gly, Ala ou Ser (avec un rayon de giration $r < 1,30 \text{ \AA}$) permettent la réaction tandis que ceux plus imposants à cette position interdisent le clivage ($r > 1,30 \text{ \AA}$). De manière intéressante, en position P1' les résidus tels que Thr et Val, qui présentent un encombrement stérique moyen ($1,20 < r < 1,30 \text{ \AA}$), induisent un clivage peu efficace de la première méthionine [275] (Fig. 50). En outre, j'ai pu montrer que les positions plus en aval de la séquence N-terminale (P2', P3', P4') sont également influentes [275]. L'analyse comparative entre les résultats obtenus pour les deux types de METAPs révèle qu'elles ont une spécificité de substrats très similaire. De plus, l'ensemble de ces données acquis *in vitro* a été confronté à plus de 800 séquences N-terminales obtenues *in vivo* chez *E. coli*. Ces données *in vivo* sont concordantes avec la spécificité de substrats déduite des études avec les enzymes purifiées [275].

En 2006, 873 peptides N-terminaux avaient été identifiés chez deux archées (*H. salinarum* et *N. pharaonis*) [271]. Les résultats que les auteurs ont décrits sont en tous points en accord avec les résultats que j'ai obtenus *in vitro*. L'absence de méthionine N-terminale a été visualisée pour des protéines ayant en position P1' les acides aminés Gly, Ala, Pro, Val, Ser et Thr. Peu après, la séquence de plus de 200 peptides N-terminaux provenant d'*H. volcanii* a été publiée [272] et 70% des séquences identifiées y avaient subi la NME conformément aux « règles » précédemment décrites. Enfin, bien que peu de séquences N-terminales ont été identifiées, il semble que la spécificité de substrats des METAPs soit également conservée chez les archées méthanogènes et celles du genre *Sulfolobus* [322, 323, 324].

2. La spécificité de substrats des METAPs cytoplasmiques d'*A. thaliana*

Chez *A. thaliana*, les METAPs n'ont jamais été purifiées. Durant ma thèse j'ai pu

obtenir des données concernant la spécificité de substrats de la METAP1 cytoplasmique d'*A. thaliana*. Après expression et purification de cette enzyme à l'aide d'une étiquette streptavidine placée en position N-terminale, j'ai initié l'étude de sa spécificité de substrats. Les résultats que j'ai obtenus concernent uniquement la position P1' et sont concordants avec l'étude réalisée *in vitro* avec les METAPs procaryotiques. Néanmoins, d'autres analyses seront requises pour analyser notamment l'influence de la position P2' sur l'efficacité catalytique du clivage. En outre, il conviendra aussi de purifier et d'analyser la spécificité de substrats des METAP2s d'*A. thaliana* afin d'avoir une vision juste de la situation dans le cytoplasme de ce modèle eucaryotique et de la contribution respective des deux types de METAPs. Néanmoins, les deux types d'enzymes étant fonctionnellement interchangeables dans le cytoplasme d'*A. thaliana* [82], on s'attend à ce que les METAP2s présentent une spécificité de substrats similaire ou peu différente de celle de la METAP1. En outre, 42 séquences de peptides N-terminaux ont été obtenues chez *A. thaliana* [1]. Cet ensemble se caractérise par un profil d'excision de la méthionine N-terminale conforme à la spécificité de substrats des METAPs décrite jusqu'à présent. Plus de 100 séquences N-terminales uniques d'*A. thaliana* provenant de fraction protéiques membranaires et solubles ont été obtenues et montrent également un clivage principalement dépendant de l'encombrement de la chaîne latérale du résidu en position P1' suivant les règles déduites des analyses précédentes [263].

3. Le cas de la spécificité de substrats des METAPs cytoplasmiques chez l'Homme

En 2010, la spécificité de substrats des METAPs cytoplasmiques humaines et de la METAP d'*E. coli* purifiées a été étudiée en utilisant des séries combinatoires de peptides. Les données rapportées par les auteurs sont très similaires aux résultats que j'ai moi-même obtenus. En effet, pour l'enzyme d'*E. coli* les auteurs rapportent que les acides aminés Ala, Gly, Cys, Pro et Ser en position P1' permettent un clivage complet de la méthionine N-terminale hormis lorsqu'une Pro est en position P2'. Lorsqu'un résidu Thr ou Val se trouve en position P1' en l'absence de Pro en P2' l'efficacité du clivage est variable et dépend d'autres éléments tels que la nature des acides aminés aux positions P2', P3', P4' et P5', le niveau d'expression des protéines et les conditions de croissance. Toute combinaison alternative ne permet pas le clivage de la méthionine initiatrice [325]. Ainsi ces résultats sont

concordants avec ceux que j'ai obtenus. L'utilisation des enzymes purifiées humaines a permis aux auteurs américains de suggérer que chez les mammifères, les protéines ayant une Ala, Cys, Gly, Pro et Ser en P1' subissent le clivage complet de la méthionine initiatrice et réalisé par les deux types de METAPs. Les résidus Val et Thr en position P1' engendrent un clivage peu efficace de la méthionine initiatrice et est catalysé principalement par la METAP2 et dépend aussi des résidus suivants. Ainsi, la présence de résidus Asp, Glu ou Pro en position P2' induit un clivage incomplet ou une absence de clivage de la première méthionine. Ces résultats montrent encore une fois une très grande conservation de la spécificité de substrats des METAPs à travers le vivant. De même, comme pour les formes procaryotiques, les deux types de METAPs humaines démontrent une spécificité de substrats très similaire. Néanmoins, une différence de spécificité de substrats entre les deux enzymes humaines a été découverte. En effet, les substrats ayant une Val ou une Thr en P1' sont principalement clivés par la METAP2. De même, pour appuyer ces données, la majorité des substrats spécifiques des METAP2s identifiés *in vivo* sont des protéines ayant une Val en position P1' ([325] et référence citées dedans). Ces résultats peuvent être expliqués par la taille de la poche S1' du site actif de la METAP1 par rapport à celle de la METAP2 [41].

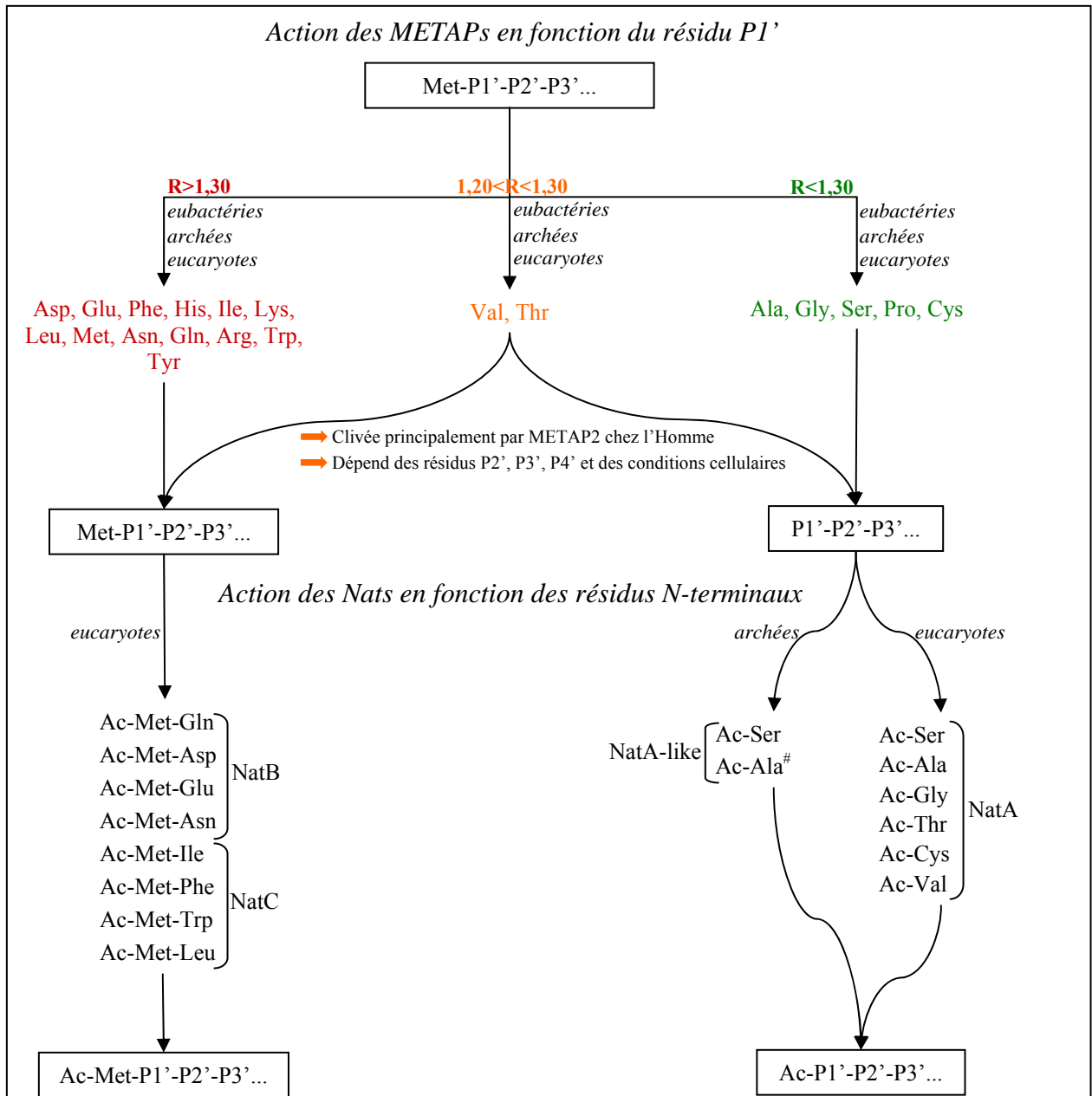


Figure 50. Spécificité de substrats de la NME et de la N- α -acétylation

Le déterminant majeur de la spécificité de substrats des METAPs est l'encombrement de la chaîne latérale du résidu en position P1' (nomenclature de Schechter [Erreur ! Source du renvoi introuvable.]) et cela est conservé à travers le vivant ainsi qu'entre les deux types de METAPs. En rouge, les résidus ne permettant pas à cette position un clivage de la méthionine N-terminale, en vert ceux le permettant et en orange les résidus induisant un clivage peu efficace de la méthionine initiatrice et dépendant d'autres facteurs. L'N- α -acétylation a lieu chez les archées et dans le cytoplasme eucaryotique. La N- α -acétylation est exceptionnelle chez les eubactéries. Différentes Nats existent chez les eucaryotes et ont une spécificité de substrats différente. Chez les archées, il existe une Nat de type NatA. R ; rayon de giration de la chaîne latérale (Å) ; les acides aminés sont notés en utilisant le code à trois lettres. # signifie que l'acétylation de l'Ala est partielle chez les archées

II. Événements physiologiques associés à l'inhibition de l'excision de la méthionine N-terminale dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs

La NME est un processus essentiel à la survie cellulaire et de ce fait toute inactivation ou inhibition totale de la NME est associée à un phénotype léthal ce qui en a compliqué les études fonctionnelles. Il en résulte que le maintien systématique d'un unique acide aminé en position N-terminale, la méthionine, engendre la mort de l'organisme. Jusqu'à présent très peu d'études se sont focalisées sur cette question en particulier dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs. En effet, la cascade d'événements reliant l'apparition systématique de la méthionine initiateur lors de l'inhibition de la NME cytoplasmique et la mort de l'organisme était très largement énigmatique. De plus, depuis plus de 10 ans, il est acquis que les METAPs sont la cible de composés ayant notamment un effet anticancéreux [277, 89, 90]. Dans le cytoplasme des eucaryotes la situation est également complexe car les deux types de METAPs y sont retrouvés posant également la question du rôle et de l'importance relative des deux types de METAPs dans ce même compartiment cellulaire. Les données obtenues avec les analyses de spécificité de substrats sont importantes afin de définir l'ensemble des protéines substrats de la NME et de comprendre la contribution respective des deux types de METAPs dans le processus. En effet, c'est parmi les protéines substrats des METAPs qu'il y a les protéines responsables du phénotype sévère observé dès lors que leur méthionine N-terminale est maintenue. Néanmoins, la NME affecte environ deux tiers d'un protéome donné, ce qui représente dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs milliers de protéines substrats différentes, ceci empêche toute étude de protéines cibles une à une comme première approche.

1. Le glutathion comme une cible physiologique de la NME

Chez le modèle *A. thaliana*, il a été mis au point en 2005 un système unique chez un eucaryote supérieur pour moduler l'expression de la NME cytoplasmique. Ce système repose sur (i) la construction d'un mutant dans lequel le gène *METAP1A* a été inactivé, (ii) la vérification que la fumagilline agit comme un inhibiteur spécifique des METAP2s et (iii) que chaque système d'inactivation utilisé séparément n'induit aucun phénotype sur la plante.

Ainsi, l'application sur le mutant *metap1a* d'une concentration en fumagilline inhibant toute l'activité METAP2 est létale confirmant l'essentialité de la NME cytoplasmique chez *A. thaliana* [82]. Cette même concentration de fumagilline appliquée dans le milieu de culture de la lignée sauvage d'*A. thaliana* n'a pas d'effets visibles tout comme le mutant nul de la METAP1A appuyant l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle des deux types de METAPs cytoplasmiques chez *A. thaliana* [82]. Ce résultat fonctionnel est en accord avec la spécificité de substrats décrite pour les deux types de METAPs cytoplasmiques [275, 325] et avec les premiers résultats que j'ai obtenus avec la METAP1A purifiée d'*A. thaliana*. Nous avons souhaité identifier les composants qui font de la NME un processus essentiel c'est-à-dire les composants les plus sensibles à l'inhibition de la NME cytoplasmique. Pour cela, il nous a fallu déterminer des conditions dans lesquelles la NME est inhibée partiellement mais suffisamment pour engendrer un phénotype et ainsi découvrir les cibles les plus dépendantes de la NME. Pour cela, le mutant *metap1a* a été cultivé en présence de différentes concentrations en fumagilline ce qui permet de moduler le niveau de NME cytoplasmique [82]. Un phénotype sévère et reproductible est obtenu avec 100 nM de fumagilline appliqué sur le mutant *metap1a*. Par conséquent, cette condition a été retenue et constitue notre système biologique dans lequel la NME cytoplasmique est diminuée partiellement. Une analyse par spectrométrie de masse a permis de vérifier *in vivo* l'effectivité de l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique [1].

En utilisant ce système de modulation de la NME cytoplasmique conjointement avec une étude protéomique sans *a priori* dans le but d'identifier les voies physiologiques les plus dépendantes de la NME cytoplasmique, j'ai pu pour la première fois dans le cytoplasme d'un eucaryote supérieur identifier comme cible physiologique de la NME cytoplasmique le glutathion cellulaire. La complémentation du phénotype induit par la diminution de la NME cytoplasmique avec du glutathion réduit ou son précurseur limitant la cystéine constitue un exemple frappant de l'existence d'un lien entre ces deux grands processus cellulaires [1]. Le glutathion est le thiol non protéique cellulaire majeur à travers le vivant et est essentiel à l'homéostasie redox cellulaire et donc à la survie cellulaire. J'ai pu démontrer que la diminution de la NME cytoplasmique induit chez *A. thaliana* une perturbation du statut du glutathion cellulaire. En effet, j'ai constaté une augmentation de la quantité de glutathion (formes réduite et oxydée) lors de la diminution de la NME cytoplasmique. De plus, le rapport GSH/GSSG est plus bas que dans les contrôles et le reste au cours du développement de la

plantule. Ces événements ont pour origine une augmentation de la quantité de protéines destinées à la dégradation, observées notamment à travers une accumulation des produits de la protéolyse lors de la diminution de la NME cytoplasmique incluant les acides aminés constitutifs du glutathion. En effet, la synthèse du glutathion réduit est soumise à de nombreux niveaux de contrôle, un des plus importants étant la disponibilité en cystéine [326]. Par exemple, une stimulation de la synthèse de cystéine provoque une accumulation du glutathion [327]. En outre, le NADPH produit par le métabolisme de la cellule n'apparaît pas être en quantité suffisante dans les cellules ayant leur niveau de NME cytoplasmique diminué [1]. Le NADPH est produit par la voie des pentoses-phosphates qui régénère le NADPH à partir du NADP⁺. La NADPH ayant un potentiel rédox très bas, cela lui permet d'être le premier donneur d'hydrogène du système rédox. En effet, ce métabolite est essentiel à l'activité de la glutathion réductase et de ce fait influence grandement le rapport GSH/GSSG. Parmi les protéines sensibles à la diminution de la NME cytoplasmique, nous avons retrouvé des enzymes intervenant dans la voie des pentoses-phosphates. Pour la première fois, il a été montré que la NME cytoplasmique contrôle l'homéostasie du glutathion cellulaire à travers la protéolyse chez un eucaryote supérieur [1] (Fig. 51).

J'ai également recherché si le phénotype induit par la diminution de la NME cytoplasmique peut être dû à d'autres phénomènes notamment liés à la perturbation du métabolisme du glutathion. En effet, j'ai pu montrer par exemple que la diminution de la NME cytoplasmique n'induit pas une oxydation généralisée de la cellule bien qu'un certain niveau d'oxydation constant soit observé dans tous les échantillons y compris ceux ayant une NME pleinement fonctionnelle. Cela est dû très probablement à l'oxydation des protéines qui est connue pour avoir lieu lors de la germination et correspond à un changement métabolique déjà décrit [328, 282].

Une des propriétés du fer cellulaire est son implication dans la biogenèse des centres [fer-S] nécessaire à l'activité de certaines protéines. Ces centres sont des cofacteurs de nombreuses protéines et donc importants pour la survie cellulaire. De plus, des mutations dans la voie de biosynthèse de ces cofacteurs chez l'Homme conduisent à des pathologies neurologiques. Chez les eucaryotes, un des composants de la biogenèse de ces centres est le glutathion. En effet, il a été précédemment constaté qu'une perturbation de l'homéostasie du glutathion cellulaire affecte la maturation des protéines cytosoliques à centre [fer-S] [329]. Réciproquement, les cellules ayant un défaut de maturation des protéines cytoplasmiques à

centres [fer-S] accumulent du glutathion [330]. Chez les plantes, il a été suggéré que les glutarédoxines (oxydoréductases structurellement reliées aux thiorédoxines) de types II sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie du fer [8]. Plus récemment, il a été suggéré que le glutathion agisse dans la même cascade d'évènements que celle de la biogenèse de ces centres [331, 332, 333, 334]. Dans ce contexte et sachant que la quantité de glutathion cellulaire augmente lors de la diminution de la NME cytoplasmique j'ai essayé de compléter le phénotype en ajoutant du fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}) dans le milieu de culture sans constater de complémentation. L'absence de complémentation du phénotype en conditions non limitantes en fer et les résultats des dosages écartent l'hypothèse d'un défaut de disponibilité de fer cellulaire dans nos échantillons.

Enfin, un des produits de la réaction catalysée par les METAPs est la méthionine qui sera recyclée dans le métabolisme des acides aminés soufrés ou re-incorporée dans une protéine. Etant donnée le coût cellulaire de production de cet acide aminé, la NME a également un rôle de recyclage de cet acide aminé. En outre, la concentration cellulaire en méthionine libre peut contrôler l'activité des METAP2s. C'est le cas chez la levure où la quantité naturellement élevée de cet acide aminé dans le cytoplasme du champignon inhibe la METAP2 [80]. Différents tests de complémentation réalisés chez *A. thaliana* en utilisant la méthionine ou ces précurseurs n'ont pas permis d'établir clairement l'importance de la NME dans le recyclage de la méthionine chez la plante modèle.

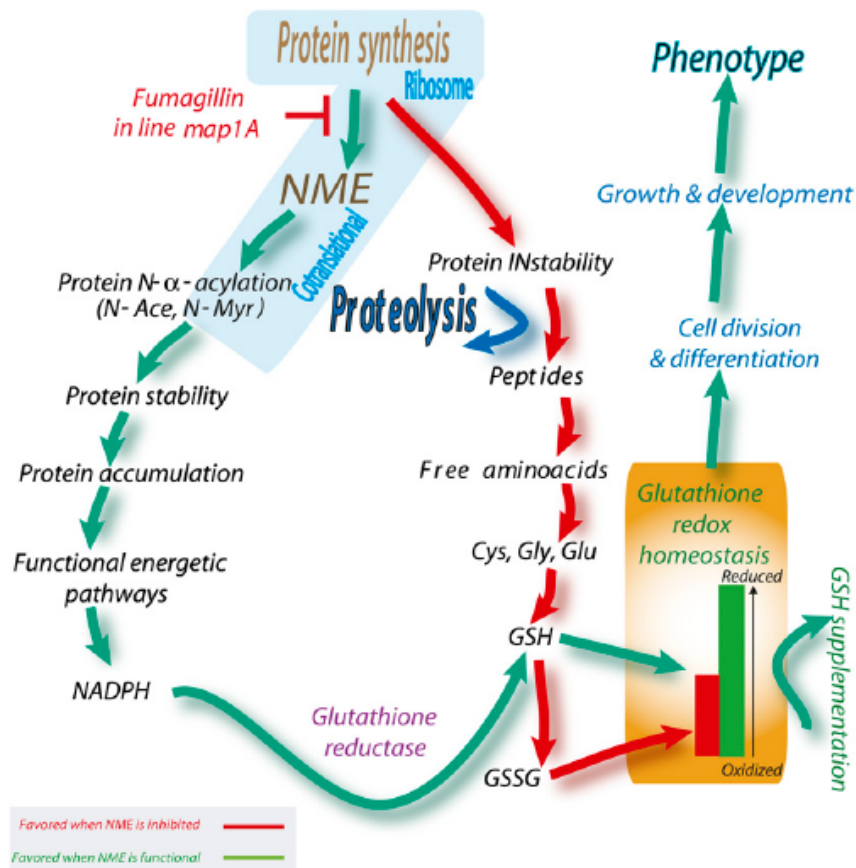


Figure 51 - La NME dans le cytoplasme d'*A. thaliana*

La diminution de la NME cytoplasmique (rouge) provoque une augmentation du nombre de protéines destinées à une dégradation rapide. Cela induit l'accumulation des produits de protéolyse, peptides et acides aminés libres incluant ceux constitutif du glutathion (Cys, Glu et Gly). Cette accumulation conduit vraisemblablement à une stimulation de la voie de biosynthèse du glutathion. Des analyses protéomiques ont montré que la diminution de la NME cytoplasmique provoque une moindre accumulation d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du NADPH, rendant ce dernier limitant pour la régénération du GSSG en GSH. Par conséquent, le rapport GSH/GSSG est plus bas que dans le contrôle. Dans la situation normale (vert), cette perturbation n'a pas lieu car les protéines subissent la NME, et acquièrent leur stabilité naturelle pour exercer leur fonction au sein du métabolisme cellulaire. La restauration d'un rapport GSH/GSSG permet de compléter le phénotype et de « court-circuiter » l'effet de la diminution de la NME cytoplasmique. La figure est extraite de [Erreur ! Source du renvoi introuvable.].

III. Le maintien de la méthionine N-terminale, signal de dégradation

La demi-vie des protéines est une question biologique qui a explosé depuis la découverte que la dégradation des protéines peut être un processus très contrôlé et ne servant pas uniquement à recycler les acides aminés dans la cellule. Cependant, la notion de dégradation régulée des protéines inclut la reconnaissance d'un motif permettant à la machinerie cellulaire de savoir quelles sont les protéines à éliminer. La compréhension et la connaissance de ces motifs et de cette spécificité de dégradation restent encore largement méconnus. Peu de signaux de dégradations ou degrons sont aujourd'hui identifiés. Les premières études associées à la dégradation régulée des protéines se sont majoritairement concentrées sur la découverte et la caractérisation des acteurs de ces voies. Désormais de plus en plus d'études traitent de la régulation de la dégradation ciblée des protéines et constitue un important défi pour les années à venir. Le résidu N-terminal des protéines est le signal de dégradation le mieux décrit. Cette étude s'inscrit dans ce contexte.

1. Le maintien de la méthionine N-terminale des protéines dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs : un rôle déstabilisant

Chez *A. thaliana*, nous avons observé lors de l'inhibition de la NME cytoplasmique une augmentation de la protéolyse notamment par la visualisation de produits de la dégradation de protéines notamment l'accumulation d'acides aminés libres cellulaires et de produits de dégradation partielle comme les peptides. La recherche des activités protéolytiques responsables de cette dégradation protéique accrue n'a pas décelé de changements profonds de l'activité endoprotéasique totale cellulaire. Par conséquent, s'il ne s'agit pas d'une augmentation de la quantité des enzymes impliquées dans la protéolyse alors seule une augmentation du nombre de substrats destinés à être dégradés rapidement peut expliquer l'accumulation de produits de dégradations dans nos échantillons. Les acteurs de la dégradation de ces protéines acquérant une demi-vie courte lors de l'inhibition de la NME cytoplasmique ne sont pas encore identifiés.

Le maintien de la méthionine initiatrice constitue donc également un signal de

déstabilisation des protéines dans le cytoplasme eucaryotique. Par conséquent, ces nouvelles données s'inscrivent directement dans le prolongement de précédentes études appuyant l'hypothèse que la méthionine N-terminale peut être un signal de déstabilisation protéique. Le résidu N-terminal est par ailleurs historiquement le premier dégron (nommé N-degron) découvert et est le motif de dégradation le mieux documenté [235]. Les règles régissant la stabilité des protéines en fonction du résidu N-terminal sont connues sous le nom de règles de l'azote N-terminal (NER) [235]. Chez les eucaryotes, ces règles sont bien conservées [335]. Les résidus déstabilisants sont généralement ceux qui empêchent l'action des METAPs (D, E, R, K, H, L, F, W, Y, I, Q, N et C oxydée) et donc non découverts par l'action des METAPS [335]. Ces résidus sont reconnus par des N-recognines, E3 ubiquitine ligases spécifiques de la voie NER, conduisant ainsi la protéine cible à la dégradation via le protéasome. De manière intéressante, un système analogue est retrouvé chez les eubactéries puisque ClpS joue le rôle d'une N-recognine pour conduire une protéine à la dégradation par le complexe ClpAP [234, 233]. La NME est la principale voie qui influence la diversité de l'acide aminé N-terminal des protéines et induit l'apparition de résidus stabilisants, permettant à la protéine d'échapper à une dégradation rapide par la voie NER. Les résidus déstabilisant de la voie NER sont donc produits par une autre voie que la NME, un autre événement protéolytique. Par ailleurs, peu de substrats naturels du NER ont été identifiés jusqu'à présent.

La voie du NER identifie la méthionine comme étant un résidu stabilisant. Cependant, une variété d'études prouve le contraire. En effet, il a déjà été démontré que la méthionine N-terminale maintenue est un signal de dégradation de sous unités du photosystème II [240]. Cela a également été démontré pour un variant de la glutathion-S-transférase exprimé chez la levure [216] et une β -glucuronidase chez les plantes [239]. En outre, en combinant des analyses protéomiques et bioinformatiques, il a été montré chez les eucaryotes que les protéines ayant une méthionine N-terminale non bloquée ont une demi-vie plus courte que les autres protéines [264]. Dans le cytoplasme d'*A. thaliana*, j'ai pu montrer que l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique induit une augmentation du nombre de protéines ayant une méthionine N-terminale non bloquée. Cette inhibition a pour conséquence une augmentation de la protéolyse cellulaire démontrant ainsi que la méthionine N-terminale constitue également un signal de dégradation dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs [1].

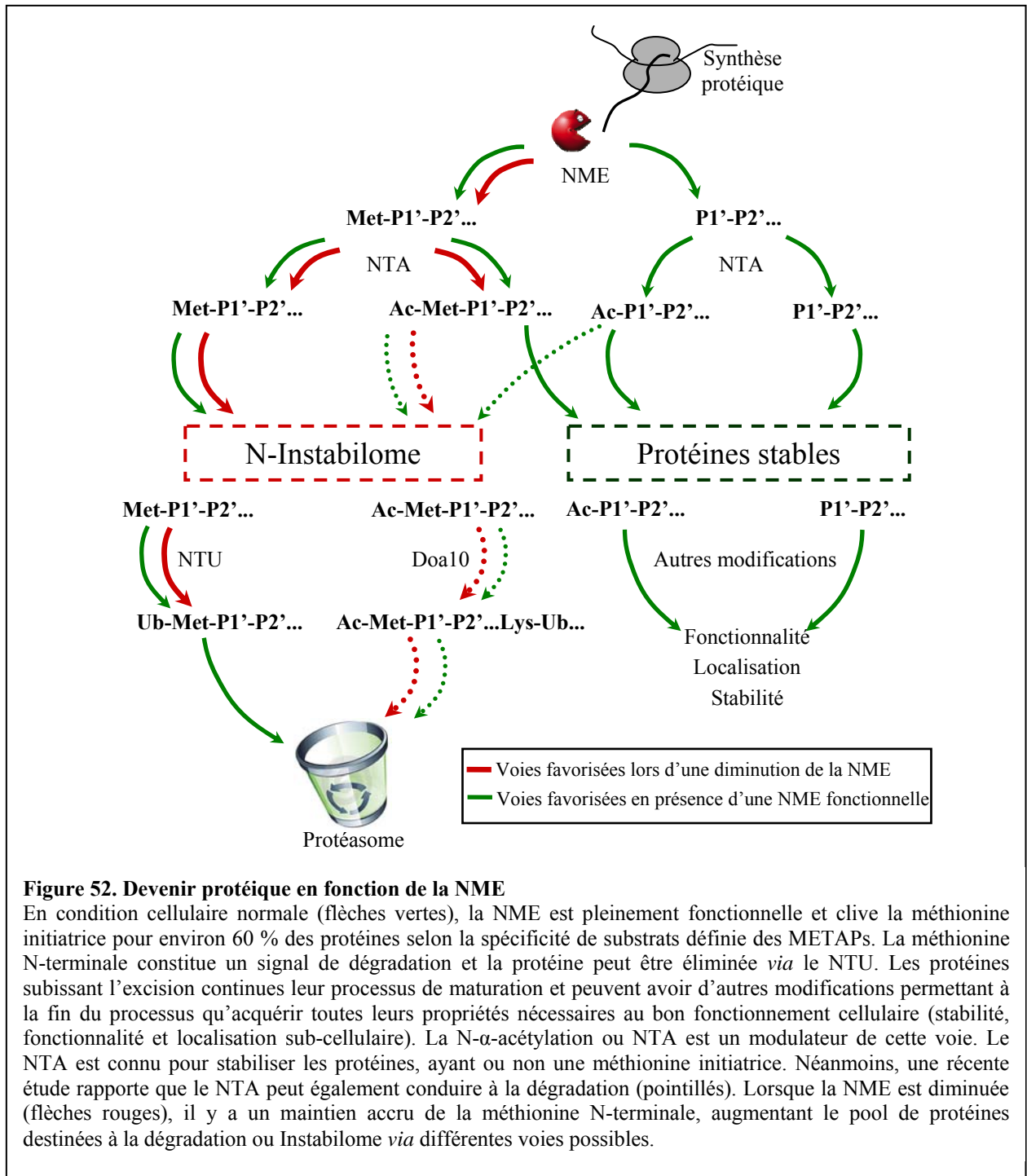
2. L'influence de l'apparition de la méthionine N-terminale sur d'autres voies : ubiquitination N-terminale et N- α -acétylation

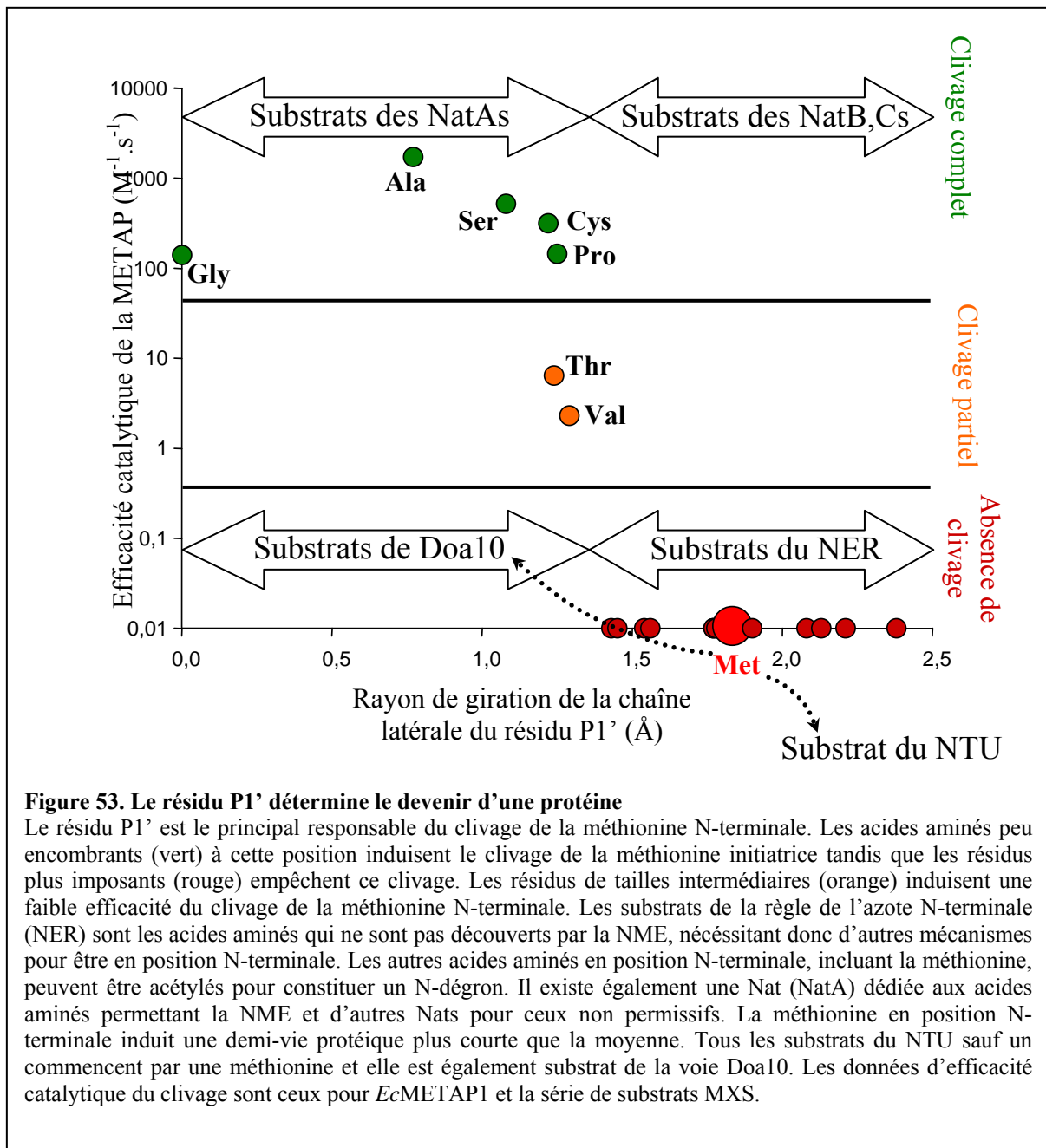
De plus en plus d'études rapportent qu'une nouvelle voie de ciblage des protéines au protéasome par l'ubiquitination ait lieu. Cette voie ne fait pas intervenir l'ubiquitination de lysines internes mais celle du groupement α -aminé du résidu N-terminal. Cette voie est nommée ubiquitination N-terminale (NTU) [336]. Plus de 90 % des substrats formellement identifiés du NTU possèdent une méthionine N-terminale. Enfin, il a récemment été suggéré que les protéines eucaryotiques ayant une méthionine N-terminale non bloquée peuvent être dégradée via le NTU, une estimation de 10% des protéines eucaryotiques à été réalisée [264]. Lors de l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique il y a un maintien préférentiel de la méthionine N-terminale. De plus, une fraction plus importante de protéines ayant une méthionine N-terminale n'est pas acétylée lors de la diminution de la NME cytoplasmique [1] ce qui laisse la possibilité au NTU d'avoir lieu.

La séquence N-terminale peut également être modifiée par différents groupements chimiques. Parmi ces groupements, la N- α -acétylation (NTA) est connue comme stabilisateur des protéines car le NTA est surreprésentée chez les protéines les plus abondantes. La N- α -acétylation affecte une grande partie des protéines chez les eucaryotes (jusqu'à 90% chez l'Homme). Le rôle du NTA est encore peu compris et demande donc à être investigué plus largement ; néanmoins ce rôle est très important puisque les mutants de cette voie présentent un phénotype sévère chez la levure [337] et les plantes [338]. Lors de l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique, une diminution du NTA a été constatée. La NME a donc un effet sur le NTA du fait de son influence sur la nature du résidu N-terminal. Chez les eucaryotes, trois Nats principales catalysent la réaction d'N- α -acétylation. Chacune de ces Nats se singularise par une spécificité de substrats bien définie et différente [265] (Fig. 50). De façon intéressante, une des Nats (NatA) a comme substrats les résidus découverts par l'action des METAPs (Fig. 50). Il existe d'autres Nats (notamment NatB et NatC) agissant sur une fraction de protéines ayant leur méthionine initiatrice. Cette spécificité apparaît conservée chez les eucaryotes. Les archées possèdent uniquement une Nat de type A [271] et hormis quelques cas exceptionnels il n'y a pas d'acétylation chez les eubactéries [269]. La diminution du niveau de NME enrichie le nombre de protéines ayant une méthionine en position N-terminale. Chez *A. thaliana*, la diminution de la NME cytoplasmique altère le pool de

protéines subissant la NTA. En effet, des protéines qui subissent en conditions normales la NME puis la N- α -acétylation par NatA ne seront plus des substrats des NatAs lors du maintien de la méthionine N-terminale. En effet, de telles protéines deviendront probablement substrats d'autres Nats qui face au nombre important de substrats seront saturées. Ainsi, une accumulation de protéines ayant une méthionine N-terminale non bloquée est constatée [1].

En 2010, le groupe d'A. Varshavsky aux USA a découvert qu'un résidu N-terminal acétylé peut constituer un N-détron chez la levure [249] ciblant la protéine au protéasome via une E3 ubiquitine nommée Doa10. Les auteurs font l'hypothèse qu'il s'agit d'un système de contrôle qualité de la biosynthèse des protéines. Une protéine mal repliée ou pas assez rapidement sera reconnue par Doa10 au niveau du groupement N- α -acétyl. En revanche, une protéine repliée correctement aura ce même groupement caché dans la structure et donc inaccessible pour Doa10. Les auteurs ont également proposé que dans les compartiments cellulaires concernés, le groupement formyle puisse aussi être un signal de dégradation. Cependant, les données publiées en 2003 exclues cette hypothèse [240]. Cette unique étude souligne notre manque de compréhension du NTA bien qu'il assure un rôle fondamental dans la cellule avec la NME agissant en amont. Le maintien de la méthionine N-terminale n'affecte probablement pas la structuration tridimensionnelle d'une protéine. Néanmoins, agissant comme un résidu déstabilisant, la méthionine a besoin d'être reconnue pour provoquer la dégradation de la protéine. Or le résidu N-terminal est souvent caché dans la structure définitive de la protéine rendant ce résidu inaccessible pour une telle reconnaissance. Par conséquent, la méthionine N-terminale maintenue est probablement reconnue avant même que la protéine ne soit complètement repliée; de ce fait, la protéine gardant la méthionine initiateur pourrait être substrat de voies différentes telles que celle du contrôle qualité nouvellement décrite et/ou celle du NTU (Fig. 52 et 53).

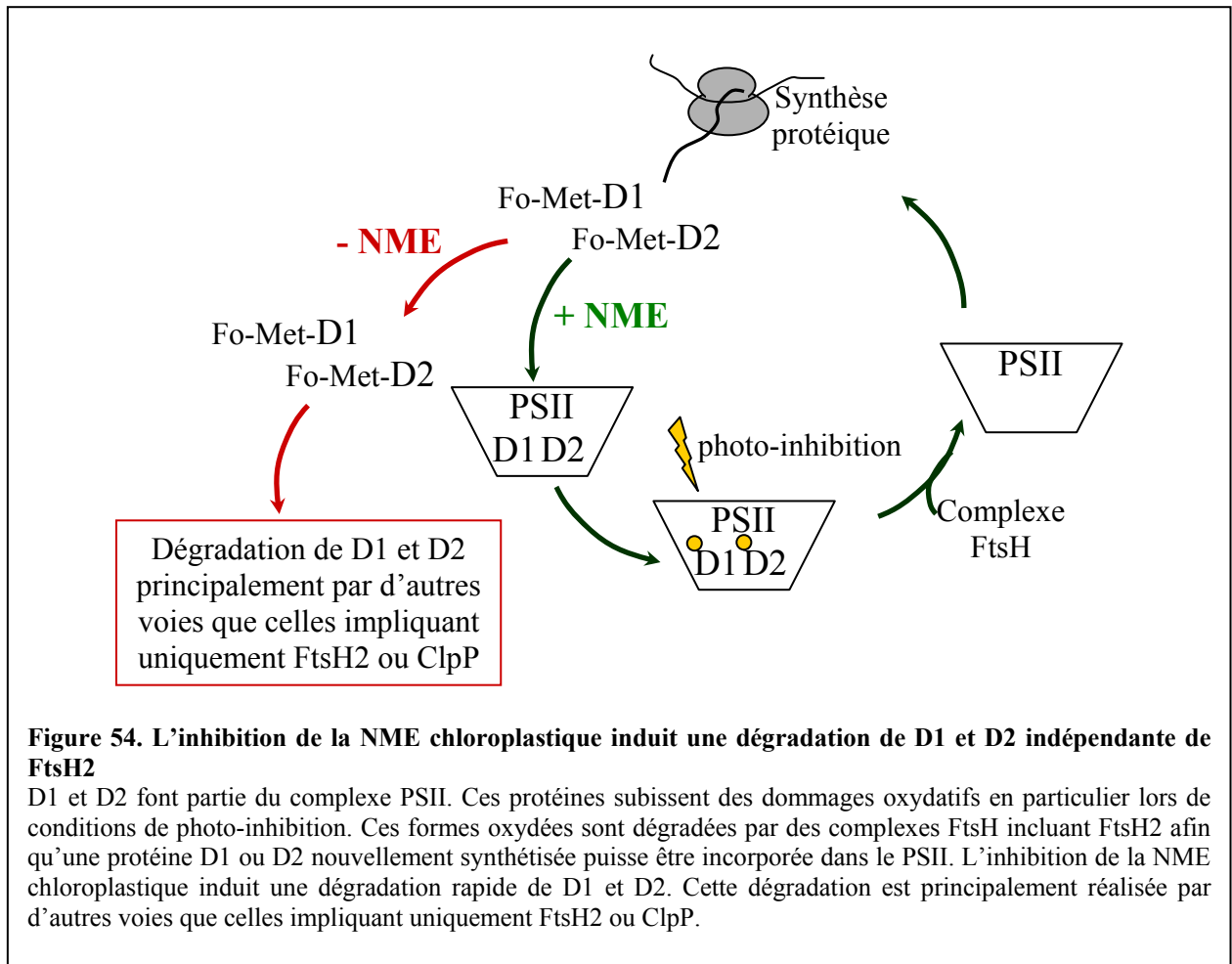




3. La situation dans le chloroplaste, un modèle d'étude de la NME

Dans la quête de l'identification des protéases responsables de la dégradation de protéines qui deviennent instables suite au maintien de leur méthionine initiatrice, nous avons pu montrer dans le chloroplaste que FtsH n'est pas le principal acteur de la dégradation de ces protéines instables bien qu'une certaine redondance partielle puisse avoir lieu notamment pour D2 comme proposé précédemment [260, 339]. Ainsi, quand la NME chloroplastique est

inhibée, D1 et D2 sont principalement reconnues et dégradées par d'autres protéases qu'FtsH2 (cette étude) et ClpP [240]. Il existe d'autres protéases chloroplastiques telles que les protéases Lon et DegP qui sont des protéases d'origine procaryotique [259, 340]. L'étude de ces protéases conjointement à l'inhibition de la NME chloroplastique permettra de savoir si elles sont responsables de la dégradation de ces protéines déstabilisées par le maintien de leur méthionine initiatrice. En outre, la question de la reconnaissance de la séquence N-terminale par FtsH2 reste toujours sans réponse. Pour la première fois, un lien fonctionnel et mécanistique a été démontré entre deux processus majeurs du chloroplaste, la NME et la dégradation des sous unités du PSII par les complexes FtsHs (Fig. 54). La NME étant indispensable pour que FtsH2 puissent assurer son rôle auprès de D1 et D2.



4. *H. volcanii*, un modèle d'étude des voies associées à la NME

La présence d'une unique METAP et de type 2 chez les archées en font naturellement de bons candidats pour des études fonctionnelles car il est aisé d'en moduler la NME à l'aide d'inhibiteurs de METAP2s. En utilisant cette stratégie, j'ai pu montrer que le lien entre NME et métabolisme des thiols semble également conservé chez les archées [1]. Afin de comprendre quels sont les acteurs de la dégradation des protéines déstabilisées par l'inhibition de la NME cytoplasmique j'ai initié une étude à l'aide d'un mutant d'une peptidase agissant en aval du protéasome, la peptidase TET. Les premières expériences réalisées avec le mutant TET indiquent que cette peptidase agit dans la même voie que la METAP2 avec TET en aval de la METAP2 puisque ce mutant présente une résistance à la fumagilline en comparaison à la souche parentale. L'absence de cette aminopeptidase doit probablement ralentir la machinerie cellulaire de protéolyse et ainsi diminuer la dégradation de ces substrats. Clairement, l'utilisation de ce modèle permettra de faire rapidement des avancées sur l'impact de la NME dans un protéome d'autant plus qu'il existe aujourd'hui de nombreux outils génétiques et biochimiques développés chez ce micro-organisme.

IV. L'excision de la méthionine N-terminale chez les mammifères, cycle cellulaire et glutathion

La NME cytoplasmique est une cible thérapeutique reconnue dans la lutte contre le cancer et dans un nombre toujours plus important d'affections. De plus, les cellules de mammifères se comportent différemment des autres cellules eucaryoteiques face à l'inhibition de l'une ou l'autre des METAPs cytoplasmiques. En effet, tandis qu'une redondance fonctionnelle des METAPs cytoplasmiques a été observée chez *A. thaliana* [82] et que la METAP1 chez la levure semble avoir un rôle prépondérant [52], dans les cellules de mammifères, c'est la METAP2 qui apparaît avoir une plus grande importance (revue dans [94] et Introduction). Néanmoins, malgré l'importance thérapeutique de la NME, la fonction de ce processus est encore énigmatique dans ces lignées cellulaires. De même, la contribution des deux types de METAP n'est pas encore complètement élucidée. Enfin, on ignore toujours pourquoi certains types cellulaires comme les lignées endothéliales sont sensibles à l'inhibition de la METAP2 tandis que d'autres lignées ne le sont pas. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer cette spécificité cellulaire telle qu'une perméabilité différentielle aux inhibiteurs selon la lignée, une métabolisation différentielle, une expression différentielle des deux types de METAPs ou encore une différence de spécificité de substrats. En effet, il est concevable de penser que si des protéines sont exprimées uniquement dans certaines conditions ou lignées cellulaires et qu'elles subissent uniquement l'action des METAP2s alors ces protéines auront une méthionine N-terminale maintenue en cas d'inhibition par la METAP2.

Afin de débiter l'étude sur les lignées cellulaires humaines, j'ai mis au point notre système d'étude afin de travailler dans des conditions standardisées. De cette manière j'ai pu observer que dans mes conditions, l'application de fumagilline dans le milieu de culture des HUVECs provoque un blocage du cycle cellulaire lors de la phase G0/G1. Par différentes approches complémentaires, j'ai pu montrer que l'inhibition de l'activité de la METAP2 conduit à une perturbation du statut du glutathion cellulaire. La perturbation constatée est très similaire à celle que j'ai observée chez *A. thaliana*. En effet, dans les deux cas, l'inhibition partielle de la NME cytoplasmique provoque une augmentation de la quantité de glutathion

cellulaire (réduite et oxydé) ainsi qu'un rapport rédox GSH/GSSG qui est plus bas que dans la situation contrôle. De manière intéressante, les lignées cellulaires peu sensibles à l'application de l'inhibiteur des METAP2s semblent être capables de mieux contrôler ou de moins altérer le glutathion cellulaire. Ce résultat fournit une explication à cette différence de sensibilité. De plus, l'application d'un antioxydant précurseur du glutathion dans le milieu de culture des HUVECs dont l'activité METAP2 est inhibée permet d'outrepasser partiellement le blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1. Ce résultat est appuyé par une analyse datant de 2005 montrant que le N-acétylcystéine est capable d'abolir l'effet de fortes concentrations de TNP-470 sur des cellules de la lignée cellulaire de mélanome de souris B16F10.

A ce stade, différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'effet anticellulaire observé lors de l'inhibition de l'activité des METAP2s. En effet, la diminution de l'activité de la NME peut engendrer une perturbation similaire à celle que j'ai décrite chez *A. thaliana*; c'est à dire une altération de l'homéostasie du glutathion qui a pour origine une dégradation plus importante d'un ensemble de protéines. Il se peut également qu'une cible spécifique de la NME engendre un tel phénotype. Ces deux hypothèses non mutuellement exclusives sont développées ci-après.

1. L'homéostasie rédox et le cycle cellulaire

Les données obtenues questionnent directement sur les voies reliant glutathion, cycle cellulaire et NME. La division cellulaire a besoin d'un assemblage de cyclines et de kinases dépendantes de cyclines (CdK) pour permettre au cycle cellulaire de progresser à travers les phases S et M. Parmi les régulateurs du cycle cellulaire, il y a les inhibiteurs des CdKs ou CdKis. La protéine p21 est un CdKi qui est surexprimé lorsque les cellules sont endommagées évitant une prolifération cellulaire anormale [341, 342]. En plus de son rôle de contrôle du cycle cellulaire, p21 participe également à la réparation de l'ADN ainsi que dans les processus apoptotiques [343]. Par conséquent, p21 est un régulateur cellulaire central. Dans la cellule, p21 est contrôlé par p53 qui est un produit de gène suppresseur de tumeurs. Il s'agit donc aussi d'un régulateur important (pour revues voir [164, 344]). Parmi les fonctions de p53, celle d'activateur transcriptionnel de p21 permet à ce dernier de bloquer la prolifération cellulaire. Néanmoins, p21 est capable d'être activé de façon indépendante de p53 [345]. En outre, l'importance du glutathion nucléaire et de son statut oxydoréductif a été démontrée

dans le contrôle de la prolifération cellulaire de lignées de mammifères et qu'un environnement réduit dans le noyau est nécessaire à la progression du cycle cellulaire [346].

Aujourd'hui, de plus en plus d'études rapportent que le cycle cellulaire et l'apoptose dans les cas extrêmes peuvent être régulés par l'état redox cellulaire. En effet, des études ont indiqué que p21 peut jouer un rôle important dans l'arrêt de la croissance des cellules en conditions hyperoxiques ou traitées avec du peroxyde d'hydrogène notamment à travers l'accumulation de p21 [347, 348, 349, 350, 351]. De manière intéressante, il a été précédemment suggéré que le blocage en G0/G1 chez les cellules endothéliales lors de l'inhibition de l'activité METAP2 peut faire intervenir la voie p53-p21. En effet, une accumulation de p21 et dans une moindre mesure de p53 a été constatée [162, 163]. La séquence N-terminale de p21 est prédite (Terminator <http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/index.html>) pour subir la NME ainsi que l'acétylation de la sérine en position P1'. Par conséquent, il s'agit d'un substrat des METAPs. Ainsi, il est possible que si la NME est diminuée, la méthionine ne soit pas excisée. Néanmoins, l'inhibition de la METAP2 ne suffit probablement pas à inhiber le clivage de cette méthionine initiateur puisque la METAP1 est toujours fonctionnelle et une sérine en position P1' permet le clivage par les deux types de METAPs [275, 325]. La protéine p53 possède en position P1' un résidu Glu l'excluant catégoriquement des substrats de la NME. Par conséquent, ces deux protéines ne sont pas directement régulées par l'action de la NME ce qui suggère la présence d'un ou plusieurs effecteurs en amont de ces protéines dans la cascade d'évènements engendrée lors de l'inhibition de la NME cytoplasmique.

L'oxydation de p53 *in vitro* altère sa conformation et inhibe sa liaison à l'ADN [352]. Néanmoins, la forme oxydée de p53 peut être réduite par le facteur redox (Ref-1) qui réduit également les formes oxydées de la protéine activatrice 1 (AP-1) [353]. La surexpression de Ref-1 augmente l'activité de p53 sur le promoteur de p21 tandis que des ARN antisens de Ref-1 inhibent l'activité de p53 [354]. L'activité de Ref-1 sur la voie p53-p21 peut être augmentée par une thiorédoxine, enzyme qui réduit les dithiols pour laquelle l'expression augmente en condition oxydante [355] [356]. Cependant, il existe aussi des voies d'activation de p21 indépendantes de p53 en cas d'oxydation irréversible de cette dernière. Ces voies indépendantes de p53, passent notamment par TGF- β (transforming growth factor β) et qui est lui-même régulé par des oxydants. L'oxydation est un des mécanismes d'activation de TGF- β permettant l'induction de la transcription de p21 [357, 358]. Ainsi, une perturbation de

l'homéostasie redox cellulaire peut induire l'expression de p21 de manière indépendante de p53 à travers TGF- β [347]. L'ensemble de ces données montre que l'homéostasie redox cellulaire contrôle le cycle cellulaire à travers le niveau d'expression de p21 et par différentes voies.

Comme l'hyperoxie, l'eau oxygénée stimule également p21 de manière dépendante ou non de p53. Des cellules déficientes en p53 sont toujours capables de réguler p21 à travers l'homéostasie redox [359]. Les protéines ERKs (kinases impliquées dans les voies de signalisations de la prolifération cellulaire [360]) sont des effecteurs de cette régulation. ERK stimule l'expression de p21 lors d'une altération du statut du glutathion en étant elle-même activée par une phosphorylation [345] [361]. Ainsi, de nombreux signaux de transductions activés par une perturbation de l'homéostasie redox convergent à une augmentation du niveau de p21 et conséquemment au blocage du cycle cellulaire en G0/G1.

Les données obtenues durant ma thèse indiquent que l'ajout de N-acétyl-cystéine sur les HUVECs dont l'activité des METAP2s est abolie permet de diminuer le nombre de cellules bloquées en phase G1/G0. Ce précurseur de la cystéine est converti en glutathion réduit à travers la cystéine et la γ -glutamylcystéine. Il en résulte que le pool de glutathion cellulaire est impliqué dans la cascade mécanistique reliant l'inhibition de l'activité METAP2 au blocage du cycle cellulaire. Compte tenu que p21 et p53 sont impliquées dans cette voie et que de multiples études indiquent que l'accumulation de p21 est fortement dépendante de l'homéostasie redox cellulaire, il est probable que la perturbation de l'homéostasie du glutathion cellulaire agisse directement en amont de p53 et p21. Ainsi, j'ai pu identifier une nouvelle étape dans la cascade d'évènements déclenchée par l'inhibition de la NME cytoplasmique située entre le maintien de la méthionine N-terminale et p21/p53. La voie p21/p53 peut constituer le senseur du statut du glutathion cellulaire et induire la réponse antiproliférative (Fig. 55).

En 2010, il a été montré que l'addition de guanine et de nucléosides contenant une guanine reverse complètement l'effet cytotatique de l'inhibition de la METAP dans deux lignées cellulaires endothéliales. Cette complémentation reverse également l'induction de l'accumulation de p21. Il semble que cette complémentation se réalise à travers la voie de récupération/biosynthèse de nucléotides car son inhibition empêche la complémentation. Néanmoins, les auteurs rapportent que cette complémentation implique l'augmentation de la quantité de guanosine triphosphate cellulaire au dessus de son niveau physiologique plutôt

qu'une restauration de sa quantité sauvage [362]. Cette découverte récente souligne que différents facteurs interviennent au niveau du CdKi p21 puisqu'il s'agit d'un régulateur central cellulaire.

La connexion entre NME, glutathion et cycle cellulaire a donc été réalisée (Fig. 55). La diminution de la NME cytoplasmique à travers l'abolition de l'activité METAP2 induit une perturbation de l'homéostasie redox cellulaire suggérant un effet général de la diminution de la NME plutôt qu'un effet sur une cible spécifique. Néanmoins, à l'heure actuelle je n'ai pas investigué la dégradation des protéines dans ces échantillons, et il m'est donc impossible d'affirmer que l'augmentation et la perturbation du pool de glutathion cellulaire a pour origine une augmentation de la protéolyse cellulaire.

2. D'autres cibles de la NME

Une des étapes manquantes dans la cascade d'évènements aboutissant au blocage du cycle cellulaire est la connaissance des cibles protéiques directes qui retiennent leur méthionine N-terminale lors de l'inhibition de la METAP2 et qui pourrait expliquer le phénotype anticellulaire observé. La spécificité des deux METAPs cytoplasmiques chez l'Homme a été récemment étudiée et il apparaît que la METAP2 clive un ensemble de substrats pour lesquels la METAP1 est très peu efficace. En effet, des analyses réalisées avec les enzymes humaines purifiées ont révélé que les METAP1s sont inefficaces *in vitro* pour cliver les substrats ayant une Val ou une Thr en position P1' [325]. Il en résulte qu'une inhibition de l'activité de la METAP2 doit induire le maintien de la méthionine N-terminale de ces substrats. De manière intéressante, quelques analyses protéomiques ont identifié des protéines conservant leur méthionine N-terminale lors de l'inhibition de l'activité de la METAP2 révélant ainsi *in vivo* des substrats spécifiques des METAP2s chez les mammifères. La cyclophiline A (séquence N-terminale MVNPTV) [363], la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (MVKVGV)[363], une thiorédoxine (MVKQI) [184], une protéine de liaison SH3 riche en acides glutamiques (SH3BGRL) (MVIRV) [184], le facteur d'élongation 2 (MVNFT) [184], TXNL1 (thiorédoxin-like protéine 1) (MVGVKP) [325] et la chaîne α de l'hémoglobine humaine (MVLSPA) [184] conservent leur méthionine N-terminale lors de l'inhibition de l'activité METAP2. De manière intéressantes, ces protéines ont toutes une Val après la méthionine N-terminale ce qui appuie l'étude *in vitro* mentionnée ci-dessus. Des tests

in vitro conduits avec les séquences N-terminales de ces protéines ont montré que l'efficacité catalytique de la réaction est deux ordres de grandeur plus faibles avec la METAP1 qu'avec la METAP2 pour ces substrats. Néanmoins, la méthionine initiatrice de la protéine 14-3-3 γ est incomplètement excisée lors de la diminution de l'activité de l'une ou l'autre METAP bien que le résidu P1' soit une Val; ceci indique qu'il s'agit d'un mauvais substrat des deux METAPs. Ainsi, l'augmentation de la forme protéique retenant la méthionine N-terminale lors de l'inhibition de l'une ou l'autre des METAPs suggère que les deux types de METAPs sont nécessaires pour réaliser complètement le clivage de la méthionine N-terminale de la protéine et que d'autres déterminants entre en jeu comme les résidus plus éloignés dans la séquence [150, 146].

Il a été rapporté que l'inhibition de l'activité de la METAP2 bloque l'entrée en phase S du cycle cellulaire *via* l'activation de la voie p53-p21 [162, 163]. Un des mécanismes possibles pour l'activation de la voie p53 implique l'homéostasie rédox comme nous venons de le voir. De manière intéressante, Trx-1 (thiorédoxine-1), un des substrats spécifiques des METAP2s, a aussi été impliquée dans la régulation de p21 à travers p53. En effet, Trx-1 est induite et est transportées dans le noyau lors d'une perturbation de l'homéostasie redox cellulaire. Dans le noyau Trx-1 augmente la fonctionnalité de p53 directement et à travers Ref-1 [356]. En outre, la structure de la protéine SH3BGRL humaine a été résolue, révélant un repliement de type thiorédoxine. Ceci suggère aussi son implication l'homéostasie redox cellulaire [364]. Bien que se soit uniquement deux cas précis, ces protéines relient directement la NME et l'homéostasie redox cellulaire.

Par conséquent, mes données suggèrent que l'inhibition de l'activité METAP2 des cellules de mammifères produit un effet semblable à ce que j'ai pu montrer chez *A. thaliana* avec la perturbation de l'homéostasie du glutathion cellulaire. Néanmoins, il reste à démontrer l'augmentation de la protéolyse lors de la diminution du niveau de NME dans les cellules de mammifères. Des données provenant de la littérature montrent quelques protéines cibles substrats spécifiques de la METAP2 et nous ne pouvons pas écarter à l'heure actuelle leur éventuelle implication dans l'effet anticellulaire constaté

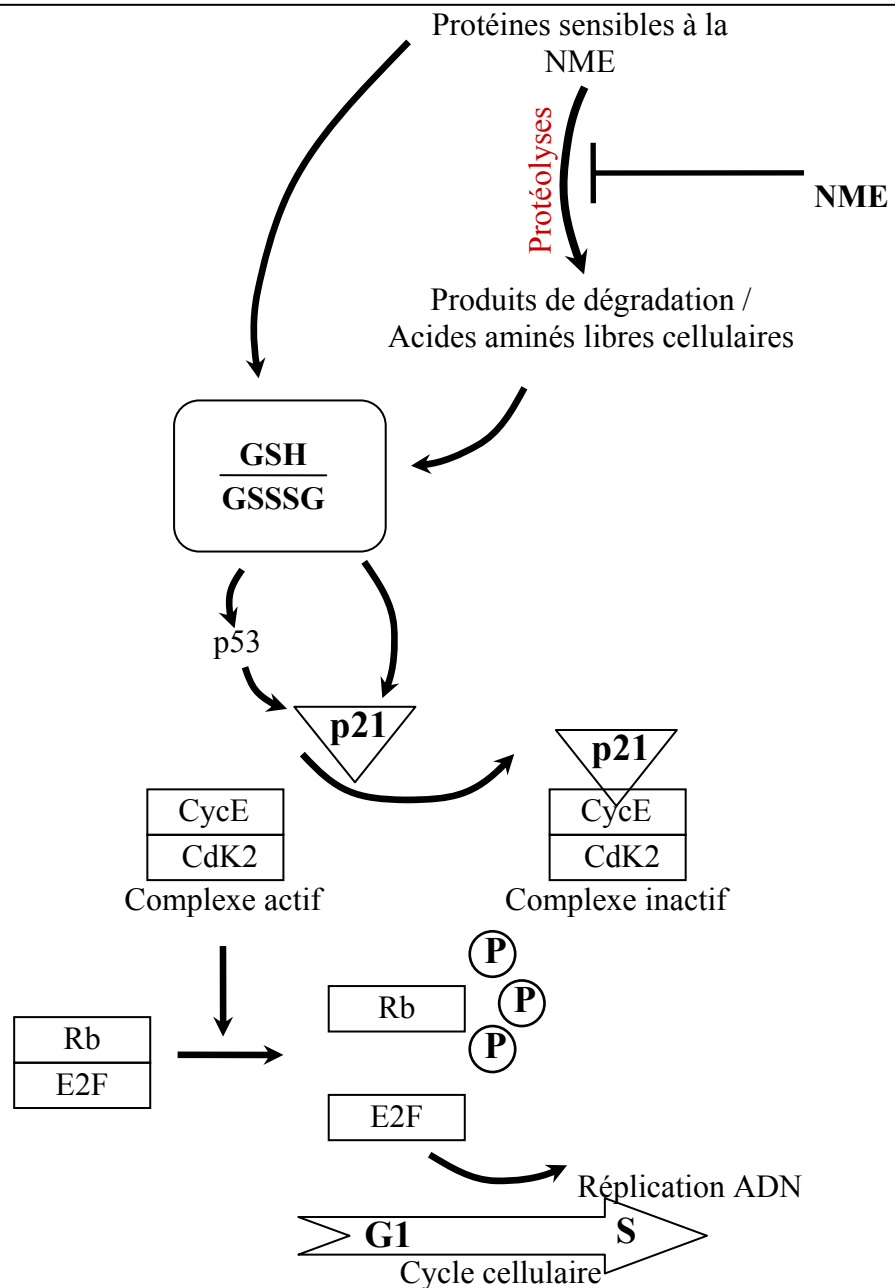


Figure 55. La NME régule le cycle cellulaire à travers le statut du glutathion chez l'Homme

La progression du cycle cellulaire est contrôlée par différents événements de phosphorylation. C'est le cas de la transition G1/S. Afin que la phase de synthèse (S) du cycle cellulaire débute, des complexes Cycline E (cycE) - kinase dépendante de cycline 2 (CdK2) doivent se former afin d'activer la fonction kinase. L'activité kinase va phosphoryler la protéine du rétinoblastome (Rb). Cette phosphorylation permet à Rb de se dissocier du facteur de transcription (E2F). E2F active la transcription de nombreux gènes nécessaires à la poursuite de la phase S du cycle cellulaire incluant les gènes impliqués dans la réplication de l'ADN. Parmi les régulateurs du cycle cellulaire important, il y a p21, un inhibiteur de CdKs. p21 se lie aux complexes cycE - CdK2 et inhibe ainsi son activité conduisant à une hypophosphorylation de Rb et conséquemment au blocage du cycle cellulaire lors de la transition G1/S. Dans la cellule, l'expression de p21 est contrôlée par différents facteurs tels que le statut du glutathion. Une perturbation de l'homéostasie du glutathion cellulaire peut en effet stimuler l'expression de p21 à travers différentes voies, dépendantes ou non de p53. La NME, en contrôlant la demi-vie d'un sous-ensemble de protéines, maintiendrait un statut du glutathion favorable à la poursuite du cycle cellulaire. La diminution de la NME, induirait une augmentation de la protéolyse et en conséquence perturberait l'homéostasie du glutathion à travers l'augmentation de la quantité d'acides aminés libres cellulaires et la déstabilisation de protéines impliquées dans le maintien de cette homéostasie.

V. La NME, processus ubiquitaire et voies associées conservées

1. Le glutathion

L'oxygène présent dans l'atmosphère implique que les cellules subissent des attaques oxydatives. Ainsi, les organismes vivants ont développé des protections contre les dommages oxydatifs souvent irréversibles. Ce système antioxydant comporte différents acteurs, des enzymes et des composées de faibles poids moléculaires. Ces systèmes sont très similaires à travers le vivant notamment le glutathion qui est le thiol non protéique le plus abondant dans la grande majorité des cellules. Dans les rares cas où le glutathion ne l'est pas, il y a un système très analogue impliquant un composé de la voie de biosynthèse du glutathion comme le γ -glutamylcystéine [294]. Aujourd'hui, le glutathion n'est plus uniquement reconnue comme une molécule impliquée dans la lutte contre les dommages oxydatifs mais également dans de nombreux processus cellulaires et voies de signalisations faisant de lui un acteur central dans la cellule. L'étude du rôle de la NME cytoplasmique chez *A. thaliana* a permis de révéler pour la première fois un lien entre ces deux composants cellulaires majeurs. La diminution de la NME cytoplasmique perturbe fortement la quantité et le statut du glutathion dans la cellule. De manière intéressante, j'ai retrouvé ce lien chez la levure et une archée soutenant l'hypothèse d'une conservation de ce lien à travers le vivant. De plus, l'étude de la NME cytoplasmique dans différents types cellulaires chez l'Homme a également montré une perturbation de l'homéostasie du glutathion cellulaire. Par conséquent, dans trois systèmes eucaryotiques différents et chez une archée, la diminution du niveau de NME cytoplasmique perturbe le pool de glutathion cellulaire. L'ensemble de ces données est en faveur de la conservation du lien entre la NME et l'homéostasie du glutathion cellulaire à travers le vivant.

Dans les cellules de mammifères, j'ai pu établir une connexion entre la NME, le glutathion et le cycle cellulaire. En effet, j'ai confirmé que la diminution de la NME cytoplasmique chez les HUVECs conduit à un blocage des cellules en phase G1/G0 et que cela peut être abolie au moins partiellement par l'ajout d'un précurseur du glutathion. Chez *A. thaliana*, la diminution de la NME cytoplasmique conduit à un phénotype très sévère. En comparaison aux animaux, les plantes ont un développement qui est largement post-embryonnaire avec les nouveaux organes qui apparaissent dans le temps notamment grâce à la

division cellulaire au niveau des méristèmes. De façon intéressante, malgré le milliard d'années qui sépare les plantes et les animaux, les composants du cycle cellulaire sont très similaires. En effet, tout comme dans les autres organismes eucaryotiques, les plantes possèdent des CdKs qui gouvernent le cycle cellulaire à travers la phosphorylation de différents substrats à des points clés du cycle cellulaire comme les transitions G1/S et G2/M ce qui permet la réplication de l'ADN et la mitose, respectivement. Il existe également des CdKis chez les plantes et assurent la même fonction d'inhibiteur du cycle cellulaire que chez les animaux [365, 366, 367, 368, 369]. Sur la base de comparaisons de séquences, les CdKis de plantes sont reliés aux CdKis de type p21 des mammifères, la famille Cip/Kip. Les CdKis des plantes sont communément connues sous le nom de Kip-Related Protein ou KRP [365, 366, 368]. Ils interagissent tous avec les cyclines de type D (cycD1, cycD2 et cycD3) [365, 368] [370]. Chez les plantes, les protéines Rbs sont également présentes et interviennent aussi dans le contrôle de la transition G1/S. La protéine Rb interagit avec un complexe contenant le facteur de transcription E2F pour réprimer la transcription des gènes régulés par cette protéine [371, 372, 373]. *A. thaliana* a un seul gène codant une protéine Rb (Rb-related gene ; RbR). Chez les animaux, Rb est phosphorylée par différents complexes CdK/cyc lors de la transition G1 vers S. Les protéines RbRs interagissent avec les cyclines de types D [374, 375, 376, 377]. Les kinases de plantes associées aux RbRs sont la CdKA et une cycline D [376, 378]. Ainsi, la phosphorylation des protéines RbR par les CdKs dépend de la phase du cycle cellulaire. Par conséquent, *A. thaliana* possède une machinerie cellulaire de contrôle du cycle cellulaire très similaire à celle présente chez les mammifères. Ayant révélé une perturbation de l'homéostasie du glutathion lors de la diminution de la NME cytoplasmique à la fois chez *A. thaliana* et chez les HUVECs, il est concevable que chez la plante la perturbation du statut du glutathion cellulaire entraîne également une altération du cycle cellulaire comme montré précédemment avec les HUVECs. En effet, le glutathion cellulaire est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire chez les animaux et les plantes (revue dans [379]). Par exemple, le mutant *rml-1* (mutant de la γ -glutamylcystéine synthétase) chez *A. thaliana* qui possède un pool glutathion cellulaire altéré en comparaison au WT, échoue à développer un méristème apical racinaire normal car les cellules sont bloquées en phase G1 du cycle cellulaire [380]. Vraiment, la perturbation de l'homéostasie du glutathion peut bloquer le cycle cellulaire chez les plantes comme chez les animaux lors de la diminution de la NME cytoplasmique.

2. La protéolyse

La méthionine N-terminale peut constituer un signal de dégradation. Néanmoins, les activités protéolytiques responsables de la dégradation des protéines déstabilisées par le maintien de leur méthionine initiatrice ne sont pas identifiées. En outre, cette protéolyse accrue d'un sous-ensemble de protéines lors de la diminution de la NME cytoplasmique a été montrée dans le chloroplaste [240] ainsi que dans le cytoplasme [1]. Ces deux compartiments comportent leur propre machinerie de dégradation des protéines. Dans le cytoplasme des eucaryotes, les protéines ayant une méthionine N-terminale non bloquée sont vraisemblablement dégradé *via* l'ubiquitination N-terminale et le protéasome. Le protéasome a été identifié dans le cytoplasme de beaucoup d'eucaryotes incluant les plantes, l'Homme et la levure. L'organisation du protéasome apparaît conservé. Le NER, règle de dégradation des protéines en fonction de leur résidu N-terminale est également conservée. Chez les plantes, deux N-recognines ont été identifiées jusqu'à présent, PRT1 et PRT6 [381, 382, 383]. Les résidus déstabilisants sont très similaires à ceux décrits pour la levure et les mammifères. En outre, cette règle est également retrouvée chez les bactéries avec ClpS servant de N-recognine. Les bactéries ne possèdent pas de protéasome mais ont un analogue fonctionnel, le complexe ClpAP. Néanmoins, la voie classique du NER ne semble pas être impliquée dans la dégradation des protéines ayant leur méthionine initiatrice car les résidus définis comme déstabilisant par cette règle ne sont pas ceux qui sont obtenus après action de la NME. Par ailleurs, très peu de substrats naturels de cette règle sont connus. Aujourd'hui, de plus en plus de « règles » supplémentaires à cette voie sont découvertes telles que l'acétylation et l'ubiquitination N-terminale modulant également la demi-vie des protéines. De manière intéressante, il semble aujourd'hui que l'ubiquitination ne soit pas uniquement restreint aux eucaryotes. En effet, la pupylation, une modification de type ubiquitination a été découverte chez l'actinobactérie *M. tuberculosis* agissant de manière similaire au système décrit chez les eucaryotes [384]. De même, la sampylation, une modification de type ubiquitination a été mis à jour chez les archées [385].

VI. Conclusions - perspectives

Le maintien de la méthionine N-terminale est donc un signal de déstabilisation des

protéines qui est nécessaire mais pas suffisant puisqu'un ensemble réduit de protéines y est directement sensible. Pour la première, le rôle de la NME dans le cytoplasme d'un eucaryote supérieur a été établi et contrôle d'importants processus cellulaires ubiquitaires tels que la protéolyse et le statut du glutathion. Ces découvertes ont été réalisées dans différents organismes à travers le vivant appuyant le caractère ubiquitaire des processus contrôlés par la NME.

Clairement, les prochaines études devront se focaliser sur la/les protéase(s) responsable(s) de la dégradation des protéines déstabilisées par une méthionine N-terminale maintenue ainsi que sur les mécanismes de leurs reconnaissances ou non reconnaissance. Dans ce contexte, l'apport de différents modèles tels que le chloroplaste, *H. volcanii* ou encore la levure permettra des avancées rapides afin de vérifier ensuite les résultats obtenus sur des protéomes plus complexes.

Dans la quête d'une connaissance toujours améliorée de la spécificité de substrats des METAPs eucaryotique et de leur contribution respective pour la NME, la purification des METAPs cytoplasmiques d'*A. thaliana* est actuellement poursuivie. La purification des METAP2s d'*A. thaliana* est en cours et permettra de compléter les données de spécificité de substrats déjà obtenues *in vitro* avec la METAP1A. De plus, dans le contexte de la caractérisation *in vivo* des modifications N-terminales incluant l'N- α -acétylation chez *A. thaliana* menée au laboratoire, nous avons obtenus la séquence N-terminale de plus de 800 protéines *in vivo*. Les premiers résultats semblent confirmer la spécificité de substrats des METAPs eucaryotiques obtenue *in vitro* bien que de plus amples analyses sont nécessaires.

L'utilisation des lignées cellulaires humaines est également poursuivie actuellement. En effet, les études d'expressions des METAPs dans différentes lignées cellulaires sont en cours. De même, l'analyse *in vivo* de séquences N-terminales lors de l'inhibition de l'activité METAP2 devrait permettre de connaître l'ensemble des protéines conservant leur méthionine N-terminale dans ces conditions et ainsi définir *in vivo* les cibles spécifiques à la METAP2. De plus, cette analyse sera réalisée avec différents types cellulaires tels que des lignées sensibles et d'autres beaucoup moins sensibles à l'inhibition de la METAP2s afin de comprendre l'origine de cette sensibilité différentielle.

Des résultats préliminaires ont suggéré que les eubactéries ont également ce lien entre la NME et le pool de glutathion cellulaire. De plus amples études sont nécessaires afin de vérifier l'existence d'un tel lien chez ces organismes.

Clairement, la poursuite de l'étude de la NME à différents niveaux d'analyses et impliquant plusieurs organismes modèles permettra de rapidement combler le défaut de compréhension de ce processus essentiel.

Matériels et Méthodes

Table des matières - Matériels et méthodes

<i>Produits chimiques, enzymes et solutions</i>	159
I. Propagation et culture du matériel vivant utilisé	162
1. Arabidopsis thaliana	162
A. Lignées utilisées et croisements	162
B. Conditions de cultures	162
C. Conditions de traitements et complémentation	163
2. Saccharomyces cerevisiae	163
A. Lignées utilisées	163
B. Conditions de cultures et conservation des lignées	164
C. Conditions de traitements et complémentation	164
3. Haloferax volcanii	165
A. Lignées utilisées	165
B. Conditions de cultures	165
C. Conditions de traitements et complémentation	166
4. Lignées de cellules humaines	166
A. Conditions de cultures et propagation	166
B. Repiquage des lignées HCT-116, U-87 et EA.hy926	167
C. Repiquage des HUVECs	167
D. Tests de prolifération en microplaque de 96 puits	168
E. Tests de prolifération en microplaque de 24 puits	168
II. Biologie moléculaire et génétique	169
1. Extraction de l'ADN génomique d'A. thaliana et génotypage	169
A. Extraction de l'ADN génomique d' <i>A. thaliana</i>	169
B. Génotypage de loci d' <i>A. thaliana</i>	169
2. Génotypage de loci de levures	170
3. Sous clonage des METAPs cytoplasmiques d'A. thaliana	170
A. Préparation des inserts	170
B. Préparation du plasmide	172
C. Ligature	173
D. Transformation	173
E. PCR sur colonie	173

<i>4. Electrophorèses d'ADN</i>	174
<i>5. Extraction des transcrits des cellules humaines et PCRs quantitatives</i>	174
<i>6. Analyse du cycle cellulaire chez les cellules humaines</i>	175
III. Biochimie des protéines	176
<i>1. Extraction des protéines d'A. thaliana</i>	176
<i>2. Dosage des protéines</i>	176
<i>3. Electrophorèses des protéines - SDS-PAGE</i>	177
<i>4. Western blot</i>	177
<i>5. Détection des protéines carbonylées</i>	178
<i>6. Séparation et dosage des peptides chez A. thaliana</i>	179
<i>7. Mesure de l'activité d'enzymes antioxydante chez A. thaliana</i>	179
<i>8. Expression et purification d'AtMETAPIA</i>	180
<i>9. Mesure de l'activité méthionine aminopeptidase</i>	181
IV. Dosage de métabolites	184
<i>1. Dosage du glutathion chez Arabidopsis</i>	184
<i>2. Dosage du glutathion chez les cellules humaines</i>	184
<i>3. Dosage du glutathion chez les HUVECs avec le CMFDA</i>	158
<i>4. Dosage des nicotinamides chez A. thaliana</i>	186
<i>5. Analyse des thiols chez A. thaliana</i>	186
<i>6. Quantification des métabolites et acides aminés chez A. thaliana</i>	187

Produits chimiques, enzymes et solutions

Les produits chimiques et enzymes ont été achetés chez Sigma (St.-Quentin Fallavier, France) sauf quelques exceptions pour lesquelles l'origine sera mentionnée. Les tampons utilisés ont été filtrés à l'aide d'un filtre millipore (Molsheim, France) de 0,22 µm.

I. Propagation et culture du matériel vivant utilisé

I. Arabidopsis thaliana

A. Lignées utilisées et croisements

Les lignées mutantes *metap1a* (SALK_021985), *gr1* (SALK_060425) et *ftsh2* (*var2*) d'*A. thaliana* utilisées dérivent de l'écotype Columbia. Les mutants simples *pdf1a*, *pdf1b* dérivent de l'écotype Wassilewskija-2. Les mutants simples *metap1a*, *pdf1a*, *pdf1b* et *ftsh2* ont été précédemment décrits [240, 82, 305] (Tab. 3).

B. Conditions de cultures

Pour conserver les lignées, les plantes sont cultivées en serre et les graines sont récoltées lorsque les siliques sont bien sèches en prenant soins de ne pas mélanger les différentes lignées. Les graines obtenues sont passées sur un tamis permettant d'enlever une majeure partie des débris. Lors de croisements, les siliques issues des fleurs pollinisées manuellement sont identifiées et récoltées séparément en tube de 2 mL. Les graines sont ensuite stockées à 9°C. Avant semis sur boîtes de Petri, les graines sont stérilisées en les incubant successivement dans une solution de SDS (sodium dodécyl sulfate) 0,02 % [p/v] durant 5 min sous agitation, puis 5 min dans de l'éthanol 70 % [v/v] sous agitation et une incubation finale de 12 min dans une solution de barychlore (1 tablette pour 500 mL d'eau). Entre chaque bain, deux rinçages sont effectués avec de l'eau stérile. Enfin, juste avant le semis et sous la hôte à flux laminaire, les graines sont rincées au moins 7 fois avec de l'eau stérile afin d'éliminer toute trace de barychlore.

Les graines sont semées sur un milieu contenant : milieu Murashige et Skoog 2,3 g.L⁻¹, acide 2-morpholino-éthane-sulfonique 0,5 g.L⁻¹, agar 8 g.L⁻¹ (Difco, Detroit, Etats-unis),

saccharose 10 g.L⁻¹, myo-inositol 0,1 mg.mL⁻¹, thiamine 1 mg.L⁻¹, acide nicotinique 0,5 mg.L⁻¹, pyridoxine 0,5 mg.L⁻¹, et ajusté avec du KOH jusqu'à pH 5,7. La germination est synchronisée après 3 jours de stratification des graines à 4°C et à l'obscurité. Puis, les boîtes de Petri sont incubées en chambre de culture à 21°C, 16 h de lumière à 100 µE.M⁻².s⁻¹ durant moins de 6 semaines. La croissance a été réalisée le plus souvent verticalement afin d'obtenir des plantules aisément manipulables. Le temps de croissance est mesuré en DAI (nombre de jours d'incubation en chambre de culture).

C. Conditions de traitements et complémentation

Pour les expériences de complémentations, les graines ou plantules d'*A. thaliana* ont été cultivées en présence de la molécule indiquée dissoute directement dans le milieu ou dans de l'eau. Dans tout les cas, le contrôle est réalisé avec le même volume du solvant utilisé. La fumagilline a été dissoute dans du méthanol.

Nom	Mutation	Ecotype	Origine/description	Locus
<i>metap1a</i>	ADN-T SALK_021985	Columbia	Ross 2005	At2g45240
<i>pdf1a</i>	ADN-T (Madison collection)	Wassilewskija-2	Giglione 2003	At1g15390
<i>pdf1b</i>	ADN-T (Madison collection)	Wassilewskija-2	Giglione 2003	At5g14660
<i>gr1</i>	ADN-T SALK_060425	Columbia	Marty 2009	At3g24170
<i>ftsh2</i>	ADN-T	Columbia	Zaltsman 2005	At2g30950
<i>metap1a ; gr1</i>			Cette étude	
<i>ftsh2 ; pdf1a</i>			Cette étude	
<i>ftsh2 ; pdf1b</i>			Cette étude	

Tableau 3. Lignées d'*A. thaliana* utilisées ou obtenues durant mon doctorat

2. *Saccharomyces cerevisiae*

A. Lignées utilisées

Les lignées utilisées (Tab. 4) dérivent de la lignée BY4741 et nous ont été fournies par M. Tolédano (CEA, Saclay). Elles proviennent de la banque Euroscarf (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>). Les souches sont auxotrophes pour l'histidine, la leucine, la méthionine et l'uracile. Les souches mutantes ont le gène d'intérêt (*metap1* (YLR244c) ou *metap2* (YBL091c)) qui est remplacé par un module KanMX (conférant une

résistance à la généticine) ainsi qu'une étiquette spécifique pour chaque gène fournissant une délétion du gène d'intérêt. Les délétions ont été confirmées par PCR selon la procédure décrite et avec les oligonucléotides (Tab. 5) recommandés sur le site internet du « Saccharomyces Genome Deletion Project website » (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html).

B. Conditions de cultures et conservation des lignées

Les différentes lignées sont cultivées sur milieu riche composé de 2 % [p/v] de peptone (Difco), 1 % [p/v] d'extrait de levure (Difco) et 2 % [p/v] de glucose contenant ou non de l'agar 2,5 % [p/v] (Difco). Les cultures sont réalisées à 30°C. Pour les cultures en suspension, l'aération est maintenue en plaçant les tubes de culture sur une roue à 30°C.

Les lignées sont conservées dans 50 % [v/v] de glycérol (cryo-protectant) à -80°C. Pour cela, une colonie est mise en culture liquide dans 5 mL de milieu pour la nuit. Le lendemain matin, dans un cryo-tube contenant 800 µL de glycérol stérile, autant de la suspension cellulaire est ajoutée. Après avoir correctement agité le cryo-tube, ce dernier est stocké à -80°C. Pour reprendre une lignée à partir de ce stock, il suffit de très rapidement gratter la suspension cellulaire congelée avec un inoculateur puis inoculer un milieu de culture liquide.

C. Conditions de traitements et complémentation

Pour les expériences de complémentation, il faut réaliser une pré-culture avec les différentes souches de levure. Pour cela, une colonie est inoculée dans 5 mL de milieu de culture liquide et incubée la nuit à 30°C sur une roue. Ensuite, une série de dilution par 10 est effectuée avec la suspension cellulaire. Puis, 10 µL de chacune des dilutions est déposé sur le milieu de culture solide supplémenté avec la ou les molécules indiquées. Les différents composés ont été dissous dans l'eau ou directement dans le milieu. La même quantité de solvant est utilisée dans tout les cas pour les contrôles. Les photographies ont été prises à 3 ou 6 jours d'incubation à 30°C

Nom	Génotype
WT	BY4741; MATa, <i>his3D1</i> , <i>leu2D0</i> , <i>met15D0</i> , <i>ura3D0</i>
Δ METAP1	BY4741; MATa, <i>his3D1</i> , <i>leu2D0</i> , <i>met15D0</i> , <i>ura3D0</i> ; YLR244c:: <i>kanMX4</i>
Δ METAP2	BY4741; MATa, <i>his3D1</i> , <i>leu2D0</i> , <i>met15D0</i> , <i>ura3D0</i> ; YBL091c:: <i>kanMX4</i>

Tableau 4. Lignées de *S. cerevisiae* utilisées

Nom	Séquence
ScMAP1_A	5'-CTAAAGTCATGACAATGGGAGAACT-3'
ScMAP1_B	5'-GGTTTAGGAATATCTTCAGGGACAT-3'
ScMAP1_C	5'-AACTTTCCTAAATCGCTTTGTACCT-3'
ScMAP1_D	5'-TATGGTTCAATTTTTACCTTTGGAA-3'
ScMAP2_A	5'-GCATTATCAGTTTTGCTTTTAGAGG-3'
ScMAP2_B	5'-TTTGCAGATTGAAATCTTGATGATA-3'
ScMAP2_C	5'-CGCTACTTACACGGGTATTAAAGAA-3'
ScMAP2_D	5'-ACTAGCAATTCTCGTCAAACATACC-3'
Kan B	5'-CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT-3'
Kan C	5'-TGATTTTGATGACGAGCGTAAT-3'
Kan B1	5'-TGTACGGGCGACAGTCACAT-3'
Kan C1	5'-CCTCGACATCATCTGCCAGAT-3'

Tableau 5 - Liste des oligonucléotides utilisés pour vérifier le génotype des souches de levures aux loci YLR244c et YBL091c.

3. *Haloferax volcanii*

A. Lignées utilisées

Les souches sauvages d'*Haloferax volcanii* (DS2) et Δ tet nous ont été fournies par B. Franzetti. La délétion du gène tet est décrite dans le manuscrit de thèse de C. Norais. La technique pop-in/pop-out a été utilisée pour obtenir ce mutant. Brièvement, un plasmide non répliquatif est intégré au niveau du locus par recombinaison (*pop-in*) puis après un nouvel événement de recombinaison homologue au niveau de l'intégration du plasmide permet de supprimer le gène d'intérêt (*pop-out*).

B. Conditions de cultures

Les souches d'*Haloferax volcanii* ont été cultivées à 45°C sur un milieu riche contenant : extrait de levure 5,2 g/L, peptone 1 g/L (Oxoid, Dardilly, France), hydrolysate de

caséine 1 g/L (Oxoid), NaCl 2,46 M, MgCl₂ 88 mM, MgSO₄ 89 mM, KCl 54 mM, CaCl₂ 3 mM, Tris-HCl pH 7,5 12 mM et KOH 2 mM. Pour les cultures sur boîtes de Petri, 15 g/L de bacto agar (Difco) est ajouté à la solution. Le CaCl₂ est ajouté juste avant de réaliser les boîtes de Petri.

C. Conditions de traitements et complémentation

Pour les expériences de complémentation, une pré-culture est réalisée. Cette dernière est ensuite diluée jusqu'à obtenir une DO_{650 nm} comprise entre 0,5 et 0,8. Ensuite, une série de dilution par 10 est effectuée avec cette suspension cellulaire. Puis, 10 µL de chacune de ces dilutions est déposée sur une boîte de Petri contenant le milieu de culture supplémenté avec la ou les molécules indiquées. Les composés ont été dissous dans l'eau ou directement dans le milieu de culture. La fumagilline est dissoute dans du méthanol. La même quantité de solvant est utilisée pour les contrôles. Les photographies ont été prises après 3 et 7 jours d'incubation à 45°C.

Pour les expériences de croissance en milieu liquide, une pré-culture a servi à inoculer 20 mL de milieu liquide avec une DO_{650 nm} finale de 0,005. La croissance à 45°C a été suivie à DO_{650 nm} et DO_{600 nm} sans constater de différences.

4. Lignées de cellules humaines

Les milieux de culture, les solutions et les lignées cellulaires ont été achetés chez Lonza (Levallois-Perret, France), les références sont indiquées. La fumagilline est dissoute dans le DMSO. La culture des lignées cellulaires humaines a été réalisée au sein de l'équipe de Johanna Bakala à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles en collaboration avec Jérôme Bignon (CNRS, Gif-sur-Yvette, France).

A. Conditions de cultures et propagation

Les lignées HUVEC (numéro ATCC : PCS-100-010), HCT-116 (numéro ATCC : CCL-247), EA.Hy926 (numéro ATCC : CRL-2922) et U-87 (numéro ATCC : HTB-14) ont été utilisées. Ce sont toutes des lignées de cellules adhérentes. Les HUVEC ont été cultivées

dans le milieu EBM2 (CC-3156) dans lequel on y ajoute 10 % [v/v] de sérum de veau fœtal. La lignée HCT-116 est propagée dans le milieu Mc Coy's (BE12-688F) également supplémenté avec 10 % [v/v] de sérum de veau fœtal. Les lignées EA.Hy926 et U-87 sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, BE12-614F) supplémenté avec 10 % [v/v] de sérum de veau fœtal. Les cellules sont cultivées à 37°C et avec 5 % de CO₂. Les cultures cellulaires sont repiquées lorsqu'elles sont presque à confluence ce qui correspond à deux repiquages par semaine pour maintenir une lignée en culture. Les lignées HCT-116, U-87 et EA.hy926 sont maintenues en culture durant ~45 jours après le premier inoculum. Les HUVECs étant des cellules primaires sont utilisées entre les passages 2 et 5 inclus, après elles dégènèrent et ne sont donc pas conservées. Les différentes lignées cellulaires sont conservées sous forme d'ampoules dans l'azote liquide.

B. Repiquage des lignées HCT-116, U-87 et EA.hy926

Le repiquage des cellules dans un milieu frais est nécessaire lorsque la culture arrive à confluence. Pour cela, il faut récupérer les cellules à l'aide d'un protocole particulier car elles sont adhérentes. Le milieu usagé est retiré et un rinçage rapide est effectué avec de la solution de trypsine-EDTA (17-161). Puis, les cellules sont incubées environ 4 min avec cette même solution. Afin d'accélérer la séparation des cellules et leur décrochage, les boîtes sont agitées manuellement et la trypsine est rapidement inactivées en ajoutant autant de milieu. Une fraction de la suspension cellulaire est utilisée pour le comptage afin de connaître la quantité de cellules récupérées. Le reste de la suspension cellulaire est centrifugé à 20°C durant 5 min à 2500 g ce qui permet d'obtenir un culot de cellules et de se débarrasser de la trypsine. Enfin, une fraction des cellules resuspendues est utilisée pour inoculer du milieu frais en prenant soin de ne pas trop diluer les cellules. Pour ces cellules, une dilution par 10 ou 20 est généralement utilisée. Les cultures sont ensuite remises à 37°C et 5 % de CO₂.

C. Repiquage des HUVECs

Le repiquage de ces cellules suit le même protocole que celui décrit précédemment. Cependant, pour rincer les cellules nous utilisons du DPBS (tampon phosphate Dulbecco ; BE17-512F) et une solution de trypsine différente (CC-5012). L'incubation des cellules en

présence de la trypsine est réalisée à 37°C ce qui permet de réduire le temps d'incubation car les HUVECs sont plus fragiles. L'inhibition de la trypsine est réalisée avec une solution dédiée, le TNS (Trypsin Neutralising Solution, CC-5002).

D. Tests de prolifération en microplaque de 96 puits

Après avoir récolté les cellules et les avoir resuspendu, 50 µL de suspension cellulaire sont ajoutés dans chaque puit. Entre 2000 et 5000 cellules par puits sont nécessaires. Les cellules sont ensuite remises dans l'incubateur pour 24h afin qu'elles ré-adhèrent et retrouvent des conditions de croissance favorables. Les cellules sont ensuite mises en présence d'une gamme de concentration en fumagilline par l'ajout de 50 µL de milieu de culture contenant la fumagilline dans chaque puit. La culture est ensuite poursuivie durant 72 h. Puis, la prolifération cellulaire est observée à l'aide du bleu de titration cellulaire (Celltiter blue assay; Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Pour cela, 20 µL du réactif est ajouté dans chaque puit ainsi que dans 3 puits contenant uniquement le milieu de culture comme blanc. La microplaque est ensuite incubée entre 1 h et 4 h pour le développement de la coloration. Le résultat est obtenu à l'aide d'un lecteur de fluorescence en microplaque disposant d'une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et un filtre pour la lecture à 590 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Chaque condition est réalisée en triplicat et la valeur correspondante au bruit de fond est déduite des résultats.

E. Tests de prolifération en microplaque de 24 puits

Les HUVECs sont inoculées dans une microplaque de 24 puits à raison de 20 000 cellules par puit dans 1 mL de milieu de culture. Le traitement avec les molécules est réalisé 24 h après afin que les cellules adhèrent et retrouvent des conditions normales de croissance. La culture est ensuite poursuivie, durant 72 h au maximum. Lorsque l'incubation est terminée, les cellules sont récoltées à l'aide d'un traitement à la trypsine et les cellules vivantes sont dénombrées à l'aide du bleu trypan et de l'hématocytomètre. Concrètement, les cellules sont rincées avec 500 µL de DPBS. Une fois le DPBS enlevé, 300 µL de trypsine est ajoutée suivie de 5 min d'incubation à 37°C. Les cellules sont récupérées lors de l'ajout de 500 µL de TNS. L'ensemble est alors transféré en fiole pour le comptage cellulaire.

II. Biologie moléculaire et génétique

Les oligonucléotides ont été commandés et synthétisés chez Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Ils sont stockés à la concentration de 100 μM dans de l'eau stérile à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et dilués dix fois avant d'être utilisés. Le protocole et le matériel utilisé pour la quantification des transcript de glutathion réductases sont détaillés dans [1].

1. Extraction de l'ADN génomique d'*A. thaliana* et génotypage

A. Extraction de l'ADN génomique d'*A. thaliana*

L'ADN génomique de plantes a été purifié à l'aide d'un tampon d'extraction composé de Tris-HCl pH 7,5 0,2 M, NaCl 0,25 M, EDTA 25 mM, SDS 0,5 % [p/v]. L'extraction est réalisée à partir d'un fragment de tissu végétal, généralement une fraction foliaire qui a été précédemment récoltée, congelée en azote liquide et conservée à -80°C en microtube de 2 mL. Les échantillons congelés sont broyés mécaniquement à l'aide d'une bille de 3 mm déposée dans chaque microtube. Après 2 cycles de 30 s à la fréquence de 30 battements/s, 200 μL du tampon d'extraction est ajouté. Les échantillons sont homogénéisés rapidement et mis sur la glace. La bille est ensuite enlevée et le broyat est incubé 15 min à 4°C puis centrifugé 30 min à 20000 g à 4°C . Puis, 180 μL du surnageant est mis en présence d'autant d'isopropanol. Après avoir mélangé par inversion, une incubation de 5 min à température ambiante est réalisée puis le mélange est centrifugé dans les mêmes conditions. Le surnageant est éliminé, le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol 70 % [v/v] et centrifugé 5 min à 4°C à 20000 g. Le surnageant résultant est complètement retiré puis les culots sont séchés à 37°C durant 5 min maximum avant d'être resuspendus dans 80 μL d'eau stérile. Les extraits d'ADN génomique sont conservés à -20°C en microtubes ou en microplaques de 96 puits.

B. Génotypage de *loci* d'*A. thaliana*

Le génotypage des différents *loci* est réalisé en utilisant des extraits d'ADN génomique préparés selon le protocole décrit ci-dessus. Le mélange réactionnel de PCR est composé du tampon de la taq-polymérase, 1,5 mM de MgCl_2 , 125 μM de dNTP, 500 nM de

chaque oligonucléotides et 0,0125 U/ μ L de taq-polymérase (Eurobio, Courtaboeuf, France). Le volume de la réaction est ajusté à 15 μ L avec de l'eau stérile et 5 μ L d'ADN génomique est ajouté. Ces mélanges sont réalisés sur la glace. Lorsque plusieurs PCR sont réalisées simultanément avec un mélange réactionnel identique, un seul pré-mélange est réalisé et ensuite 15 μ L de ce mélange sont dispensés dans les microtubes après avoir déposé les 5 μ L d'ADN génomique dans ces microtubes. Avant de les mettre dans le thermocycler, ils sont rapidement centrifugés. Le programme PCR appliqué est composé d'une dénaturation initiale de 2 min à 94°C suivie de 10 cycles en mode « touch-down » avec 15 s à 94°C, 30 s à 65°C (-1°C à chaque cycle) et 2 min d'élongation à 72°C. Puis, 35 cycles sont réalisés comme suit : 15 s à 94°C, 55°C durant 15 s et 1 min à 72°C. La PCR se termine par une élongation finale à 72°C durant 2 min. Les produits PCR sont conservés à 4°C jusqu'au moment de leur analyse.

2. Génotypage de loci de levures

Le mélange réactionnel de PCR est réalisé avec le tampon de la taq-polymérase, 2,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTP, 1 μ M de chaque oligonucléotide et 0,05 U/ μ L de taq-polymérase (Eurobio). Le volume de réaction est ajusté à 20 μ L. Un fragment de colonie de levure est prélevé et déposé dans ce mélange sur la glace. Après une rapide centrifugation, le programme PCR est lancé et est composé d'une étape à 94°C de 4 min permettant de lyser les cellules et de faire la dénaturation initiale de l'ADN. Ensuite, 35 cycles sont réalisés comme suit : 15 s à 94°C, 15 s à 57°C et 1 min à 72°C. Une élongation finale de 3 min à 72°C. Les produits PCR sont conservés à 4°C jusqu'au moment de leur analyse.

3. Sous clonage des METAPs cytoplasmique d'*A. thaliana*

A. Préparation des inserts

Obtention des clones contenant les ADNcs

Les plasmides contenant les ADNcs des METAPs cytoplasmiques d'*A. thaliana* ont été retrouvés sur le site TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) et obtenus auprès de l'ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, <http://abrc.osu.edu/>). Les ADNc de ces clones ont été préparés à partir d'une plante sauvage de l'écotype Columbia. Le plasmide est

de type pYL436 portant une résistance à la spectinomycine dans son hôte, la souche DH10B d'*E. coli*.

Extraction de l'ADN plasmidique

Afin d'amplifier les différents plasmides, une colonies de chaque clone est inoculée dans 7 mL de milieu LB (10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levures, 10 g/L de NaCl) liquide et incubé sous agitation à 37°C la nuit. Ensuite, les suspensions cellulaires sont récupérées et sont utilisées pour extraire l'ADN plasmidique en utilisant le kit de purification de l'ADN plasmidique de Macherey-Nagel (Hoerd, France) et en suivant le protocole recommandé pour les plasmides à faible nombre de copies.

Quantification de l'ADN

La quantification de l'ADN est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre paramétré à 260 nM (NanoDrop, Thermo scientific, Wilmington, Etats-Unis) et permettant l'utilisation de volumes de l'ordre du microlitre.

Séquençage

Les séquences des ADNcs contenues dans les plasmides ont été vérifiées par séquençage. Ce dernier a été réalisé par la société GATC Biotech (Mulhouse, France).

Amplification de l'insert

Puis, l'amplification de la séquence à insérer est réalisée. Pour cela, les oligonucléotides utilisés comportent le site de restriction adéquate afin de pouvoir cloner la séquence dans le plasmide après la digestion. Afin de diminuer la probabilité de générer une mutation ponctuelle dans l'insert, une taq-polymérase haute fidélité est utilisée (*Pfu* polymérase, Fermentas, Saint-Rémy-lès-Chevreuse, France). Le mélange réactionnel est composé de tampon de la polymérase incluant le $MgSO_4^{2-}$, 200 μM de dNTP, 0,5 μM de chaque oligonucléotide, 0,05 U/ μL de *Pfu* polymérase et 1 pg/ μL d'ADN plasmidique. Le programme PCR début avec 2 min à 95°C de dénaturation initiale suivi de 35 cycles composés de 30 s à 95°C, 30 s d'hybridation à 57°C et 5 min d'élongation à 72°C. Enfin, une étape d'élongation finale à 72 °C durant 15 min est réalisée. Les produits PCR sont conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation. La température d'hybridation et le temps d'élongation varient selon les oligonucléotides utilisés et la taille du fragment à amplifier, respectivement.

Purification de l'insert

Le produit de PCR est ensuite purifié sur une colonne Quiagen (Courtaboeuf, France) en suivant les recommandations du kit MinElute (Quiagen). La concentration de l'insert

obtenue est mesurée (voir ci-dessus).

Digestion de l'insert

La séquence codant la METAP1A et celle pour la METAP2B ont été sous clonée entre les sites de restriction BamH1 et Not1. La séquence codant la METAP2A a été sous clonée entre les sites de restriction BamH1 et Hind3. Les enzymes de restrictions (Fast digest, Fermentas) ont été utilisées selon les recommandations du fournisseur (Fermentas) puis inactivées. Un gel d'électrophorèse est ensuite réalisé afin de contrôler que la taille du produit PCR digéré est conforme à ce que l'on attendait.

B. Préparation du plasmide

Plasmide utilisé

Les trois METAPs ont été sous clonées dans le plasmide pET-51b(+) (Novagen-Merck, Darmstadt, Allemagne). Ce plasmide a un promoteur et terminateur de type T7 et un gène conférant une résistance à l'ampicilline. De plus, il possède une séquence codant un Strep-tag II ainsi qu'une séquence codant pour un His-tag. Le Strep-tag II est positionné en N-terminale des METAPs car le domaine catalytique est en partie C-terminale. Le His-tag n'est pas utilisé, pour cela le codon stop est mis juste en amont de la séquence codant cette étiquette.

Extraction de l'ADN plasmidique

Le plasmide a été amplifié et extrait selon le même protocole que celui décrit précédemment. La quantité de plasmide obtenue est quantifiée à l'aide du Nanodrop (voir ci-dessus).

Digestion du plasmide

Pour insérer la séquence codant la METAP1A et celle codant la METAP2B, les enzymes de restriction BamH1 et Not1 ont été utilisées. Le plasmide accueillant la séquence codant la METAP2A a été digéré avec les enzymes BamH1 et Hind3. Dans le mélange réactionnel, de la phosphatase alcaline (Fermentas) est ajoutée. Les enzymes de restrictions (Fast digest, Fermentas) et la phosphatase alcaline ont été utilisées selon les recommandations du fournisseur, puis inactivées avant la ligation. Les produits issus de la digestion sont purifiés comme décrit précédemment. Un gel d'électrophorèse est ensuite réalisé afin de contrôler que la taille du plasmide digéré est conforme à ce que l'on attendait.

C. Ligature

Une fois que l'insert et le plasmide ont été préparés comme décrit précédemment, la ligature peut être effectuée. La T4 DNA ligase a été utilisée selon le protocole recommandé par le fournisseur (Fermentas). La ligature a été réalisée pour différents rapports plasmide/insert digéré de 1/3 à 1/20. La ligature est réalisée durant 2h à 22°C.

D. Transformation

Ensuite, 2,5 µL du mélange de ligature est utilisé pour transformer 25 µL d'*E. coli* DH5α thermo-compétente (Invitrogen). Le choc thermique est réalisé durant 2 min à 42°C. Après 45 min d'incubation à 37°C dans 1 mL de milieu LB (Lysogeny broth) liquide, la suspension cellulaire est étalée sur boîtes de Petri LB-agar contenant 50 µg/mL d'ampicilline. Les étalements sont incubés la nuit à 37°C.

E. PCR sur colonie

Afin de contrôler que les transformants ont un plasmide contenant l'insert, une PCR est réalisée. Le mélange réactionnel de PCR contient le tampon de la taq-polymérase (Eurobio), 1,5 mM de MgCl₂, 125 µM de dNTP, 500 nM de chaque oligonucléotides et 0,0125 U/µl de taq-polymérase (Eurobio, Courtaboeuf, France). Le volume de la réaction est ajusté à 20 µL avec de l'eau stérile. Un fragment de colonie est déposé dans chaque puit. Le programme PCR débute par 3 min à 94°C permettant de lyser les cellules et de dénaturer l'ADN. Puis, 30 cycles composés de 30 s à 94°C, 30 s à 52°C et 2 min à 72°C sont réalisés. Une incubation finale à 72°C est réalisée durant 10 min. Les produits PCR sont ensuite analysés sur gel d'agarose. Les transformants positifs sont conservés. Après amplification et extraction des plasmides ayant intégré la séquence d'intérêt (voir ci-dessus), quelques plasmides sont séquencés afin de contrôler que l'insertion correspond bien à l'insert et qu'il n'y a pas de mutation à l'intérieur de la séquence.

4. Electrophorèses d'ADN

Les produits PCR sont analysés sur gel d'agarose réalisé dans un tampon TBE (Tris-Base 45 mM ; acide borique 45 mM et EDTA pH8 25 mM). Les produits PCR sont mis en présence d'un sixième de tampon de charge (Tris-HCl pH 7,6 10 mM, bleu de bromophénol 0,03% [p/v], xylène cyanol FF 0,03% [p/v], EDTA 60 mM et 60 % [v/v] de glycérol). De l'agarose est dissous dans le tampon TBE. La concentration en agarose du gel à utiliser est fonction de la taille des molécules d'ADN que l'on souhaite analyser. Pour des produits PCR d'environ 1 kb, 1 % [p/v] d'agarose est nécessaire. Après dissolution de l'agarose, il faut laisser refroidir légèrement la solution avant de mettre le produit marquant l'ADN et permettant sa visualisation. Le bromure d'éthidium est ensuite ajouté afin d'avoir dans le gel une concentration de 0,2 mg/L. Le gel est coulé dans les portoirs avec les peignes adéquats. Une fois que la solution d'agarose a gélifié, le gel est complètement immergé dans la cuve d'électrophorèse contenant du tampon TBE. Une fraction des produits PCR est déposée dans les puits et la migration à 100 V est réalisée. Le résultat est visualisé à l'aide d'une lampe UV. Un marqueur de poids moléculaire est ajouté à chaque migration afin d'estimer la taille des produits PCR.

5. Extraction des transcripts des cellules humaines et PCRs quantitatives

Les cellules ont été récupérées sous forme d'un culot cellulaire à l'aide d'un traitement à la trypsine comme décrit précédemment. Un lavage avec du DPBS est effectué avant de conserver le culot de cellules à -80°C. Les ARNs ont ensuite été extraits en utilisant le kit NucleoSpin (Macherey-Nagel). Les PCRs quantitatives ont été réalisées en collaboration avec Eric Jacquet (Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS). La quantification des ARNs a été réalisée à l'aide du NanoDrop et leur qualité a été vérifiée sur puce Agilent (Massy, France). Un microgramme d'ARNs a été reverse-transcrit dans 20 µL de volume final réaction (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) en suivant le protocole du fournisseur. La PCR quantitative a été réalisée avec les oligonucleotides et sondes de technologie Taqman (Applied Biosystems) pour *HsMETAP1* et *HsMETAP2*. La normalisation des résultats a été faite initialement avec 10 gènes de références, les 4 plus stables ont été ensuite sélectionnés par le programme GeneX (GeneX Gene Expression

Database) et conservés pour la normalisation. La PCR quantitative en temps réelle a été réalisée avec 4 µL d'ADNc à 2,5 ng/µL, 0,5 µL d'oligo-nucléotides, 5 µL de mélange TaqMan fast et 0,5 µL d'eau. L'amplification est réalisée avec 1 cycle de 20 s à 95°C puis 40 cycles de 95°C durant 1 s et 60°C durant 26 s. Toutes les PCRs quantitatives en temps réel ont été réalisées en duplicat technique et en microplaques de 384 puits. La détermination des valeurs de Ct est ensuite utilisée pour les analyses ultérieures avec la moyenne géométrique des quatre gènes de références sélectionnés.

Nom du gène et symbole	Assay ID (TaqMan)
Méthionine aminopeptidase 1 (METAP1)	Hs00299385_m1
Méthionine aminopeptidase 2 (METAP2)	Hs00199152_m1
Eukaryotic 18S rRNA (18S)	Hs99999901_s1
Peptidylprolyl isomerase A (PPIA)	Hs99999904_m1
Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)	Hs99999906_m1
Hydroxymethylbilane synthase (HMBS)	Hs00609297_m1

Tableau 6 - Oligonucléotides et sondes Taqman utilisées

Les réactifs utilisés et noms des gènes y compris les gènes de références sont indiqués. Les noms et informations proviennent du site internet d'Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home.html>).

6. Analyse du cycle cellulaire chez les cellules humaines

Les HUVECs sont récoltées à l'aide de la trypsine selon la procédure décrite précédemment. Le milieu de culture et les cellules récupérés sont mis dans un tube à hémolyse et une centrifugation à 4°C, 5 min à 2500 g permet d'obtenir un culot cellulaire. Le culot est ensuite rincé avec 500 µL de DPBS puis recentrifugé dans les mêmes conditions. Le culot est resuspendu dans 1 mL de DPBS puis 2 mL d'éthanol absolu froid est ajouté goutte-à-goutte afin de fixer les cellules qui sont ensuite conservées à -20°C jusqu'à l'analyse. La quantité d'ADN est mesurée à l'aide de l'iodure de propidium qui est un intercalant des acides nucléiques. Il se lie aux bases de l'ADN avec une stœchiométrie d'une molécule pour 5 paires de bases. Lors de l'analyse, les cellules sont incubées à 37°C durant 30 min avec de la RNase à 1 mg/mL puis marquées avec de l'iodure de propidium à 50 mg/mL pour au moins 15 min à température ambiante. Les profils du cycle cellulaire ont été déterminés par cytométrie en flux à l'aide d'un cytomètre de flux FC500 (Beckman-Coulter, Villepinte, France).

III. Biochimie des protéines

L'identification des protéines est réalisée en collaboration avec le Dr. M. Zivy et la plateforme de protéomique de l'IFR87. La description précise de la procédure utilisée pour réaliser les électrophorèses bidimensionnelles et la spectrométrie de masse est faite dans [1].

1. Extraction des protéines d'*A. thaliana*

Le matériel est récolté et conservé en aliquote d'environ 100 mg. Les plantules sont épongées et nettoyées à l'aide de papier Whatmann avant d'être pesées et congelées en tubes de 2 mL non autoclavés dans l'azote liquide. Environ 100 mg de matériel végétal frais est collecté pour un tube ; le poids exact est mesuré pour chacun des tubes. Les échantillons sont conservés à -80°C ou en azote liquide.

Pour extraire les protéines, les échantillons congelés sont broyés (broyeur Retsch MM300, Quiagen) avec 2 billes métalliques (une de 3 mm et une de 5 mm de diamètre) et deux cycles de 30 secondes à la fréquence de 30 battements.s⁻¹. Puis, 400 µL de tampon d'extraction (Hepes/NaOH pH 7,2 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Glycérol 10 % [v/v], Triton 1 % [v/v], PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 2 mM, NaCl 150 mM et une tablette d'antiprotéases (Complete protease inhibitor, Roche) est ajoutée. Après homogénéisation, un nouveau cycle de 30 s à la même fréquence est réalisé. Puis, les échantillons sont incubés 30 minutes à 4°C sous légère agitation. Cette resuspension est suivie d'une centrifugation de 45 min à 4°C à 18000 g, le surnageant est récupéré et constitue l'extrait brute de protéines solubles et solubilisées.

2. Dosage des protéines

Les protéines sont ensuite dosées selon la méthode de Bradford en utilisant la solution du Quick Start Bradford Protein Assay (BioRad, Marne la coquette, France). L'albumine de sérum de bœuf a été utilisée pour établir la courbe de calibration. Cette dernière est réalisée pour des quantités d'albumine allant de 1 à 12 µg. Le volume final de réaction de 1 mL contient 200 µL du réactif, 2 µL d'extrait protéique (ou l'albumine) et de l'eau. Le blanc et la

gamme d'albumine sont réalisés en présence de 2 µL de tampon d'extraction. Après agitation, l'absorbance à 595 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

3. Electrophorèses des protéines - SDS-PAGE

Les échantillons (15 à 50 µg de protéines par échantillons) sont mélangés à une quantité égale de tampon de charge (Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM, glycérol 10 % [v/v], SDS 2 % [p/v], bleu de bromophénol 0,02 % [p/v], β-mercaptoethanol 5% [v/v]) avant d'être incubés 5 minutes dans de l'eau bouillante et centrifugés 2 minutes à 4°C à 14000 g. Les protéines sont séparées dans un gel d'acrylamide (acrylamide 12 %, Tris-HCl pH 8,8 0,375 M, SDS 0,1 % [p/v], APS (persulfate d'ammonium) 0,12 % [p/v], TEMED 0,08 % [v/v]) après avoir été concentrées dans un gel de concentration (acrylamide 4 %, Tris-HCl pH 6,8 0,125 M, SDS 0,1 % [p/v], APS 0,2 % [p/v], TEMED 0,1% [v/v]). L'APS et le TEMED sont toujours ajoutés juste avant de couler le gel. Si le gel n'est pas utilisé, il peut être conservé 2 jours maximum à 4°C dans une atmosphère humide afin d'éviter la dessiccation. Dans le cas d'une électrophorèse comparative, la même quantité de protéines est déposée dans chacun des puits. Les échantillons peuvent être gardés à -20°C à ce stade. Le dépôt des échantillons est réalisé dans le tampon de migration ou « à sec » si on veut charger un maximum de protéines. La migration s'effectue dans le tampon de migration (Tris-base 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1% [p/v]) à voltage constant, 80 V tant que les échantillons sont dans le gel de concentration, puis, le voltage peut être augmenté progressivement. Après la migration, si le gel n'est pas utilisé pour une autre analyse, il est coloré au bleu de coomassie R-250.

4. Western blot

Lorsque l'électrophorèse est terminée, le gel est débarrassé du gel de concentration, puis il est rincé dans le tampon de transfert (glycine 192 mM ; Tris-Base 25 mM ; SDS 0,05 % [p/v] ; 20 % [v/v] de méthanol). Le gel est ensuite mis entre 6 feuilles de papier whatman et 2 feuilles de papier « *KimWipes* » (Kimberly-Clark) contre une membrane PVDF (polyfluorure de vinylidène) adaptée aux applications en fluorescence (PVDF-LFP, GE Healthcare Life Science, France), préalablement réactivée avec du méthanol. Ce montage est réalisé dans du tampon de migration, une fois terminé le tout est inséré dans la cuve en prenant soins d'avoir le gel du côté de l'anode et la membrane du côté de la cathode. Le

transfert est réalisé durant la nuit à 4°C et 30 V (voltage constant) ou 4h à 4°C et 260 mA (ampérage constant).

La membrane est récupérée puis rincée avec du tampon PBS (NaCl 75 mM, Na₂HPO₄ 80 mM, NaH₂PO₄ 20 mM) et est incubée durant 6 h avec la solution de saturation (PBS, Tween 20 0,3 % [v/v]; lait en poudre (Advance Blocking reagent, GE Healthcare Life Science) 5 % [p/v]) à température ambiante. Une fois saturée, la membrane est rincée 5 min dans du PBS-Tween 20 0,3 % [v/v]. La solution de lavage est remplacée par la solution contenant l'anticorps primaire, une incubation est réalisée la nuit à 4°C sous légère agitation. Les membranes sont ensuite lavées 5 fois avec la solution de dilution des anticorps (PBS, tween 20 0,3 % [v/v], lait en poudre 0,25 % [p/v]). La solution contenant l'anticorps secondaire est ensuite ajoutée en prenant soins de recouvrir le tout de papier d'aluminium car les anticorps fluorescents sont photo-labiles. L'incubation est poursuivie durant 4 heures sous légère agitation. Puis, la membrane est lavée deux fois 5 min avec la solution de dilution des anticorps, puis 2 fois 5 min avec du PBS-tween 20 0,3 % [v/v] et enfin deux fois avec du PBS uniquement. La membrane est ensuite séchée à l'abri de la lumière. La révélation est réalisée à l'aide du Pharos FX Molecular Imager System (BioRad).

5. Détection des protéines carbonylées

L'extraction des protéines a été réalisée selon la procédure décrite précédemment en ajoutant 2 % [v/v] de β -mercaptoethanol au tampon d'extraction. Les groupements carbonyles des protéines ont été dérivés en 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNP) avec du dinitrophenylhydrazine (DNPH) fournit par le kit OxyBlot (Chemicon, Molsheim, France). Le mélange de 5 μ L d'échantillon protéique et autant de SDS 12 % [v/v] est réalisé afin de dénaturer les protéines. Puis, les groupements carbonyles sont dérivés en ajoutant 10 μ L de DNPH avant d'être incubés à température ambiante durant 15 min. Enfin, 7,5 μ L de solution de neutralisation est ajouté et la solution est homogénéisée. Les dérivats peuvent être conservés à 4°C durant une semaine et sont prêt à être déposés sur gel SDS-PAGE. Pour chaque échantillon, un duplicat subit la même procédure sans toutefois être incubé avec le DNPH et cela constitue le contrôle de spécificité de la reconnaissance. Un anticorps primaire spécifique reconnaît le groupement DNP. Selon les recommandations du fournisseur, entre 10 et 15 μ g de protéines sont déposées sur un gel SDS-PAGE 12 %. Le transfert sur membrane

PVDF (GE Healthcare life Science) a été réalisé durant la nuit à 4°C et 30 V (voltage constant) dans le tampon de transfert (glycine 192 mM ; Tris-Base 25 mM ; SDS 0,05 % ; 20 % v/v de méthanol). La révélation a été faite à l'aide du réactif chemoluminescent ECLplus (GE Healthcare life Science) selon les recommandations du fournisseur.

6. Séparation et dosage des peptides chez *A. thaliana*

L'extrait brute de protéines a été obtenue selon la méthode décrite précédemment mais en utilisant 1 mL de tampon d'extraction. Après une deuxième centrifugation à 18000 g durant 15 min à 4°C de l'extrait brute, 50 µL de ce dernier est appliqué sur une colonne d'exclusion de taille optimisée pour la séparation des peptides (Superdex peptide 10/300 GL; GE Healthcare Life Science) dans un système FPLC (AKTA Explorer 10S; GE Healthcare Life Science). L'élution est réalisée avec un tampon contenant 50 mM de phosphate de sodium et 150 mM de NaCl à pH 7,0 avec un flux constant de 0,5 mL/min et le chromatogramme est enregistré à 215 nm. Les fractions d'élutions de 1 mL sont collectés et le contenu peptidique de chacune d'entre elle est quantifié en utilisant le kit LavaPep Peptide and Protein assay (FluoProbes ; Interchim, Montluçon, France) selon la procédure décrite par le fournisseur. 50 µL de réactifs sont mélangés avec autant d'extrait peptidique et incubés durant une heure à l'obscurité. La fluorescence (excitation 540 nm; émission 630 nm) est ensuite enregistrée grâce à un lecteur de fluorescence en microplaque (Infinite M200, Tecan, Männedorf, France) et la concentration peptidique est déduite à partir de la courbe standard de calibration. Le composé fluorescent est capable de se lier réversiblement à la lysine, l'arginine et l'histidine. La sensibilité du dosage est de 100 ng/mL de peptide et le signal est stable durant 6 h. Chaque mesure est la moyenne de trois répliques biologiques indépendant et chacun mesurés deux fois.

7. Mesure de l'activité d'enzymes antioxydante chez *A. thaliana*

Environ 100 mg de matériel végétal frais est broyé en azote liquide avec 100 mg de polyvinylpyrrolidone insoluble. L'extraction est réalisée avec 1,5 mL de tampon NaH₂PO₄ 120 mM pH 7,5, 5 mM EDTA. Un aliquote de 100 µL est prélevé pour le dosage de la chlorophylle, le reste est centrifugé 10 min à 14000 g à 4°C. Une fraction du surnageant

obtenu est appliquée sur une colonne d'exclusion de taille NAP-5 (GE Healthcare Life Science) afin de désaler l'extrait. Pour cela, la colonne est équilibrée avec 10 mL de tampon d'extraction puis 500 µL du surnageant est appliqué. L'élution est réalisée avec 1 mL de tampon d'extraction, récupérant ainsi 1 mL d'extrait désalé.

Le dosage de l'activité catalase a été réalisé selon le protocole décrit par Veljovic-Jovanovic et al. [386]. La diminution de l'absorbance à 240 nm ($\epsilon = 0,04 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dans 50 mM de KH_2PO_4 et 20 mM d'eau oxygéné a été suivie.

L'activité glutathion réductase a été déterminée en suivant l'oxydation du NADPH à 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) comme décrit par Donahue et al. [387]. La réaction débute par l'ajout de 500 µM de GSSG dans le mélange réactionnel contenant NaH_2PO_4 120 mM EDTA 5 mM pH 7,5, 100 µM de NADPH et 50 ou 100 µL d'extrait dans un volume finale de réaction de 1 mL. La réaction est suivie durant 5 min et la pente est calculée généralement sur les deux premières minutes.

L'activité ascorbate peroxydase a été déterminée en suivant l'oxydation d'1 mM d'ascorbate à 290 nm comme décrit par Dutilleul et al. [388] ($\epsilon = 2,88 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La réaction est initiée par l'addition de 0,1 mM d'eau oxygéné.

8. Expression et purification d'*AtMETAP1A*

La lignée d'*E. coli* d'expression BL21 (DE3) (géotype : F- *ompT hsdSB* (rB-mB-) *gal dcm* (DE3)) a été transformée par choc thermique à 42°C avec le plasmide pET-51b(+) contenant l'ADNc correspondant à *AtMETAP1A* clonée avec un STREPII-tag en position N-terminale. Une colonie issue de cette transformation a été utilisée pour inoculer une pré-culture de milieu LB contenant de l'ampicilline et cultivée à 37°C. A partir de cette pré-culture, la culture d'expression est réalisée. Lorsque l'absorbance à 600 nm arrive à 0,600 l'expression est induite par l'ajout de 300 µM d'IPTG dans la culture, cette dernière est poursuivie à 20°C. La culture est prolongée durant toute la nuit avant d'être arrêtée. Les cellules sont récupérées à l'aide d'une centrifugation de 20 min à 4°C et 4500 g. Le culot est repris avec un tampon Tris 50 mM pH 7,5. La suspension cellulaire subit ensuite à 4°C quatre cycles de sonication de 20 s avec 30 s d'arrêt entre chaque cycle. Puis, une centrifugation de 15 min à 15000 g et à 4°C permet de récupérer la fraction soluble des protéines. Le surnageant récupéré est appliqué sur une colonne Strep-tactin (IBA BioTAGnologie - Bertin

Pharma, Montigny le Bretonneux, France). Le Strep-tag est un peptide synthétique de huit acides aminés dont la séquence interagit très spécifiquement avec la Strep-tactin, un dérivé de la streptavidine. L'élution est réalisée selon les recommandations du fournisseur. L'EDTA n'est pas ajouté dans le tampon d'élution car la méthionine aminopeptidase est une métalloprotéase. Le tampon d'élution est constitué de 100 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl et 2,5 mM de D-desthiobiotine permet de collecter plusieurs fractions protéiques analysées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. La D-desthiobiotine entre en compétition avec le Strep-tag et permet ainsi l'élution de la protéine. Une électrophorèse SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de coomassie permet d'identifier les fractions contenant la protéine d'intérêt qui sont ensuite rassemblées en une seule fraction et dialysée contre un tampon contenant de l'Hepes 50 mM pH 7,4, CoCl₂ 200 μM, NaCl 150 mM et glycérol 50 % [v/v]. La dialyse de 1,5 ml d'éluat est réalisée durant deux heures dans 500 ml de tampon ne contenant pas le glycérol, puis une nouvelle fois dans les mêmes conditions. Enfin, une dernière dialyse de 8 heures est réalisée avec 500 ml de tampon de dialyse complet (avec le glycérol). Après la dialyse, la quantité de protéines est estimée en utilisant un dosage Bradford (décrit précédemment) et la protéine purifiée est conservée à -20°C.

9. Mesure de l'activité méthionine aminopeptidase

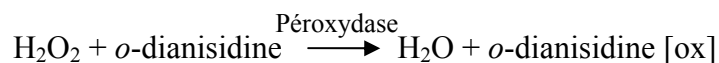
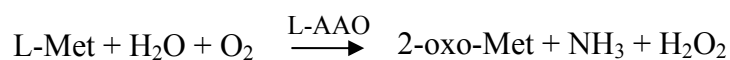
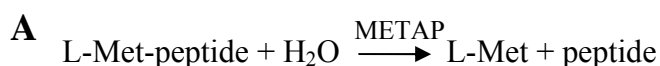
La majorité des peptides utilisés ont été synthétisés par la compagnie Genscript (Piscataway, Etats-Unis), d'autres par Bachem (Well-am-Rhein, Allemagne) ou Sigma (L'Isle d'Abeau Chesne, France). Les peptides ont été dissous dans de l'eau à une concentration finale allant de 50 mM à 150 mM.

L'activité méthionine aminopeptidase est mesurée selon le protocole décrit dans [275]. L'activité a été mesurée à 30°C en suivant en continu l'absorbance de l'*o*-dianisidine oxydée à 440 nm produite par la réaction de couplage décrite en figure 2a. Le test est réalisé dans un volume final de 100 μL dans des cuves de mesures ayant un trajet optique de 1 cm. L'évolution de l'absorbance est suivie dans le temps avec un spectrophotomètre Ultrospec-4000 (AP-biotech). Le mélange pré réactionnel (95 μL) contient (pour une concentration finale dans 100 μL) : Hepes pH 7,4 45 mM, CoCl₂ 0,2 mM, *o*-dianisidine 0,1 mg/mL préparée tous les trois jours et conservée à l'obscurité à 4°C, peroxydase 3 U (stockées pour un mois à -20°C), L-AAO (L-amino acid oxydase) 0,5 U et 0,01 à 20 mM de peptide. Ce mélange pré-réactionnel est incubé 15 minutes dans le spectrophotomètre à 30°C afin que la ligne de base

soit stable. La réaction débute par l'ajout de 5 μL de l'enzyme purifiée à une concentration de 0,05 à 12 μM (concentration finale) dilué dans de l'Hepes pH 7,4 50 mM, CoCl_2 0,2 mM et 150 mM de NaCl. La réaction est suivie durant 15 minutes. La vitesse initiale est mesurée généralement au cours des cinq premières minutes hormis pour quelques cas, à une concentration en peptide supérieur à 2 mM, où l'établissement de la phase stationnaire est retardé. Ce test permet de mesurer six vitesses initiales de 0,001 à 0,5 $A_{440\text{nm}}\cdot\text{min}^{-1}$ en parallèle, ce qui est suffisant pour déterminer les paramètres catalytiques. Cependant, au dessus de 0,5 $A_{440\text{nm}}\cdot\text{min}^{-1}$, la METAP doit être diluée pour être dans la partie linéaire de la loi de Beer-Lambert. Les vitesses mesurées sont transformées en s^{-1} en les divisant par la concentration en enzyme utilisée, le coefficient d'extinction molaire de l'*o*-dianisidine oxydée (10580 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ déterminé expérimentalement par incubation de la L-méthionine dans la réaction) et la longueur du trajet optique (1 cm) (Fig. 56).

Les paramètres cinétiques sont obtenus en utilisant le module Enzyme kinetics 1.1 du logiciel Sigma Plot version 8.0 par régression linéaire de l'équation de Mickaelis et Menten (Fig. 56). L'efficacité catalytique $k_{\text{cat}}\cdot K_m^{-1}$ est ensuite calculée en utilisant les données expérimentales (Fig. 56). Un traitement statistique des incertitudes de l'efficacité catalytique a été réalisé par 100 itérations de Monte-Carlo en utilisant l'erreur standard expérimentale de mesures indépendantes.

Lorsque le test d'inhibition de l'activité méthionine aminopeptidase avec la fumagilline a été réalisé, le substrat est utilisé pour initier la réaction. De plus, l'enzyme et la fumagilline sont incubées 15 min dans le mélange réactionnel avant l'ajout du substrat.



C
$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{\epsilon \cdot E_o \cdot 60 \cdot l}$$

$$\text{Efficacité catalytique} = \frac{k_{cat}}{K_m}$$

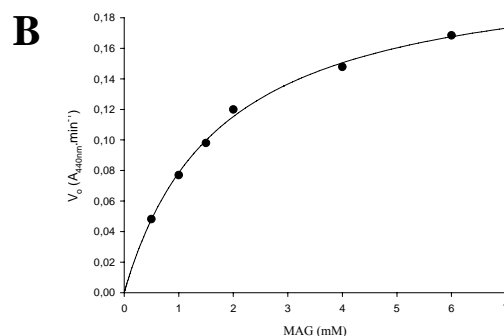


Figure 56 - Mesure de l'activité METAP.

A., Ces trois réactions successives permettent de mesurer l'activité méthionine aminopeptidase (METAP). **B.**, Courbe de Mickaelis et Menten utilisée pour obtenir V_{max} et K_m avec le tripeptide MAG. **C.**, Les deux équations permettent de calculer les paramètres catalytiques à partir de la courbe de Mickaelis et Menten. Les abréviations utilisées sont : L-AAO, L-amino acid oxidase ; V_o , vitesse initial ($A_{440nm} \cdot \text{min}^{-1}$) ; k_{cat} , constante catalytique (s^{-1}) ; V_{max} , vitesse maximum ($A_{440nm} \cdot \text{min}^{-1}$) ; ϵ , coefficient d'extinction molaire de l'*o*-dianisidine oxydée ; E_o , concentration en METAP ; l , longueur du trajet optique ; *efficacité catalytique* ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) K_m , constante de Mickaelis (M).

IV. Dosage de métabolites

1. Dosage du glutathion chez *A. thaliana*

Le glutathion a été quantifié à l'aide d'un dosage à recyclage selon la procédure décrite par Queval et al. [389]. La glutathion réductase catalyse la réduction du DTNB (acide 5,5-dithiobis-2-nitro-benzoïque) qui est suivie à 412 nm. Cette technique permet de mesurer les formes réduite et oxydé de glutathion (pool total). Lorsqu'un traitement des échantillons extrait est réalisé avec du 2-vinylpyridine (VPD), la forme oxydée, GSSG, est mesurée uniquement. En effet, le VPD se complexe à la forme réduite l'empêchant de rentrer dans le couplage réactionnel. La glutathion réductase est préparée dans un tampon NaH_2PO_4 0,2 M pH 7,5, EDTA 10 mM. Pour le dosage du pool total de glutathion, 10 μL d'extrait sont utilisés. Trois répliquas techniques sont réalisés pour chaque échantillon. L'extrait est ajouté dans un puit d'une microplaque contenant NaH_2PO_4 pH 7,5 50 mM, 5 mM EDTA, 0,5 mM de NADPH, 0,6 mM DTNB pour un volume final de réaction de 200 μL . La réaction débute par l'ajout de la glutathion réductase. Après avoir rapidement homogénéisé les mélanges réactionnels, l'absorbance à 412 nm est suivie durant 10 min. Une courbe de calibration est réalisée dans les mêmes conditions avec une gamme allant de 0 à 1 nmol de GSH. La pente est généralement calculée avec les deux premières minutes et la réduction non spécifique du DTNB est soustraite de chaque mesure. Pour le dosage du GSSG, 200 μL de l'extrait est incubé avec 1 μL de VPD du 30 min à température ambiante. Après une étape de centrifugation de 10 min à 15000 g, des aliquotes de 20 μL sont mesurés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. De même, une courbe de calibration est faite dans les mêmes conditions avec une gamme de 0 à 100 pmol de GSSG.

2. Dosage du glutathion chez les cellules humaines

Les HUVECs et les cellules HCT-116s ont été cultivées dans les conditions décrites ci-dessus. Les cellules ont subi ou non le traitement à la fumagilline. Dans la condition contrôle, le même volume de solvant de la fumagilline (DMSO 1/4000^{ème} du volume de culture) est appliqué. Après 72 h de culture en présence de l'inhibiteur, les cellules sont récupérées et dénombrées, le culot cellulaire obtenu est rincé avec 1 mL de DPBS froid. Une nouvelle centrifugation à 4°C durant 5 min à 2500 g permet de récupérer le culot cellulaire.

Le surnageant est retiré et le culot peut être conservé une semaine à -80°C . Les cellules sont resuspendues lors de la décongélation avec $400\ \mu\text{L}$ de tampon d'extraction froid (phosphate de potassium $100\ \text{mM}$ - EDTA $5\ \text{mM}$ pH $7,5$, $0,1\ \%$ [v/v] de triton X-100 et $0,6\ \%$ [p/v] d'acide sulfosalicylique). L'acide sulfosalicylique inhibe la γ -glutamyl-transférase empêchant ainsi la perte de glutathion. Les cellules subissent ensuite quatre cycles de $30\ \text{s}$ de sonication. Puis, une centrifugation à $4000\ g$ durant $4\ \text{min}$ à 4°C permet de se débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et conservé sur la glace la journée au maximum.

Le dosage est réalisé selon le même principe que celui décrit pour le glutathion chez *A. thaliana*. Pour chaque échantillon, deux mesures sont réalisées, le pool total de glutathion et uniquement la forme oxydée à l'aide du VPD. Le dosage se fait en microplaque de 96 puits. Le mélange réactionnel pour le dosage du glutathion total contient dans le tampon phosphate de potassium $100\ \text{mM}$ - EDTA $5\ \text{mM}$ pH $7,5$: $500\ \mu\text{M}$ de DTNB, $240\ \mu\text{M}$ de NADPH, $0,98\ \text{U/ml}$ de glutathion réductase et $20\ \mu\text{L}$ d'échantillon pour un volume total de $200\ \mu\text{L}$. La réaction débute par l'ajout du NADPH. Après homogénéisation, l'absorbance à $412\ \text{nm}$ est suivie durant $10\ \text{min}$. La pente est généralement calculée sur les 3 premières minutes. Pour chaque échantillon, deux mesures sont réalisées. Une courbe de calibration est construite en utilisant du GSH dans les mêmes conditions expérimentales. La conversion non spécifique du DTNB est soustraite des valeurs obtenues.

Pour quantifier le GSSG, $200\ \mu\text{L}$ d'extrait sont incubés avec $1\ \mu\text{L}$ de VPD durant $1\ \text{heure}$ en agitant régulièrement. Puis, $12\ \mu\text{L}$ de triéthanolamine diluée six fois est ajouté. Le pH doit ensuite être entre 6 et 7 . Les échantillons sont incubés durant $10\ \text{min}$ sur la glace. Le GSSG est ensuite quantifié selon la même méthode.

3. Dosage du glutathion chez les HUVECs avec le CMFDA

Pour le traitement au CMFDA, les HUVECs sont cultivées en boîte de $25\ \text{cm}^2$ dans les conditions décrites ci-dessus. Le CMFDA (5-chlorométhylfluorescein diacétate) a été acheté chez Invitrogen (C7025) et une solution stock dans le DMSO à $2,5\ \text{mM}$ est réalisée. Le milieu de culture est remplacé par $2,5\ \text{mL}$ de milieu de culture contenant $0,5\ \mu\text{M}$ de CMFDA. Les cellules sont ensuite remises dans l'incubateur pour $30\ \text{min}$. Puis, le milieu est retiré, les cellules sont rincées avec du DPBS et récupérées à l'aide de la trypsine. Le tout est transféré

dans un tube à hémolyse qui est centrifugé à 4°C durant 5 min à 2500 g. Le surnageant est retiré, le culot est repris avec 500 µL de DPBS froid avant d'être analysé en cytométrie.

4. Dosage des nicotinamides chez *A. thaliana*

Les pyridines nucléotides ont été quantifiés selon la méthode décrite par Queval et al. [389]. Le test implique la réduction du dichlorophenolindophenol (DCPIP) catalysée par le phenazine methosulfate (PMS) en présence d'éthanol et d'alcool déshydrogénase (ADH) (pour le NAD⁺ et le NADH) ou de glucose 6-phosphate et glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) (pour la NADP⁺ et le NADPH). Les formes réduites et oxydées des pyridines nucléotides sont séparées à l'aide d'une destruction préférentielle en conditions acides ou alcalines. Pour mesurer le NAD⁺ et le NADH, l'ADH est dissoute dans un tampon Hepes pH 7,5 100 µM, 2 mM EDTA à la concentration de 2500 U/ml. La mesure est réalisée avec 20 µL d'extrait dans un puit d'une microplaque contenant 50 mM d'Hepes pH 7,5, 1 mM d'EDTA, 120 µM de DCPIP, 2 mM de PMS et 10 µL d'ADH pour un volume final de réaction de 200 µL. La réaction débute avec l'ajout de 15 µL d'éthanol. Après une rapide homogénéisation, la diminution de l'absorbance à 600 nM est suivie durant 10 min. Une courbe de calibration est construite avec une gamme de NAD⁺ et NADH de 0 à 100 pmol. Le blanc est soustrait de toutes les mesures et chaque échantillon est mesuré trois fois.

Le NADP⁺ et le NADPH ont été quantifiés selon le même principe. La G6PDH a été diluée à 200 U/mL dans le tampon Hepes 100 µM pH 7,5, 2 mM d'EDTA. Des aliquotes de 30 µL sont utilisés pour le dosage. Dans le mélange réactionnel, l'éthanol est remplacé par 500 µM de glucose-6-phosphate. L'ADH est remplacée par 10 µL de G6PDH qui est utilisée pour initier la réaction. Le traitement des données est réalisé de la même manière que pour le NAD⁺ et le NADH.

5. Analyse des thiols chez *A. thaliana*

Les thiols ont été également analysés par HPLC. Pour cela, 200 µL d'extrait neutralisé sont ajoutés à 100 µL de Ches 500 mM pH 8,5 et 20 µL de DTT 10 mM. Après une incubation à température ambiante de 30 min qui permet la réduction des disulfides, les thiols sont dérivés à l'aide de 20 µL de monobromobimane 30 mM. L'ensemble est maintenu à l'obscurité durant 15 min et la réaction est arrêtée par l'addition de 660 µL de 10 % [v/v]

d'acide acétique. Le mélange de dérivation est centrifugé à 10 000 g durant 10 min et 900 µL du surnageant sont passés à travers un filtre de 0,2 µm. Puis, 50 µL du filtrat sont injectés sur une colonne de phase inverse Waters Symmetry C18 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) dans un système HPLC Waters Alliance (Saint Quentin en Yvelines, France) avec un détecteur de fluorescence Waters 2475 ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$). Les dérivats sont séparés grâce à une élution isocratique avec 10 % de méthanol et 0,25 % d'acide acétique [v/v] (pH 4,3) à un flux de 0,8 mL/min et à une température de colonne de 40°C. Les pics sont identifiés et quantifiés à l'aide de solutions de standards et de courbes de calibrations. Dans ce contexte, les dérivats sont élués à 6,5 min (Cys), 7,1 min (Cys-Gly), 10 min (γ -Glu-Cys) et 12,2 min (glutathion).

6. Quantification des métabolites et acides aminés chez *A. thaliana*

Les analyses GC-TOF-MS ont été réalisées en collaboration avec la plateforme de métabolomique de l'IFR 87 et le Pr. G. Noctor. La procédure utilisée est celle détaillée dans [390]. Environ 100 mg de matériel végétal est broyé en azote liquide avec 2 mL de tampon d'extraction (80% de méthanol contenant 100 µM d' α -aminobutyrate comme contrôle interne). Les extraits sont transférés en tube et laissés 20 min sur la glace avant d'être centrifugés à 10 000 g et 4°C durant 15 min. Le surnageant est récupéré et centrifugé une nouvelle fois avant d'être déshydraté et conservé à -80°C. La methoxyamine est dissous en pyridine à la concentration de 20 mg/mL et 50 µL est utilisé pour resuspendre un échantillon. Après homogénéisation et incubation à 30°C durant 90 min, 80 µL de N-méthyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacétamide sont ajoutés et l'incubation est prolongée de 30 min à 37°C puis une heure à température ambiante. L'injection sur la colonne est réalisée avec 1 µL de ce mélange de dérivation. La séparation est réalisée grâce à un flux d'hélium de 1 mL/min avec une augmentation de la température entre 2 et 18 min de 80 à 330°C suivie de 6 min à 330°C. L'ionisation est réalisée par d'un faisceau d'électron de 70 eV puis le spectre de masse est enregistré. Tous les spectres de masse ont été confirmés par injection individuelle de standard dans les mêmes conditions. La quantification des métabolites a été réalisée à l'aide d'une courbe de calibration établie avec chacun des standards.

Pour les analyses par HPLC des acides aminés, le matériel végétal a été broyé en azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon afin d'obtenir une poudre fine. Puis, les acides

aminés sont extraits à l'aide 10 μ L d'HCl 20 mM par milligramme de matériel végétal. Une centrifugation à 4°C durant 10 min à 14000 g permet de se séparer des débris cellulaires et des composés insolubles. Puis 10 μ L du surnageant sont mélangé avec 70 μ L du tampon AccQ borate et 20 μ L de 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (réactif AccQ, Waters) sont ajoutés. Le tout est correctement homogénéisé et laissé 1 min à température ambiante avant d'être transféré dans une fiole d'injection. Le mélange est ensuite incubé à 55°C durant 10 min. Les groupements amines primaires et secondaires sont ainsi dérivés. Puis, 10 μ L du dérivat sont injectés sur colonne. Les analyses HPLC ont été réalisées avec un module de séparation Waters modèle 2695. La séparation a été réalisée en utilisant une colonne Waters Nova- Pak C18 équipée d'une pré-colonne nova-pak C18 Guard Pak. L'élution des acides aminés dérivés est détectée avec un détecteur de fluorescence Waters model 2475 (Ex : 250 nm et Em : 295nm). L'éluant A (phase aqueuse) est 140 mM d'acétate de sodium et 6,9 mM triéthylamine à pH 5 et l'éluent B (phase organique) est de l'acetonitrile/eau -60/40. Le protocole d'élution est de 0 à 30s 100% de A puis de 30s à 5 min gradient linéaire jusqu' à 5% de B ; de 5 à 35 min, gradient linéaire jusqu'à 7,5% de B et de 35 à 41 min gradient linéaire jusqu'à 10% de B, de 41 à 44 min 10% de B, de 44 à 54 min, gradient linéaire jusqu'à 20% de B, de 54 à 61 min 20% de B au flux constant de 1 ml/min.

Les solutions d'acides aminés standards ont été réalisées et diluées dans 20 mM HCl. Les acides aminés ont été resuspendu à 100 mM et conservés à -20°C durant un mois au maximum. Tous les standards ont subi le même protocole de dérivation. L'identification des pics a été réalisée à l'aide de ces standards et une courbe de calibration a été effectuée pour chacun des acides aminés.

ANNEXE 1

« Cotranslational Proteolysis Dominates Glutathione Homeostasis to Support Proper Growth and Development »

L'article et l'ensemble des données supplémentaires :

<http://www.plantcell.org/content/21/10/3296.full?sid=b1867deb-ad87-4942-a428-1f0284630f3d>

Cotranslational Proteolysis Dominates Glutathione Homeostasis to Support Proper Growth and Development

Frédéric Frottin,^a Christelle Espagne,^a José A. Traverso,^a Caroline Mauve,^{b,c} Benoît Valot,^{d,e,f} Caroline Lelarge-Trouverie,^{b,c} Michel Zivy,^{d,e,f} Graham Noctor,^{b,c} Thierry Meinel,^a and Carmela Giglione^{a,1}

^aCentre National de la Recherche Scientifique, Institut des Sciences du Végétal, Unité Propre de Recherche 2355, Protein Maturation, Cell Fate, and Therapeutics, F-91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

^bUniversité Paris-Sud, Institut Fédératif de Recherche 87, Institut de Biotechnologie des Plantes, Plateforme Métabolisme-Métabolome, F-91405 Orsay, France

^cCentre National de la Recherche Scientifique, Institut Fédératif de Recherche 87, Institut de Biotechnologie des Plantes, Plateforme Métabolisme-Métabolome, Unité Mixte de Recherche 8618, F-91405 Orsay, France

^dUniversité Paris-Sud, Plateforme de Protéomique, Institut Fédératif de Recherche 87, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Paris-Sud/Institut National de la Recherche Agronomique, F-91190 Gif-sur-Yvette, France

^eCentre National de la Recherche Scientifique, Plateforme de Protéomique, Institut Fédératif de Recherche 87, F-91190 Gif-sur-Yvette, France

^fInstitut National de la Recherche Agronomique, Plateforme de Protéomique, Institut Fédératif de Recherche 87, F-91190 Gif-sur-Yvette, France

The earliest proteolytic event affecting most proteins is the excision of the initiating Met (NME). This is an essential and ubiquitous cotranslational process tightly regulated in all eukaryotes. Currently, the effects of NME on unknown complex cellular networks and the ways in which its inhibition leads to developmental defects and cell growth arrest remain poorly understood. Here, we provide insight into the earliest molecular mechanisms associated with the inhibition of the NME process in *Arabidopsis thaliana*. We demonstrate that the developmental defects induced by NME inhibition are caused by an increase in cellular proteolytic activity, primarily induced by an increase in the number of proteins targeted for rapid degradation. This deregulation drives, through the increase of the free amino acids pool, a perturbation of the glutathione homeostasis, which corresponds to the earliest limiting, reversible step promoting the phenotype. We demonstrate that these effects are universally conserved and that the reestablishment of the appropriate glutathione status restores growth and proper development in various organisms. Finally, we describe a novel integrated model in which NME, protein N- α -acylation, proteolysis, and glutathione homeostasis operate in a sequentially regulated mechanism that directs both growth and development.

INTRODUCTION


All proteins undergo proteolysis, a major irreversible modification mediated by a large number of proteases. These enzymes are thought to constitute 1 to 5% of eukaryotic proteomes (Lopez-Otin and Overall, 2002). Protease function is essential in numerous physiological processes, including development, blood coagulation, and cell death and in the development of many cancers and infectious diseases (Goldberg, 2003; van der Hoorn, 2008).


N-terminal Met excision (NME) is the earliest proteolytic event affecting proteins that are still bound to the ribosome, before their synthesis has been completed (Giglione et al., 2004, 2009). The NME pathway is ubiquitous, and about two-thirds of the

proteins in any organism undergo this type of processing (Meinel and Giglione, 2008b). Dedicated NME machinery has been found in all cell compartments in which protein synthesis occurs. The NME machinery of higher eukaryotes involves two classes of proteases: peptide deformylases and Met aminopeptidase (MAP; with MAP1D enzymes in the organelles and MAP1A and MAP2 in the cytoplasm) (Giglione et al., 2004; Meinel et al., 2006). There is evidence that NME is tightly regulated throughout development, tumorigenesis, and during the responses induced by various external signals in both animals and plants (Wang et al., 2000; Cleary et al., 2002; Endo et al., 2002; Florens et al., 2002; Kanno et al., 2002; Selvakumar et al., 2004; Dasgupta et al., 2005; Ross et al., 2005; Selvakumar et al., 2006), corroborating the idea that this mechanism is an important signal to support growth, proliferation, survival, and differentiation. Accordingly, NME enzymes are the targets of various natural compounds with antibiotic, antiparasitic, antifungal, or anticancer effects (for reviews, see Boularot et al., 2004; Giglione et al., 2004). These findings, together with the observation that NME components are overexpressed in many tumor cells, suggest that the targeted inhibition of the corresponding enzymes may provide a means of treating various pathological conditions,

¹ Address correspondence to carmela.giglione@isv.cnrs-gif.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Carmela Giglione (carmela.giglione@isv.cnrs-gif.fr).

 Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

 Online version contains Web-only data.
www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.109.069757

including cancer. To date, only a small number of NME inhibitors that are effective *in vivo* have been discovered. The main difficulty in finding novel potent and effective drugs against NME enzymes is our limited knowledge of the physiological functions of N-terminal Met excision, despite some efforts to characterize the signaling pathways associated with NME (Zhang et al., 2000; Yeh et al., 2006; Zhang et al., 2006). Deciphering the physiological functions of the NME process has been hampered by gene redundancy, lethality upon inhibition, and the fact that NME has more than 15,000 putative distinct targets in higher eukaryotes (see Martinez et al., 2008). One initial basic hypothesis was that NME might facilitate further modifications to the N terminus of the protein, such as *N*- α -acylation. *N*-myristoylation (N-Myr) is one such modification. N-Myr involves the addition, by N-myristoyltransferase, of a fatty acid to a set of nuclear-encoded proteins in which the N-terminal Gly is unmasked by NME (Bhatnagar et al., 2001; Resh, 2006; Meinnel and Giglione, 2008a). This lipidation is crucial, as myristoylated proteins are involved in major cell signaling mechanisms. N-Myr has been shown to be necessary, but not sufficient, for the targeting of the protein to the appropriate membrane. However, N-Myr does not occur in bacteria or organelles, and not all proteins with an N-terminal Gly residue undergo N-Myr. This modification alone therefore cannot account for the essential nature of NME in all organisms.

In this study, we used a dedicated inducible system in the model organism *Arabidopsis thaliana* to investigate the molecular basis of the absolute requirement for cytoplasmic NME (cNME) in higher eukaryotes. Multiple approaches, including proteomics and metabolomics, were used to examine the earliest molecular events associated with the inhibition of this process in *Arabidopsis*. Our studies demonstrate that developmental defects induced by NME inhibition are associated with an increase in proteolytic activity caused principally by an increase in the size of the pool of proteins available for rapid degradation. This deregulation of proteolysis drives the perturbation of both the glutathione pool and the redox state. The inhibitory effects of NME can be overcome by supplementation with reduced glutathione in higher plants, fungi, and Archaea, demonstrating the ubiquitous mechanism associated with the NME process. Thus, cNME plays a crucial role in maintaining the appropriate status of the key cellular redox buffer glutathione, and this involves the tight regulation of interconnected processes, including the proteolytic activity of the cell. We also show that this crosstalk between thiol status and proteolysis is essential for normal growth and development.

RESULTS

Validation of a Model System for Studying the Molecular Impact of cNME Inhibition

By combining reverse genetics and reverse chemogenomics in transgenic plant lines, we previously created a specific and reversible switch system for investigating the relevance of cytoplasmic NME in *Arabidopsis* (Ross et al., 2005). Wild-type seedlings, in which cNME is ensured by two types of MAPs

(MAP1 and MAP2s), proved insensitive to micromolar concentrations of Fumagillin, a highly specific, irreversible inhibitor of MAP2s, of which there are two copies in *Arabidopsis*. By contrast, MAP1A knockout variants (*map1A*) were unable to germinate under the same conditions. Analysis of the phenotype in the presence of high concentrations (i.e., > 1 μ M) of Fumagillin (which blocks all MAP2 activity) in several independent double-stranded RNA interference *Arabidopsis* lines displaying distinct MAP1A levels demonstrated that the extent of the developmental defect specifically depends on the concentration of MAP1A. We concluded that (1) cNME is an essential pathway in plants, (2) minimum levels of this process are required to ensure correct plant development (Ross et al., 2005), and (3) the phenotype induced by Fumagillin is unambiguously genetically linked to the only *MAP1A* allele. Fumagillin is therefore a useful tool for inducing reversible cNME deregulation and mimicking the developmental impact of the inhibition of this pathway by comparing the overall effects occurring in the two genetic backgrounds (i.e., the wild type and *map1A*). We decided to investigate the molecular events associated with cNME by focusing on the primary molecular targets that are sensitive to the inhibition of cytoplasmic NME. To identify the earliest events associated with cNME inhibition, we first established the lowest concentration of the inducer (Fumagillin) required to promote a visible defect in the course of development of the *map1A* line. The addition of 100 nM Fumagillin to the growth medium of germinating *map1A* seeds reproducibly triggered a developmental defect that was readily observable at early stages of development, between 2 and 10 d after imbibition (DAI; Figures 1A and 2; see Supplemental Data Sets 1 to 3 online; Ross et al., 2005).

We previously reported that the protein profiles of both the wild type grown in the presence of Fumagillin and of *map1A* were identical to that of the wild type grown in the absence of the drug (Ross et al., 2005). We investigated the global effects on the cellular proteome of early cNME inhibition and tried to identify the proteins involved by carrying out differential two-dimensional (2D) gel electrophoresis followed by tandem mass spectrometry (MS/MS) for protein identification on wild-type and *map1A* seedlings grown in the presence of 100 nM Fumagillin (*map1A* +F, insets in Figure 1A) 8-DAI. The MS/MS analysis of 441 spots (see Supplemental Data Set 1 online) led to the identification of several independent cytosolic N-terminal peptides (see Supplemental Data Set 2 online) from the wild type (42) and *map1A*+F (42). The nature of the N termini identified in the wild-type background confirmed the high degree of accuracy of the bioinformatics tool recently made available for the species-specific prediction of NME and related modifications (Martinez et al., 2008). Complete or partial retention of the N-terminal Met was observed for several proteins identified in the *map1A*+F context. Retention of the N-terminal Met was observed for 40% of the N termini, confirming effective and partial inhibition of the cNME *in vivo*, as expected from our strategy of focusing on the most sensitive targets (Figure 1B). Moreover, 68% of wild-type proteins for which the peptide N termini were identified were *N*-acetylated (the largest population of stable proteins), 20% were not *N*-acetylated, and the remaining proteins displayed mixed modifications. By contrast, in the *map1A*+F context, a smaller proportion of proteins (60%) were *N*-acetylated, and a

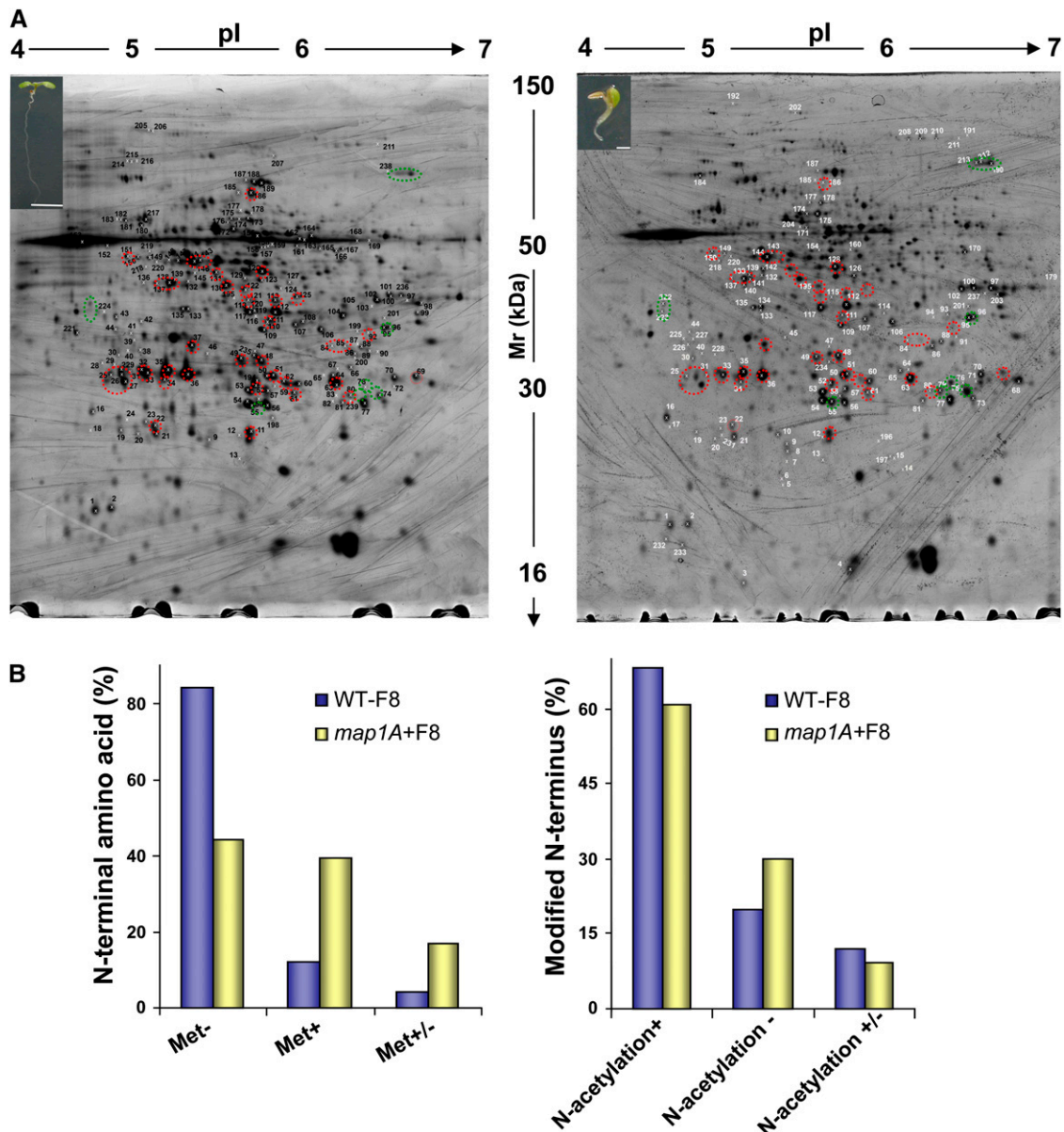


Figure 1. Proteomics of cNME Inhibition.

(A) Wild-type (left) and *map1A* (right) *Arabidopsis* seeds were grown in the presence of 100 nM Fumagillin for 8 DAI. The developmental impact associated with cNME deregulation is illustrated in the insets. Representative differential 2D gel electrophoresis patterns are shown for the two genetic backgrounds. Equal amounts (from 100 to 600 μ g) of total proteins were separated on the 18-cm pI 4 to 7 linear gradient IPG strips and by 11% SDS-PAGE. In the gel shown in the figure, 600 μ g were used. Proteins displaying differential expression are shown in gels, with their unique sample spot protein numbers. See also Supplemental Tables 1, 3, and 4 online for protein identification. The protein spots outlined with a circle were of significantly different intensities ($P \leq 0.05$) for the *map1A*+F mutant and the wild type. Green circles indicate spots for which abundance systematically increased with cNME inhibition, and red circles indicate spots with systematically lower intensity in *map1A*+F. We checked that the spots of the reference pattern wild type were also retrieved in both the *map1A*-F and (WT+F) images. In a previous preliminary analysis of line *map1A*, we showed that the 2D protein pattern is similar to that of the wild type (Figure 2D in Ross et al., 2005), demonstrating that the knockout of MAP1A has no functional impact at the proteome level.

(B) Comparative analysis of the identified N termini from the wild type and *map1A*+F at 8 DAI (for more details, see Supplemental Table 2 online). Met-, Met+, and Met+/- mean Met cleavage, Met retaining, and a mixture of the two situations in the sample, respectively.

[See online article for color version of this figure.]

significantly higher proportion of N termini were not *N*-acetylated (30%) (Figure 1B). This difference probably resulted from the N termini with a retained Met not being recognized by the enzymes responsible for *N*- α -acetylation. Thus, at the molecular level, cNME inhibition essentially induces a significant increase in the pool of proteins with both an N-terminal Met and a free α NH₂ moiety.

Proteomic Analysis of the Effects of Inhibiting cNME

With the above system, cNME inhibition in the *map1A* background appeared to be associated with only slight changes of the 2D electrophoresis profile (<5% of all spots; Figure 1A; see Supplemental Table 1 and Supplemental Data Set 3 online). The differential characterization of the 441 spots (see Supplemental Data Set 1 online) by MS/MS revealed that, in contrast with the small number of spots for which protein abundance increased (only 11 spots, corresponding to 11 different proteins), 100 spots, corresponding to >150 different proteins, decreased in intensity following partial cytosolic NME inhibition. Highly reproducible results in various biological replicates were obtained for 40 spots, corresponding to >60 different proteins (Figure 1A, red circles; see Supplemental Data Set 3 online). An interesting subclass of proteins, the accumulation of which was reduced by cNME inhibition, corresponded to the SnRK2.8 (for SNF1-related kinase) kinase group identified on the phosphoproteomic profile (Shin et al., 2007). These proteins included a non- ϵ 14-3-3-like protein, an adenosine kinase, and glyoxalase I. As these kinases regulate plant growth and development and we have recently shown that N-Myr, a cNME-dependent modification, regulates the SnRK pathway (Pierre et al., 2007), we checked whether (1) general phosphorylation and (2) SnRK1 activity were affected by the inhibition of cytoplasmic NME. Using Pro-Q Diamond staining to detect phosphorylated proteins on one-dimensional (1D) gels, we observed no significant change in the phosphoproteome of plants in which cytoplasmic NME was inhibited, at any development stage (see Supplemental Figure 1A online). Accordingly, no significant changes in SnRK1 enzyme activity were observed upon NME inhibition.

The most intriguing result of our proteomic characterization of cNME was the finding that a striking number of the modified spots corresponded to pools of thiol proteins (see Supplemental Table 1 and Supplemental Data Set 3 online), for which strong dependence on glutathione homeostasis and/or glutathionylation (i.e., the formation of protein-glutathione mixed disulfides) has already been demonstrated (Ito et al., 2003; Ball et al., 2004; Dixon et al., 2005). Interestingly, the phenotype of plants with inhibited cNME (Figure 2) was very similar to that of several mutants of γ -glutamyl-Cys synthetase. This protein is the first dedicated enzyme of the glutathione biosynthesis pathway (γ -ECS or GSH1). The phenotype induced by NME inhibition resembled those observed in the *root meristemless1* mutant line and in wild-type plants grown in the presence of L-buthionine-S-sulfoximine (BSO), a specific inhibitor of γ -ECS (Sanchez-Fernandez et al., 1997; Vernoux et al., 2000). From the similarities of phenotypes together with the proteomic analysis (see above), we hypothesized that the abnormal development induced by NME inhibition could be due to a deregulation of the glutathione pool.

Modulated Glutathione Status Is a Ubiquitous Feature Associated with cNME Inhibition

We tested the above hypothesis by supplementing the growth medium with the reduced form of glutathione, which is known to rescue the phenotype of GSH1 mutants (Cairns et al., 2006), or Cys, an amino acid precursor of glutathione, to determine whether these compounds could rescue the abnormal phenotype induced by low levels of cytoplasmic NME. The abnormal phenotype was complemented when the *map1A*+F mutant was grown in the presence of the reduced form of glutathione (GSH) or Cys (Figure 2A). This complementation was dependent on the GSH and Cys concentration, complete with 2 mM Cys or GSH and also observed when cNME was inhibited at later stages of development (Figure 2B). Full complementation, with reversion of the abnormal developmental phenotype induced by cNME inhibition, was also observed if homocysteine was added to the medium before germination. In contrast with our findings for Cys and GSH, no complementation was detected if homocysteine was supplied to established plants (Figure 2D).

We then performed various complementation experiments on plants with reduced cNME in the presence of BSO. Complementation was observed with GSH but not with its precursor, Cys (Figure 2C). Thus, complementation was primarily supported by GSH through its biosynthesis from free Cys and was independent of any direct interference from added thiols and Fumagillin. To explore whether the GSH molecule was the key element responsible for cNME complementation, we further assessed the effects of (1) the principal oxidized form of glutathione, GSSG; (2) another key redox buffer, ascorbate; (3) two general thiol reductants (2-mercaptoethanol and DTT); and (4) several intermediates of Cys and Met biosynthesis. With its limiting precursor Cys, GSH was the only factor, which we have identified so far to be able to completely cure the phenotype associated with the *map1A*+ line. Only the thiol reductants and cystathionine gave very partial complementation, which could correspond to complementation of one of the defects induced by cNME inactivation (i.e., the general effect on cellular redox status; Figure 2D). Finally, complementation experiments with GSH or Cys were also successful if a MAP2 inhibitor other than Fumagillin was used and with triple MAP RNA interference mutants displaying weak and intermediate developmental defects (*MAP1A2*, see phenotype shown in Figure 5E in Ross et al., 2005; see Supplemental Figure 2A online).

We then investigated whether the significance of the link between cNME inhibition and GSH pathway deregulation was restricted to the plant kingdom or whether it was of broader biological relevance. Interestingly, all archaeal members possess only one active MAP2, facilitating studies of the effects of MAP2 inhibitors, such as Fumagillin. Using the conditions recently established for assays of MAP activity in vitro (Frottin et al., 2006), we first checked that the archaeon MAP2 (*Pyrococcus furiosus*) was specifically inhibited by Fumagillin. An IC₅₀ value of 25 nM was obtained at concentrations of 50 nM MAP2, indicating stoichiometric binding. This result is consistent with the expected covalent binding of the drug to the enzyme target (i.e., IC₅₀ = [MAP2]/2). We then showed that micromolar amounts of the drug fully inhibited the growth of the archaeon *Haloflex*

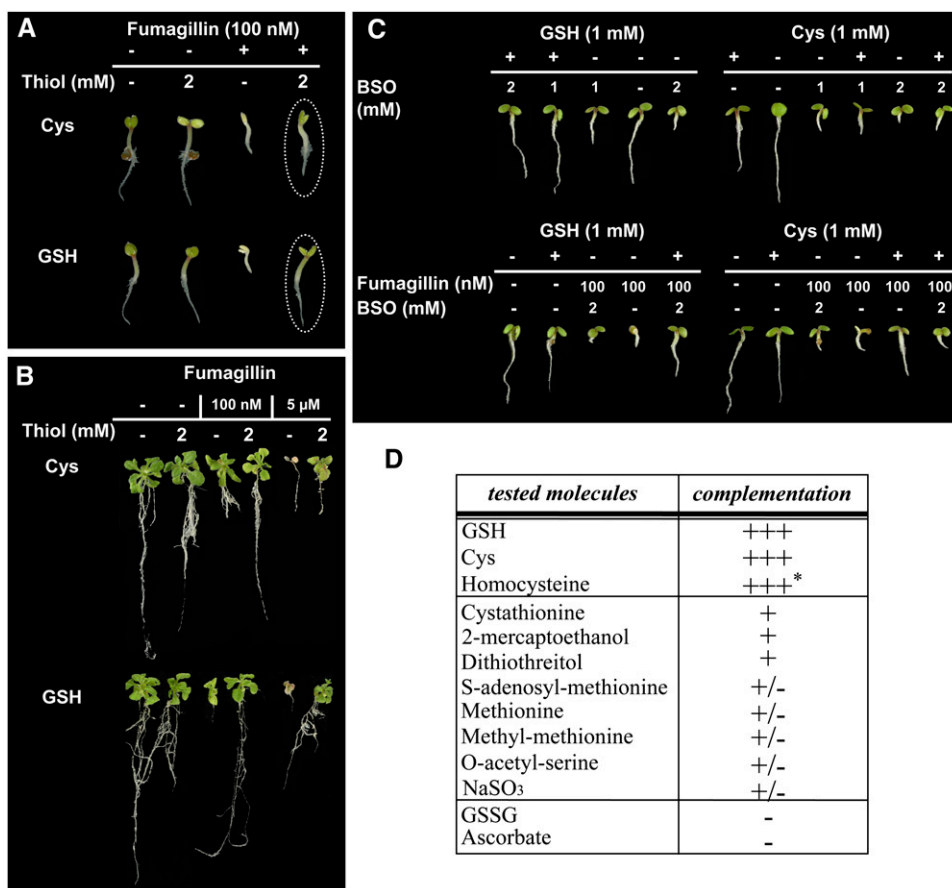


Figure 2. Rescue of the Developmental Defect Associated with cNME Inhibition in *Arabidopsis* with GSH and Cys.

(A) *map1A* line plantlets were vertically grown in the presence or absence of 100 nM Fumagillin and 2 mM of the indicated thiol compound. Dotted ovals show the complementation by Cys and GSH.

(B) *map1A* line plantlets were vertically grown without any additional compounds. At 8 DAI, plantlets were transferred onto fresh medium containing the indicated concentrations of Fumagillin and 2 mM of the indicated thiol compound.

(C) *map1A* line plantlets were vertically grown on medium containing GSH or Cys together with the GSH biosynthesis inhibitor BSO or Fumagillin and BSO, at the indicated concentrations.

(D) The table summarizes the effect the various molecules tested on the rescue of the developmental defect associated with cNME inhibition induced in *map1A* line plantlets in the presence of Fumagillin as in **(A)**. +++ indicates complementation similar to that obtained with GSH or Cys, + indicates very partial complementation, and - indicates no complementation. The asterisk indicates that complementation cannot be obtained with established plants.

[See online article for color version of this figure.]

volcanii, demonstrating the absolute requirement for cNME in archaea. We then performed complementation experiments with GSH or Cys in the growth medium. Increasing Fumagillin concentrations inhibited cell growth, and this inhibition was reversed by supplementation with Cys or GSH (Figures 3A and 3B). Low concentrations of Fumagillin had cytostatic effects, whereas high concentrations were cytotoxic to *H. volcanii*, as also observed with *Arabidopsis* (Figure 2B). Remarkably, the effects of Fumagillin on wild-type *Saccharomyces cerevisiae map1* and *map2* mutant lines were also very similar to those observed in *Arabidopsis* (Figures 3C and 3D). As previously described (Li and Chang, 1995; Griffith et al., 1997), the *map1* null strain ($\Delta map1$) grew more slowly and was more sensitive to Fumagillin than the wild-type and *map2*-null ($\Delta map2$) strains. Using the $\Delta map1$

variant, we showed that either Cys or GSH restored normal growth in Fumagillin-treated yeast.

How Does GSH Rescue the Abnormal Development Induced by cNME Inhibition in *Arabidopsis*?

The data shown in Figure 2 suggest that glutathione is not only a key molecule responsible for the abnormal phenotype induced by cNME inhibition but also that reversion is partially dependent on the redox state of glutathione. Indeed, thiol-reducing agents, such as 2-mercaptoethanol or DTT, also attenuated the phenotype induced by low-level cNME activity, albeit to a lesser extent than reduced GSH or Cys. We therefore investigated the thiol profiles in both backgrounds: wild-type plants and plants with

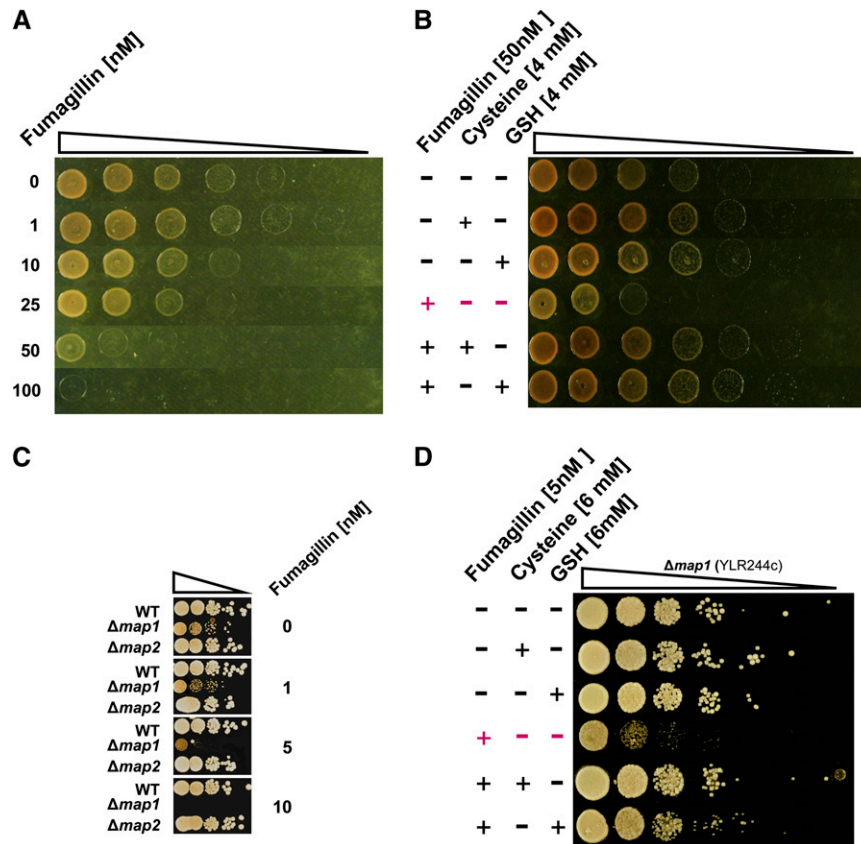


Figure 3. Ubiquitous Mechanism Induced by cNME Blockade as Evidenced by Characterization of the Fumagillin Effects on the Haloarchaeon *H. volcanii* and Several Yeast Mutants.

The triangles above each panel represent the use of serial dilutions by 10-fold of the strain considered.

(A) The wild-type strain haloarchaeon *H. volcanii* was spotted onto rich medium plates containing the indicated concentrations of Fumagillin.

(B) For complementation experiments, *H. volcanii* was cultured in the presence (+) or absence (–) of 50 nM Fumagillin and 4 mM Cys or 4 mM GSH.

(C) The effect of Fumagillin was investigated in the yeast *S. cerevisiae* with two KO mutants: $\Delta map1$ and $\Delta map2$. Wild-type and KO lines were spotted on rich medium containing a range of Fumagillin concentrations.

(D) Complementation experiments with the line expressing only MAP2 ($\Delta map1$) were performed on rich medium with or without 5 nM Fumagillin and supplemented with 6 mM Cys or 6 mM GSH.

[See online article for color version of this figure.]

reduced cNME. Unexpectedly, determinations of the amounts of the various thiol-containing metabolites (Figure 4A) revealed that 8-DAI plants with low levels of cNME activity exhibited higher levels of most thiol compounds, including Cys and glutathione. The increase observed for all the compounds analyzed in Figure 4A involved both the reduced and oxidized forms of the molecule.

We observed high levels of GSSG during the early stages of development (Figure 4B), as reported in other studies (Tommasi et al., 2001; Henmi et al., 2005). Interestingly, this significant increase in GSSG levels was observed in both the *map1A* background alone and in the same plants challenged with Fumagillin to inhibit cNME. This observation thus identifies the first marker unambiguously associated with *MAP1A* gene inactivation. However, Fumagillin treatment modulated the age-dependent pattern of GSSG accumulation. GSSG contents decreased between 3 and 8 DAI in the wild type and in untreated

map1A plants but remained high in *map1A* plants in which NME was further repressed by Fumagillin treatment (see *map1A*+F8 in Figure 4B). In this background, the GSSG levels remained constantly high throughout development.

Together with the partial complementation, by general reductants, of the phenotype produced by NME inhibition (Figure 2D), the relationship between NME inhibition, GSH, and GSSG contents suggests that one of the effectors in the system is the intracellular glutathione redox potential. This factor is determined by $[GSH]^2/[GSSG]$ and thus depends both on the GSH/GSSG ratio and the total glutathione concentration. In plants with reduced cNME, the redox potential of the glutathione system was kept high (i.e., more positive or less reducing) throughout seedling development (Figure 4C). By contrast, in wild-type plants and in the *map1A* mutants grown in the absence of Fumagillin, the GSH/GSSG ratio was low due to the presence of

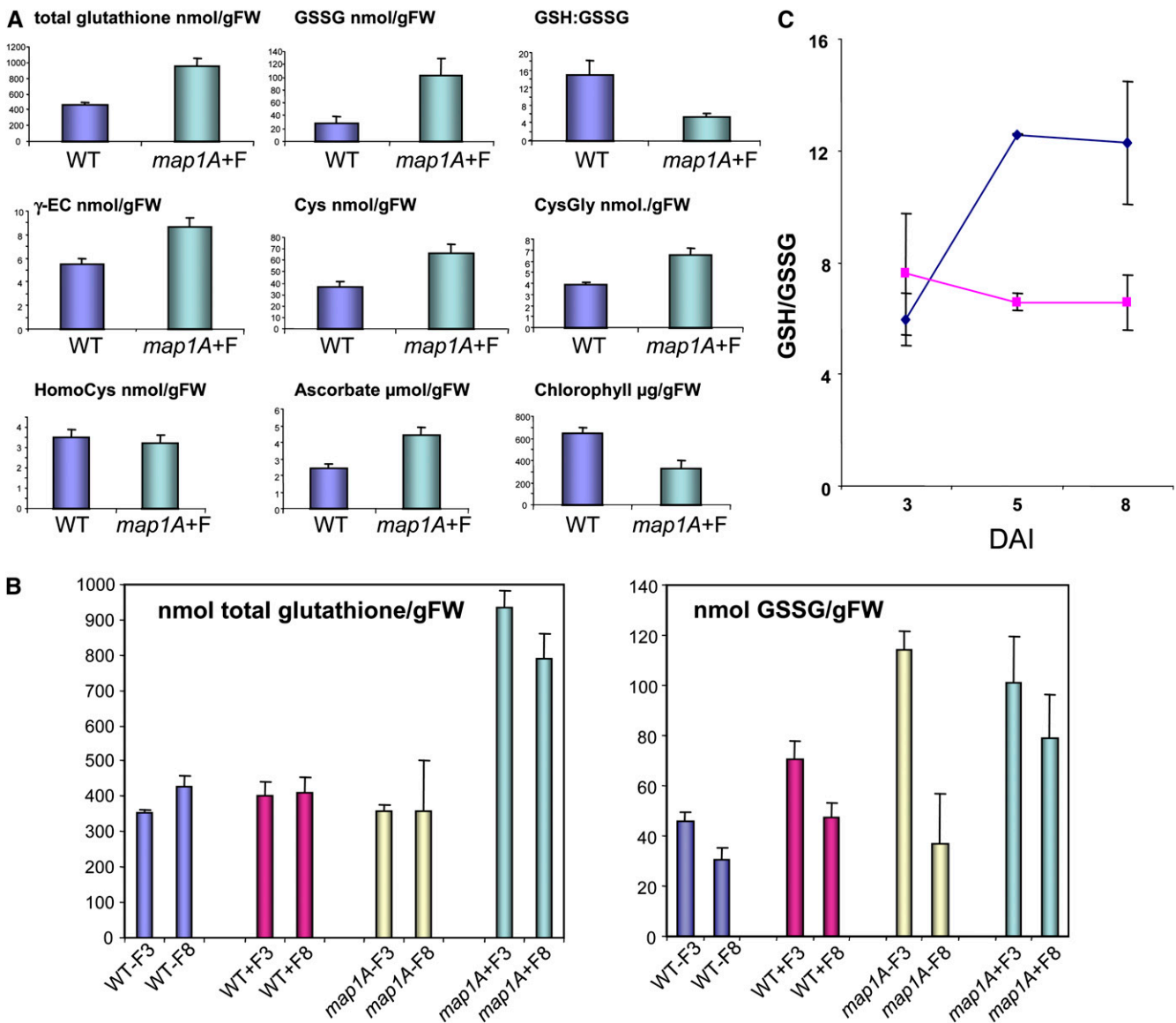


Figure 4. Glutathione Redox Potential Remains Constant during Development in *map1A+F* Lines and Lower Than That in Wild-Type Plants.

(A) Endogenous levels of the indicated thiols, ascorbate, and chlorophyll were measured in wild-type and *map1A+F* plantlets at 8 DAI as described in Methods. Thiol concentrations are expressed in nmol/g fresh weight (FW), ascorbate in μ mol/gFW, and chlorophyll in μ g/gFW.

(B) Endogenous levels of total glutathione and oxidized glutathione were analyzed at 3 or 8 DAI in both the wild type and *map1A* grown in the presence or absence of 100 nM Fumagillin.

(C) During early plant development, the GSH/GSSG ratio, which is proportional to the glutathione redox potential, was calculated as follows: (total glutathione – 2GSSG)/2GSSG. Blue dots indicate the mean GSH/GSSG ratio for the wild type, WT+F, and *map1A*; pink dots indicate the mean ratio for *map1A+F*.

[See online article for color version of this figure.]

large amounts of GSSG at early stages of seedling development. Greater reducing potential was then acquired during development (Figures 4B and 4C) as GSSG decreased, probably due to an increase in glutathione reductase activity (Henmi et al., 2005). Our data are consistent with previous studies showing remarkable changes in the content and redox balance of glutathione throughout development, particularly during germination

(Tommasi et al., 2001; Foyer and Noctor, 2005; Cairns et al., 2006) and complementation experiments in which supplementation with reduced glutathione, but not the oxidized form GSSG, rescued the abnormal phenotype associated with decreased NME. These observations suggest that NME inhibition prevents the adjustment of the glutathione redox potential to the reducing values required to promote correct development.

A Decreased Pool of NADPH Participates in Keeping the Level of GSSG Elevated When NME Is Inhibited

As the GSH/GSSG ratio is known to be altered by ROS production (Foyer and Noctor, 2005), we checked whether cNME inhibition induced generalized oxidative stress conditions. We controlled overall oxidative state by assessing protein carbonylation in crude plant homogenates. No global variation of carbonyl content during the first 8 d of development was detected between plants with reduced cNME and the wild type (see Supplemental Figure 1B online). We also measured the antioxidative enzyme activities of both catalase and ascorbate peroxidase, the two major H₂O₂ scavengers of leaves. The corresponding values remained unaffected in both backgrounds. Finally, our proteomic analysis was inconsistent with an oxidative stress because it revealed a reduced accumulation of proteins usually increased and abundant under oxidative stress conditions (see Supplemental Data Set 2 online and Chew et al., 2003; Foyer and Noctor, 2005). These data indicate that the effects of NME inhibition on glutathione are specific and do not result from the induction of generalized oxidative stress.

As GSSG is mostly recycled into GSH by glutathione reductase (GR), we investigated the expression of the two plant GR genes (the cytosolic GR1 gene and the plastid GR2 gene). We compared the total enzyme activity in plants with reduced cNME with that in the wild type (see Supplemental Figure 3 online). The data excluded the possibility that the high levels of GSSG induced by lower levels of cNME in the mutant were caused by compromised GR capacity, measured as extractable activity at optimal substrate concentrations. The activity of the enzyme is highly dependent on the presence of its cofactor, NADPH. As NADPH is added exogenously in experiments *in vitro*, extractable GR activities essentially reflect the concentration of the enzyme rather than its actual activity *in vivo*. In agreement with this, the *map1A*+F line did not exhibit insufficient GR amounts, as at 3 DAI both the mRNA and the protein levels were doubled compared with *in wild-type* conditions (see Supplemental Figure 3 online). In this context, it should be stressed that a GR1 knockout (KO) would not reproduce the *map1A*+F phenotype. Indeed, *gr1* KO mutants, which have no visible aberrant phenotype, show an increase of GSSG but only a minor increase in the total glutathione pool (Henmi et al., 2005; Marty et al., 2009). This is in agreement with our data on line *map1A* alone, for which we observe no visible phenotype, except an increase of GSSG in the very early development stages that was not accompanied by an increase in the total glutathione pool (Figure 4B). We tried to overproduce GR activity from the *GR1* gene. We hypothesized that, if NADPH cofactor was not limiting in the cell, the increase in GR activity would decrease the extent of the phenotype or increase resistance to Fumagillin. Unfortunately, our several attempts to increase GR concentration were not successful, most likely because of the tight regulation required for GR activity. Finally, it has recently been shown that GR1 activity could be compensated for by the NADPH-dependent thioredoxin system and that there is gene redundancy to regulate the glutathione redox state in a GR1 KO context (Marty et al., 2009).

We finally investigated whether the accumulation of GSSG resulted from a decrease in the *in vivo* availability of its cosub-

strate, NADPH, by determining the pyridine nucleotide contents (i.e., NADPH, NADH, NADP, and NAD) of total extracts from wild-type and NME-deficient plants at various stages of development (see Supplemental Figure 4 online). The measurement of the single pyridine nucleotides (total and ratios) shows that the NADH level was unchanged in any tested condition, unlike NADPH and to a lesser extent NADP, which causes reduction of the total pyridine pool and redox at very early stages. This analysis revealed that an early effect of NME inhibition was a decrease in NADPH levels below those in the wild type at 3 DAI. NADPH levels then remained constant throughout development in the *map1A*+F seedlings. Wild-type plants grown in the presence of 100 nM Fumagillin or *map1A* seedlings contained similar amounts of NADPH to the untreated wild type at the corresponding developmental stage but had a lower concentration of NADPH at later developmental stages, with smaller amounts of GSSG (Figure 5A). At later development stages (i.e., 8 DAI), the NADPH levels were comparable in both wild-type and NME-deficient plants (see Supplemental Figure 4 online; Figure 5A). Thus, given both the amount of GSSG present in the different conditions and the corresponding amounts of NADPH detected (Figures 4B and 5A; see Supplemental Figure 4 online), GR activity is probably limited by the small amount of NADPH available when NME is inhibited, causing an increase in GSSG levels and decrease in the reducing glutathione redox potential. This hypothesis was tested directly by supplementing the growth medium of plants of various backgrounds, including wild-type and cNME-deficient seedlings, with NADPH. Unambiguous and reproducible complementation was observed when the *map1A*+F mutants were treated with NADPH, but not with other pyridine nucleotides, at a concentration exceeding 5 mM (Figures 5B and 5C), and this complementation was particularly apparent for leaf development. Complementation by NADPH was less pronounced in the roots, but its effects may have been masked, as the NADPH concentrations required to complement NME inhibition also strongly inhibited the growth of both wild-type and *map1A* mutant roots grown in the absence of Fumagillin. Although GR has a high affinity for NADPH, decreases in NADPH/NADP⁺ ratios could nonetheless cause adjustments in the GSH/GSSG ratio. This interpretation is supported by our observations that the *map1A*+F phenotype can be complemented by GSH (which restores the glutathione redox balance directly) or by NADPH, which restores it through GSSG reduction.

Maintenance of a low level of NADPH in *map1A*+F mutants was supported by the proteomic analysis (see Supplemental Data Set 3 online), which revealed a strongly diminished pool of enzymes involved in the glycolytic and oxidative pentose phosphate pathway, two pathways that operate together to produce NADPH (Schwender et al., 2003).

Metabolic Profiling Reveals That cNME Inhibition Dramatically Increases the Free Amino Acid Pool

The data presented above suggest that NME inhibition leads to changes in enzyme profiles, resulting in the production of smaller amounts of NADPH, which could be considered to be one of the factors responsible for the maintenance of the elevated oxidized glutathione pool. Since elevated GSSG is not the major problem

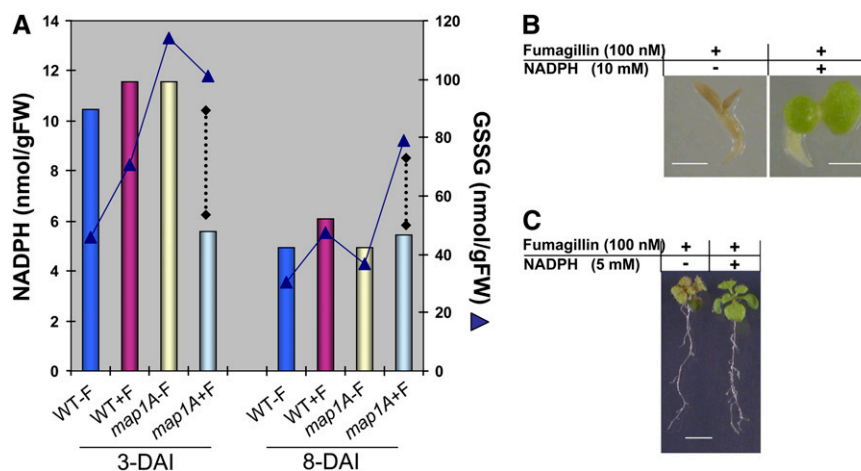


Figure 5. The Low Concentration of NADPH in *map1A+F* Plantlets Limits GR Activity.

(A) The total amount of NADPH was measured in wild-type and *map1A* plantlets grown in the presence or absence of 100 nM Fumagillin during early stages of development. The amount of NADPH was compared with that of GSSG detected in each set of conditions. Dotted lines accentuate the loss of correlation between NADPH and GSSG levels in the *map1A+F* mutant. SE has been reported in Figure 2 for GSSG and Supplemental Figure 3 online for NADPH.

(B) *map1A* line plantlets were grown in the presence of 100 nM Fumagillin and in the presence or absence of 10 mM NADPH. Bar = 1 mm.

(C) *map1A* line plantlets were grown for 8 DAI with no additional compounds and then transferred to new medium containing the indicated concentrations of Fumagillin and NADPH. Bar = 1 cm.

[See online article for color version of this figure.]

of *map1A+F* plants, we next investigated the way in which NME inhibition led also to an increase in total glutathione content (Figure 4B). We investigated whether Cys was the only amino acid for which concentration was induced by cNME inhibition or whether other amino acids were affected by performing HPLC profiling of amino acids in the two backgrounds at various developmental stages. Most amino acids were found to be present in larger amounts in the NME-inhibited background, and this trend became increasingly pronounced as development progressed (Figure 6A). At 8 DAI, when cNME was inhibited, the total free amino acid concentration was five times higher than that of the wild type. HPLC analyses were extended by nonspecific metabolic profiling based on gas chromatography-coupled time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS), which confirmed the observed increases in free amino acid levels (Figure 6B, asterisks). Surprisingly, the levels of enzymes involved in amino acid biosynthesis were not higher in the cNME-inhibited background. Instead, some of these enzymes, including both Gln synthetase and Cys synthase, were less abundant (Figure 1; see Supplemental Data Set 3 online). As proteins are the main reservoir of amino acids in the cell, this finding strongly indicated that the increase in free amino acids, including Cys, was probably linked to overall cellular proteolysis rather than to specific increases in amino acid biosynthesis.

We assessed overall proteolytic activity when cNME is inhibited using high-resolution denaturing 1D gel electrophoresis followed by MS/MS analysis and size-exclusion chromatography independently, to separate, compare, and characterize the pool of small proteins/peptides detectable in both backgrounds (i.e., wild-type and cNME inhibited). At 3 DAI, the *map1A+F* plants were significantly enriched in polypeptides of a molecular

mass of 4 to 6 kD (Figure 7A). MS/MS analysis of several of the species with the highest levels of accumulation showed that most (>80%) were the degradation products of proteins with significantly higher molecular masses (Figure 7B; see Supplemental Table 2 online). Similarly, at all stages, cNME inhibition resulted in larger numbers of peptide fragments with molecular masses ranging from 60 to 640 D (i.e., ~1 to 10 amino acids in length) (Figure 7C). Finally, we used a peptidase/protease assay to quantify accurately the widest range of protease activities. The inhibition of cNME induced no global change in protease activity (see Supplemental Figure 5 online). However, at later stages of cNME inhibition, a slight but significant induction of protease activities, such as those related to the proteasome, was observed (see Supplemental Figure 5 online). This suggests that proteasome activity may increase due to an increase in the abundance of target proteins.

In conclusion, our data support the idea that the increase in proteolytic activity associated with cNME inhibition is caused principally by an increase in the size of the pool of proteins available for rapid degradation. This degradation process probably involves the proteasome machinery.

DISCUSSION

Partial Retention of the N-Terminal Met of Cytosolic Proteins Increases General Cellular Proteolysis

The proteolytic process of NME was discovered several decades ago (Waller, 1963; Capecchi, 1966). Our current knowledge of this essential mechanism, particularly in higher eukaryotes, has

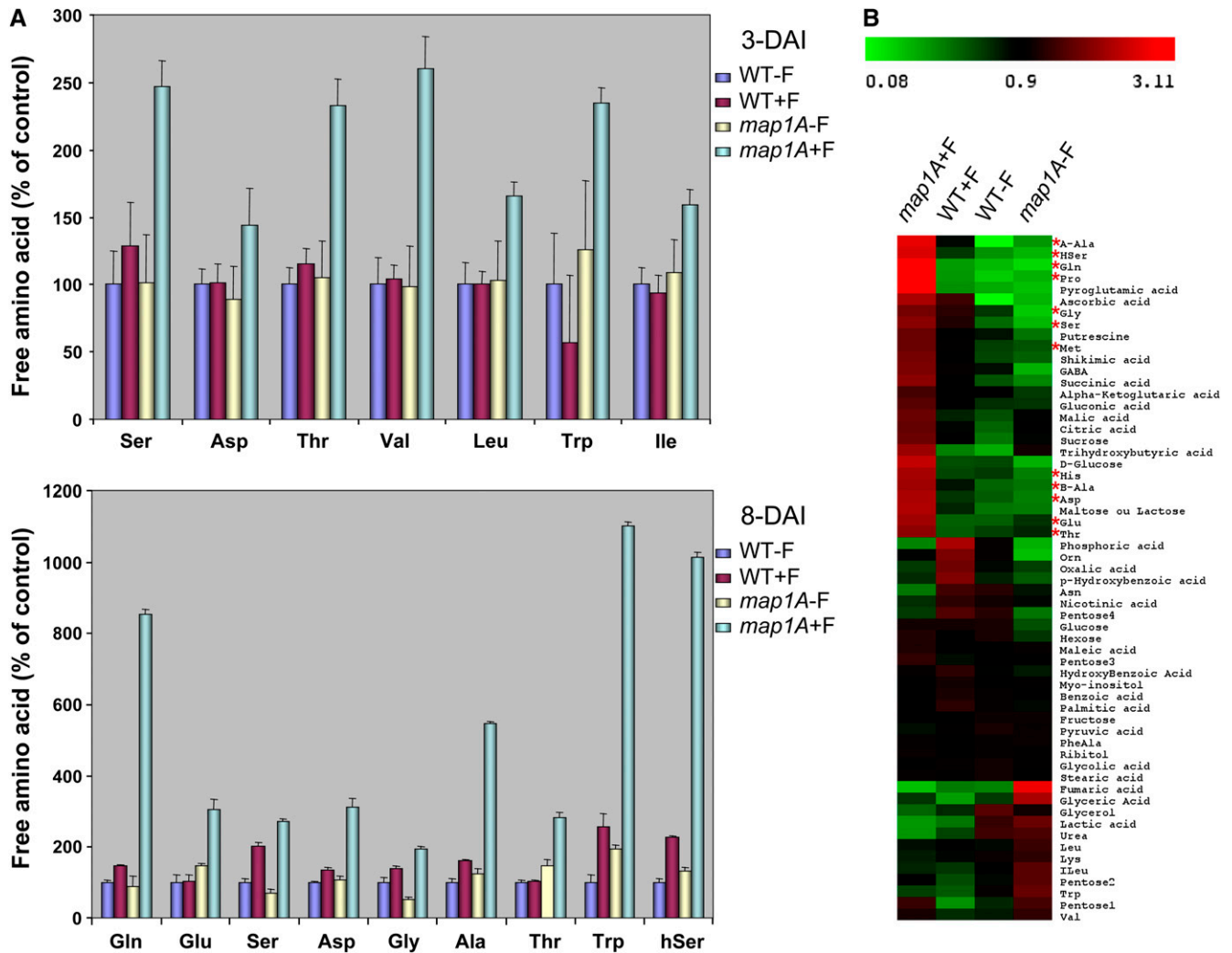


Figure 6. cNME Inhibition Dramatically Increases the Size of the Free Amino Acid Pool.

(A) All free amino acids were determined using two independent HPLC methods (see Methods) in all the conditions indicated in the figure (i.e., wild type, WT+F, *map1A+F*, *map1A*). Amino acid concentrations are expressed in nmol/g FW, with the values obtained for the wild-type plantlets taken as 100%. Only amino acids for which a significant difference in content was observed are reported.

(B) Global metabolic footprinting was performed for wild-type and *map1A* plantlets in the presence and absence of 100 nM Fumagillin at 8 DAI with the GC-TOF-MS system (see Methods). Red asterisks indicate the amino acids that accumulated in the *map1A+F* sample.

[See online article for color version of this figure.]

significantly advanced in recent years. This is probably because NME is recognized as an excellent therapeutic target, with several natural and synthetic inhibitors (Boularot et al., 2004). These inhibitors have considerable potential for use in the treatment of various human diseases, from cancer to bacterial and parasitic infections. The inhibition of NME causes cell cycle arrest in tumor cells (Yeh et al., 2000; Zhang et al., 2000), developmental defects (Boxem et al., 2004; Yeh et al., 2006), and early senescence in plants (Ross et al., 2005). Accordingly, recent data have also suggested that the expression of NME enzymes is tightly regulated throughout development, in response to abiotic stress and tumorigenesis (Selvakumar et al., 2006; Dill et al., 2009), suggesting that the fraction of proteins

undergoing NME may vary over space and time. Despite the demonstration that this process is essential in all organisms and its identification as a valuable target for the design of new antibacterial and anticancer agents, the molecular mechanism underlying the physiological requirement for NME function in living cells remains largely unknown.

The analysis presented here deals with the >15,000 nuclear-encoded proteins that are the substrates of NME in the cytosol. Our global study provides evidence that the *in vivo* inhibition of NME activity induces the retention of N-Met in proteins that normally undergo this process (see Supplemental Data Set 1 online), leading to an increase in the pool of proteins available for rapid degradation. Indeed, our proteomic, metabolic, and

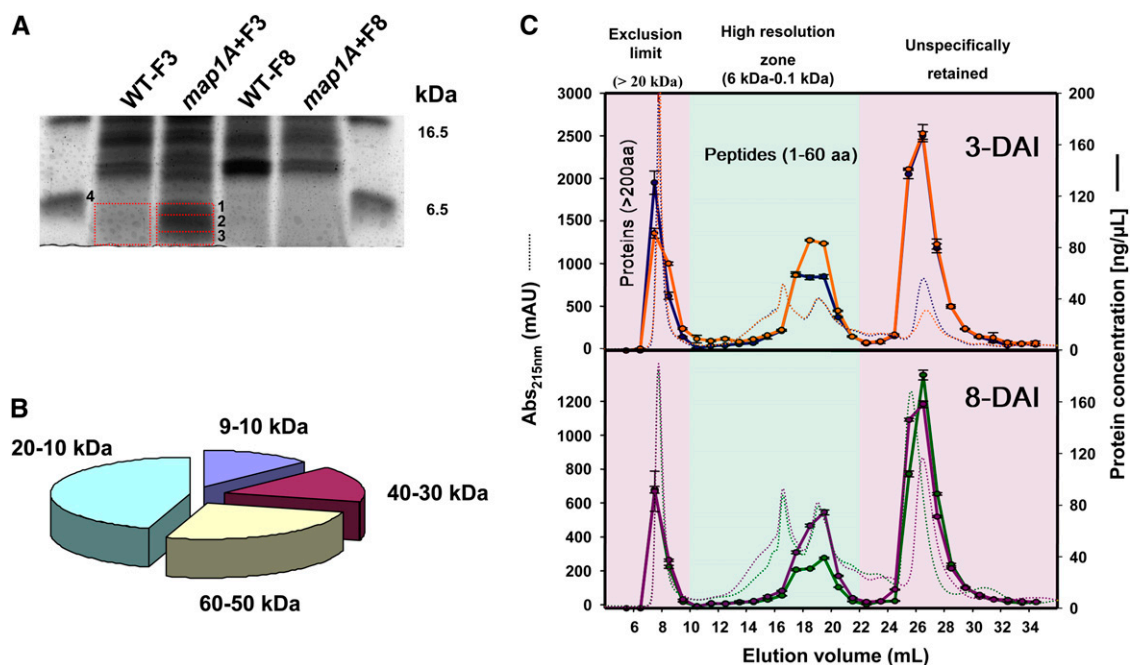


Figure 7. Dynamic Accumulation of Protein Degradation Products in the *map1A+F* Plantlets.

(A) The accumulation of low molecular mass peptides (<6 kD) in the *map1A+F* line was evidenced in 1D gel electrophoresis (16%), and the band annotations correspond to the identified proteins reported in Supplemental Table 5 online.

(B) The exploded pie chart displays the relative amounts of the peptides identified in spots 1 to 3 (Figure 6A) as a function of the calculated molecular weight of the corresponding protein (for protein identifications, see Supplemental Table 5 online).

(C) Gel filtration chromatography was performed with *map1A* + 100 nM Fumagillin (orange and purple) and the wild type (blue and green) at 3 DAI (top panel) and 8 DAI (bottom panel). Chromatograms at 215 nm are shown as dotted lines. The total elution volume was collected in 1-mL fractions, and peptides/small proteins were quantified in each fraction (solid line). The green zone defines the resolution volume efficiency of the column, the pink zone on the left depicts the size-exclusion limit (20 kD), and the pink zone on the right shows nonspecific components retained on the column.

[See online article for color version of this figure.]

peptide profiling studies highlight an increase in proteolysis in vivo directly associated with NME inhibition.

The Proteolysis Triggered by cNME Inhibition Illustrates the Importance of Both the Nature and Size of the Protein Substrate Pool for Regulating Protein Degradation Rates

Proteolysis plays a crucial role in many vital processes (Vierstra, 2003; Doucet et al., 2008). In each of these processes, proteolysis arbitrates protein lifespan, eliminates misfolded or damaged proteins, and maintains free amino acid pools. As expected for a fundamental process, proteolysis is tightly regulated, and the uncontrolled degradation of intracellular proteins has been systematically linked with major effects in many organisms (Marino et al., 2008; Mizushima et al., 2008; Taylor et al., 2008; van der Hoorn, 2008). Efforts have been made to characterize the upstream mechanisms operating in the control of proteolytic activities, but much less is known about the precise cascade of events following the deregulation of this process. Dynamic increases or decreases in protein degradation may be accomplished in many ways: by altering protease pools, modulating protease activity, and/or controlling protein turnover (Hanna and Finley, 2007; Kurepa and Smalle, 2008; Ravid and Hochstrasser,

2008; Yen et al., 2008). In various physiological processes and under changing environmental and physiopathological conditions, the transcriptional and posttranslational regulation of most proteases has been shown to be strong and highly structured (Montuori et al., 2002; Yan and Boyd, 2007; Kurepa and Smalle, 2008; Wladyka and Pustelny, 2008). For instance, a combination of gene expression analyses and proteasome suppression studies has unraveled the coordinated regulation of 26S proteasome genes during plant development (Kurepa and Smalle, 2008). Caspases, the major effectors of apoptosis, constitute a family of Asp-specific proteases normally synthesized as inactive precursors but activated at the onset of apoptosis after proteolytic cleavage (Logue and Martin, 2008). The calcium-dependent proteolytic system involves calpains, a group of Cys proteases. In addition to being regulated by calcium, calpain activity is tightly regulated by the specific endogenous inhibitor, calpastatin, and by binding to phospholipids, autoprotoleolysis, and phosphorylation (Dargelos et al., 2008).

Diverse protease activities were measured to obtain a general picture of changes in protease pools and protease activity (see Supplemental Figure 5 online). No significant differences were found between the wild type and the *map1A+F* mutant, consistent with the notion that the increase in proteolytic

activity associated with cNME inhibition resulted principally from an increase in the pool of proteins available for rapid degradation. Thus, cNME activity, by modifying the availability of several proteins for degradation by proteolytic systems, is an integral and fundamental element of the regulation of protein turnover.

Redox State of Glutathione and Proteolysis: Who's Controlling Who?

Hundreds of cell proteins, including many proteases, undergo reversible transitions between redox states. It is unclear whether redox-modified proteins/proteases have common redox controls and serve coordinate functions. The putative redox code integrating the metabolome, proteome, and genome remains largely undefined. By contrast, in complex biological mixtures, the redox state of a protein site is the net result of its many interactions with sulfur, metal, oxygen, and other redox factors. Cathepsin B is a model, redox-responsive, catabolic protein involved in turnover. The Cys/His pair within this protein acts simultaneously as a redox-responsive site and an inhibitory metal binding site and mediates a peptidolytic reaction mechanism. Mature cathepsin B can be inactivated by partitioning into multiple oxidation states. Cathepsin B can be reductively activated by GSH or disulfhydryl reductases and redox-buffered by GSH/GSSG. The interaction of the Cys/His site with iron provides a sensor, integrator, and effector switch coupling cathepsin B to metal-sulfuroxygen redox (Lockwood, 2005). It has also been shown that the proteasome is affected by oxidative stress to various degrees. Mild oxidation increases proteasomal degradation, whereas higher oxidant levels decrease proteasomal degradation. Moreover, the ATP-stimulated 26S proteasome is sensitive to oxidative stress, whereas the 20S form seems to be resistant (Breusing and Grune, 2008). As the downregulation of cNME generates a sustained low GSH/GSSG ratio, we checked whether this downregulation induced an oxidative stress that might affect proteolytic activity in *map1A+F* conditions. A slight increase in the production of intracellular reactive oxygen species was observed when human hepatoma cells were cultured with a high concentration of TNP470, a derivative of Fumagillin (Yoshida et al., 1998). However, we observed no difference in the accumulation of cellular proteins irreversibly oxidized during development between the wild type and *map1A+F*, both of which behaved as previously described in other model systems (Johansson et al., 2004). Thus, the low concentration of Fumagillin used in this study was insufficient to induce generalized cellular oxidation. Moreover, the lack of complementation of the *map1A+F* mutant phenotype under non-iron-limiting conditions also rules out the possibility that changes in intracellular glutathione levels reflect an adaptation of cells to iron stress (see Supplemental Figure 2B online). Finally, as cNME inhibition was always accompanied by a substantial increase in the total pool of amino acids, including the limiting precursors of glutathione, it is likely that also the increases in the levels of the reduced and oxidized forms of glutathione were reinforced by the increase in proteolytic activity. Accordingly, blocking the later step of glutathione biosynthesis with BSO prevented any complementation of the *map1A+F* mutant phenotype by amino acid precursors of the

tripeptide thiol. Although no more than 50% of all protein species are thought to be sensitive to cNME inhibition (i.e., those losing their N-Met), these proteins are known to be the most abundant proteins in the cell (i.e., accounting for 80% of cellular proteins) (Martinez et al., 2008). They include key enzymes involved in energy metabolism and redox homeostasis (Boucherie et al., 1996). In the *map1A+F* mutant, increased degradation of proteins within this group most likely explains why NADPH concentration is depleted consequently. Together with the overall increase in glutathione linked to an increase in the levels of free amino acids, including Cys, NADPH depletion would further favor accumulation of GSSG.

As glutathione is a major cellular antioxidant and thiol/disulfide buffer, it is of considerable importance for cellular redox homeostasis and for diverse fundamental cellular functions. Several lines of evidence suggest that changes in the redox state of glutathione regulate one or more phases in the cell cycle closely linked to cell differentiation and programmed cell death (Cai and Jones, 1998; Henmi et al., 2005). Consistent with this, our *in vivo* data highlight the importance of changes in glutathione redox state during plant development, and the results presented here reveal that the cellular glutathione redox network has evolved to be closely intertwined with the machinery of protein turnover controlled by the cNME process.

A Working Model Depicting the Essential Role of cNME in the Crosstalk between the Cellular Proteolytic Machinery and Glutathione Homeostasis

Our global comparative analysis pointed out that the cNME developmental defect was primarily due to the maintenance of the glutathione redox state at an inappropriately oxidized level throughout plant development. We showed that the abnormal development induced by insufficient cNME pathway activity was linked to both the presence of large amounts of glutathione and a lower GSH/GSSG ratio in the *map1A+F* mutants. Based on our results, this disturbance of glutathione levels seems to be caused by two effects of cNME inhibition acting in synergy. Comparative proteomic studies, peptide profile analysis, protease activities, and HPLC analysis of free amino acids strongly suggested that retention of the first Met residue increased cellular proteolytic activity by incrementing the size of the pool of proteins suitable for processing. The large increase in amino acid content, including all the constituent amino acids of glutathione (Glu, Cys, and Gly), detected when cNME was inhibited is a cellular marker of this situation. Thus, the concomitant increases in Glu, Cys, Gly, and glutathione concentrations are consistent with (though do not prove) activation of glutathione synthesis rates. Finally, the identification of otherwise stable proteins that become unstable when NME is inhibited and an analysis of GSH/GSSG ratios and NADPH provided evidence that the enzymes involved in the reductant generation are targeted for degradation, preventing the efficient reduction of GSSG to GSH. The crucial role of glutathione redox status as a redox stabilizer preventing the stimulation of proteolysis by NME inhibition is demonstrated by complementation of the developmental defect associated with cNME inhibition by reduced glutathione and the partial complementation of this defect observed with NADPH. Taken together,

our data demonstrate that cNME plays a key role in maintaining cellular glutathione content and redox state during development via a tight control of interconnected processes encompassing the proteolytic activity of the cell.

Our observations are consistent with a model in which, during rapid cell division, such as occurs in the early growth of plantlets after germination, cNME is an essential player in the dialogue between proteolytic activity and glutathione redox state that functions as part of a cellular checklist for continued development (Figure 8). It should be remembered that in the course of protein synthesis, the first Met residue of most accumulating proteins (~80%) is removed by cNME. The released Met residues join the cellular free Met pool, whereas the new nascent chain becomes part of the largest population of stable proteins. At steady state, a small but non-negligible percentage of proteins do not undergo N-Met excision (~20%). As a result, two distinct pools of Met polypeptide chains can be distinguished in the cell:

one half with an *N*- α -acetylated Met residue (these proteins join the pool of stable cellular proteins) and the other with free Met residue. This second group of proteins establishes a pool of highly unstable proteins, the degradation of which supplies amino acids, including Cys, the key precursor of GSH, to free amino acid pools. In the model shown in Figure 8, fine adjustments in cNME regulate glutathione homeostasis by modulating the pool of unstable proteins with an N-terminal free Met. Thus, cNME inhibition is likely to increase the pool of proteins with a free Met residue, probably because the *N*- α -acetylation of this residue is much less frequent than that of other residues, such as Ala or Ser, which are unmasked by the removal of Met. Indeed, N-terminal Ala or Ser residues are substrates of NatA, which cannot acylate N-terminal Met. The narrow substrate specificity of the other two Nat enzymes (NatB and NatC) cannot compensate for the increase in the amount of substrates with an N-terminal Met.

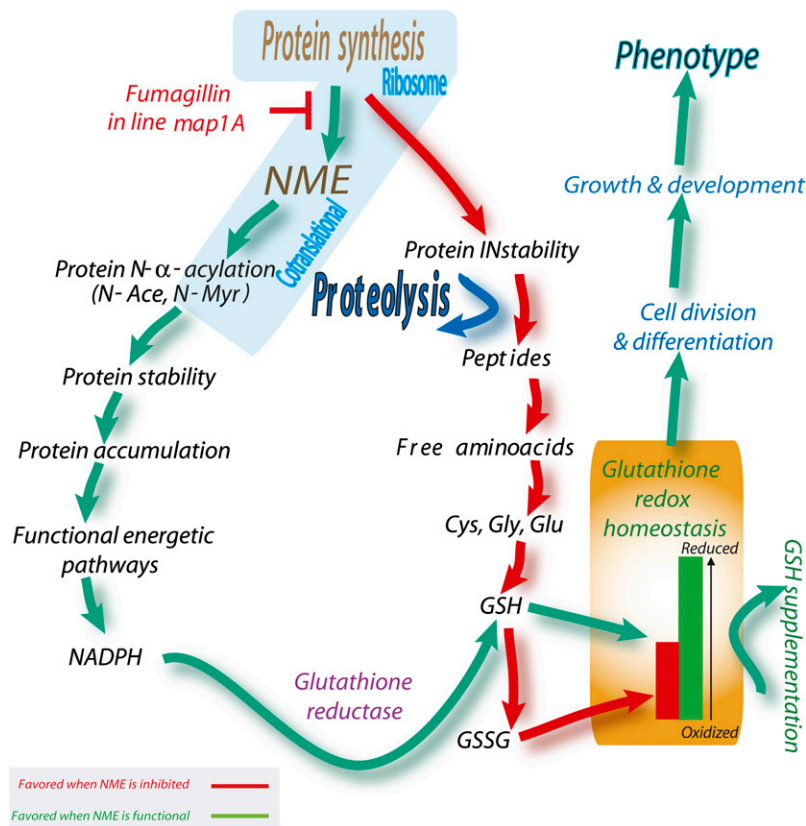


Figure 8. A Crucial Role for NME in the Glutathione-Proteolysis Crosstalk Necessary for Appropriate Growth and Development.

NME downregulation (red path) triggers an increase of cellular proteolytic activity by incrementing the size of the pool of proteins suitable for processing (Proteolysis). The large increase in amino acid content, including all precursors of glutathione (Glu, Cys, and Gly), detected when cNME was inhibited, is a cellular marker of this situation. Thus, the increase in Glu, Cys, and Gly concentrations probably drives glutathione synthesis rates up. Finally, the identification of otherwise stable proteins that become unstable when NME is inhibited and an analysis of GSH/GSSG ratios and NADPH provided evidence that the enzymes involved in reductive power generation are targeted for degradation, preventing the efficient reduction of GSSG to GSH. In cells undergoing appropriate development, this loop is broken by NME, which thus functions as a cycle interrupter (green path). As we have shown here, the loop can also be broken by establishing a more appropriate GSH/GSSG ratio (GSH supplementation). Glutathione reductase activity might correspond to GR1 and to the NADPH-dependent thioredoxin system, as recently proposed (Marty et al., 2009).

[See online article for color version of this figure.]

Conclusion

While important crosstalk between cNME and the NADPH-glutathione system has been demonstrated here, it cannot be ruled out that other crucial cellular regulatory mechanisms can be controlled by cNME. In our tightly controlled system in which everything is regulated to depict the earliest molecular mechanistic insight associated with the deregulation of the NME process, the perturbation of glutathione redox state was found to be the first limiting reversible step promoting the phenotype associated with *map1A*+F mutants. Thus, we suggest that the regulation of other mechanisms by NME will be influenced by the crucial crosstalk identified between NME, general proteolysis, and thiol status. We expect these new mechanisms will be described in the future, for instance, by studying the NME process and its deregulation in other specific conditions.

METHODS

All data presented are the means of two to four technical replicates for each of at least three biological replicates (i.e., at least six distinct measurements). All vertical bars in the figures indicate the SE.

Materials

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chimie. All compounds and inhibitors were dissolved in water, with the exception of Fumagillin, which was dissolved in methanol.

Plant Material and Growth Conditions

The material used was sampled from *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. The SALK_021985 (*map1A*) Salk T-DNA insertion line was obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (<http://nasc.nott.ac.uk>) as previously described (Ross et al., 2005). Seeds were sterilized and sown on 0.5× Murashige and Skoog (Sigma-Aldrich) medium supplemented with 0.8% agarose (Difco) and 1% sucrose (Sigma-Aldrich). Petri dishes were incubated in a growth chamber (22°C, 16 h of daylight; light intensity 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) for up to 2 weeks. Plant material samples were collected in 2-mL Eppendorf tubes, weighed, rapidly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C or in liquid nitrogen until protein or metabolite extractions. For the complementation experiments, *Arabidopsis* seeds or seedling were grown in plates containing the indicated molecules.

Yeast Strains, Growth Conditions, and Recovery Experiments

Experiments were performed with *Saccharomyces cerevisiae* wild-type, Δmap1 (BY4741; *MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 ; YLR244c::kanMX4), and Δmap2 (BY4741; *MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 ; YBL091c::kanMX4) strains from Euroscarf. This bank provided deletion strains in which the gene of interest was replaced by a KanMX module and a gene-specific tag. The deletion was confirmed by PCR, according to the procedure described and with the primers indicated on the *Saccharomyces* Genome Deletion Project website (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html). Yeast strains were usually propagated on rich medium (2% [w/v] peptone, 1% [w/v] yeast extract, and 2% [w/v] glucose) at 30°C. For recovery experiments, the phenotype was investigated on plates containing the indicated molecules by spotting 1:10 serial dilutions of exponential cultures and recording growth after 3 or 6 d of incubation at 30°C.**

Haloferax volcanii Growth Conditions

The *H. volcanii* wild-type (DS2) strain was grown at 45°C in a rich medium containing yeast extract (5.2 g/L final concentration), peptone (1 g/L), casamino acid (1 g/L), NaCl (2.46 M), MgCl_2 (88 mM), MgSO_4 (89 mM), KCl (54 mM), CaCl_2 (3 mM), Tris-HCl, pH 7.5 (12 mM), and KOH (2 mM). For rich solid medium, 15 g/L Bacto agar was added to the solution. Colonies were harvested from a fresh culture and resuspended in rich liquid medium and grown to an OD_{650} of 0.5 to 0.8. Then, 10 μL of a 10-fold serial dilution was spotted in triplicate onto plates containing rich medium supplemented with the indicated compound(s). Photographs were taken after 3 to 7 d of incubation.

Protein Extraction and Analysis

Plant tissues (10 to 400 mg) were frozen in liquid nitrogen and ground in a 2-mL microcentrifuge tube containing both 3 and 5 mm iron beads for 1 min each, using a MM 300 mixer mill at 30 Hz (Qiagen). The resulting fine powder was dissolved in 1 mL of lysis buffer as previously described (Espagne et al., 2007). The homogenates were incubated at 4°C for 20 to 45 min with shaking. The supernatants were separated from the insoluble fraction by centrifugation at 15,000g at 4°C for 0.5 to 1 h. The resulting supernatants were used to measure protein concentration by the Bradford protocol (Bio-Rad) and were stored at -80°C unless used immediately. Protein gel blotting was performed as previously described (Ross et al., 2005), and antibody against both GR1 and GR2 was provided by Agrisera. Before 2D electrophoresis analysis, samples were subjected to a modified TCA/acetone precipitation (Espagne et al., 2007). The precipitated pellets were resuspended in 50 μL of rehydration buffer E (8.75 M urea, 2.5 M thiourea, 1.25% [v/v] IPG buffer containing 0.5% ampholine, pH 4 to 7 [GE Healthcare Life Sciences], 0.25% Triton X-100, 2.5% CHAPS, and 25 mM DTT) and stored at -80°C until use.

2D Gel Electrophoresis

Protein concentration was determined using the 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences). Sample preparation and gel electrophoresis were essentially as described elsewhere (Espagne et al., 2007). The Ettan DALT System (GE-Healthcare Life Sciences) and 1-mm-thick SDS-denaturing polyacrylamide gels (11%) were used for the second dimension. Gels were run at 50 V for 1 h and 100 V for 16 h at 10°C using a cathodic solution (384 mM glycine, 25 mM Trizma base, and 0.2% [w/v] SDS) and an anodic solution (192 mM glycine, 25 mM Trizma base, and 0.15% [w/v] SDS). Gels were stained with colloidal Coomassie blue, and spots were excised for MS. The gels were scanned with a GS800 imaging densitometer (Bio-Rad) and analyzed with PD-Quest 7.1 software (Bio-Rad). Each analysis reported is the result of six replicates. Selected spots were picked with a sterile 1-mL Eppendorf tip. The complete data set is shown in Supplemental Table 1 online.

LC-MS and Protein Identification

The 2D gel spots were picked, digested, and analyzed essentially as described elsewhere (Espagne et al., 2007) and as follows. In-gel digestion was performed with the Progest system (Genomic Solution) using a standard trypsin protocol. Gel pieces were washed twice in 10% acetic acid, 40% ethanol, and acetonitrile (ACN) (in two separate baths). They were then washed twice in 25 mM NH_4CO_3 and ACN (again, two separate baths). Digestion was then performed for 6 h at 37°C with 125 ng of modified trypsin (Promega) dissolved in 20% methanol and 20 mM NH_4CO_3 . The peptides were extracted with 2% trifluoroacetic acid (TFA) and 50% ACN and then with pure ACN alone. Peptide extracts were dried in a vacuum centrifuge, and the resulting powder was suspended in 20 μL

of 0.05% TFA, 0.05% HCOOH, and 2% ACN. HPLC was performed on an Ultimate LC system combined with a Famos autosampler and a Switchos II microcolumn switch system (Dionex). The sample (4 μL) was loaded at a flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}^{-1}$ onto precolumn cartridge (stationary phase: C18 PepMap 100, 5 μm ; column: 300 μm i.d., 5 mm; Dionex) and desalted with 0.05% TFA, 0.05% HCOOH, and 2% ACN. After 2.5 min, the precolumn cartridge was connected to the separating PepMap C18 column (stationary phase: C18 PepMap 100, 3 μm ; column: 75 μm i.d., 150 mm; Dionex). The buffers used were 0.1% acetic acid (HCOOH), 3% ACN (buffer A), and 0.1% HCOOH, 95% ACN (buffer B). Peptides were separated using a linear gradient from 5 to 30% B for 25 min at 200 nL/min⁻¹. A single run took 45 min, including the regeneration step in 100% buffer B and the equilibration step in 100% buffer A. Eluted peptides were analyzed online with a LCQ Deca XP⁺ ion trap (Thermo Electron), using a nanoelectrospray interface. Ionization (1.2 to 1.5 kV ionization potential) was achieved with a liquid junction and an uncoated capillary probe (10 mm i.d.; New Objective). Peptide ions were analyzed with Xcalibur 1.4, with the following data-dependent acquisition steps: (1) full MS scan (mass-to-charge ratio [m/z] 400 to 1900, centroid mode), (2) ZoomScan on a selected precursor (scan at high resolution in profile mode over an m/z window of 4), and (3) MS/MS ($qz = 0.22$, activation time = 50 ms, and collision energy = 40%; centroid mode). Steps 2 and 3 were repeated for the two major ions detected in step 1. Dynamic exclusion was set to 30 s. A database search was performed with Bioworks 3.2 (Thermo Electron). We looked for trypsin digestion (enzymatic cleavage), Cys carboxyamidomethylation (static), and Met oxidation (possible modifications). Precursor mass and fragment mass tolerance were 1.4 and 1 D, respectively. The *Arabidopsis* protein database (30,692 entries, 08/11/2005 update) from The Arabidopsis Information Resource (<http://www.Arabidopsis.org/>) was used. The tryptic peptides identified were filtered according to (1) cross-correlation score (X_{corr}) >1.7, 2.2, and 3.3 for peptides with one, two, and three charges, respectively, and (2) a probability of <0.05. At least two different peptides were required. In cases of identification with only two or three MS/MS spectra, similarity between the experimental and theoretical MS/MS spectra was confirmed by eye.

For the identification of small polypeptides separated by 1D gels, the eluted peptides were analyzed online with a LTQ XL ion trap (Thermo Electron) using a nanoelectrospray interface. Ionization (1.5 kV ionization potential) was performed with a liquid junction and a noncoated capillary probe (10 μm i.d.; New Objective). Peptide ions were analyzed using Xcalibur 2.07 and the following data-dependent acquisition steps: (1) full MS scan (m/z 400 to 1900, centroid mode), (2) ZoomScan on a selected precursor (scan at high resolution in profile mode on a m/z window of 4), and (3) MS/MS ($qz = 0.25$, activation time = 30 ms, and collision energy = 35%; centroid mode). Steps 2 and 3 were repeated for the two major ions detected in step 1. Dynamic exclusion was set to 30 s. A database search was performed with XTandem 2008.02.01 (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>). Enzymatic cleavage was declared as a trypsin digestion with one possible miscleavage event. Cys carboxyamidomethylation and Met oxidation were set to static and possible modifications, respectively. Precursor mass and fragment mass tolerance were 2.0 and 0.8 D, respectively. A refinement search was added with similar parameters except that semitryptic peptide and possible N-terminal protein acetylation was sought. The *Arabidopsis* protein database (32,825 entries, version 8) from The Arabidopsis Information Resource (<http://www.Arabidopsis.org/>) and a contaminant database (trypsin, keratins, etc.) were used. Only peptides with an E value below 0.1 are reported. Identified proteins were filtered according to the following specifications: (1) at least two different peptides with an E value below 0.05 and (2) a protein E value below 10^{-4} . In the case of identification on the basis of only two or three MS/MS spectra, similarity between the experimental and the theoretical MS/MS spectra was visually checked.

Amino Acid Analysis

Arabidopsis plantlets were grown as described above. For HPLC analyses, young plants were harvested at 3 and 8 DAI. Frozen plants were ground with a pestle in a mortar with liquid nitrogen to obtain a fine powder. Two different methods were used to analyze and confirm amino acid content. For the first method, the powder was further homogenized with 1 mL of 20 mM HCl. Plantlet extracts were centrifuged at 14,000g for 10 min at 4°C. Ten microliters of the supernatant was used for amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate, using an AccQ-Fluor Reagent Kit (Waters). Derivatization was performed according to Waters' recommendation and 10 μL was injected onto the column. HPLC was performed with a Waters model 2695 separation module. Separations were performed on a 3.9 \times 150-mm Waters Nova-Pak C₁₈ column equipped with a Nova-Pak C₁₈ Guard-Pak insert. Eluted amino acid derivatives were detected using a Waters model 2475 multi λ fluorescence detector with an excitation wavelength of 250 nm and a detection wavelength of 395 nm. Eluent A was 140 mM sodium acetate and 6.9 mM triethylamine at pH 5.05; eluent B was acetonitrile:water (60:40). The elution protocol was 0 to 0.5 min, 100% A; 0.5 to 5 min, linear gradient to 5% B; 5 to 35 min, linear gradient to 7.5% B; 35 to 41 min, linear gradient to 10% B; 41 to 44 min, 10% B; 44 to 54 min, linear gradient to 20% B; 54 to 61 min, 20% B; 61 to 71 min, linear gradient to 30% B; 71 to 86 min, linear gradient to 100% B as previously described (Kim et al., 2002). The flow rate was 1.0 mL/min. All standard solutions of amino acids (Sigma-Aldrich Chimie) were dissolved in and diluted with 20 mM HCl and analyzed at different concentrations to calculate a detector response factor. The second methods used for amino acid content determination involved GC-TOF-MS technology and derivatization with methoxyamine and *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide as previously described (Noctor et al., 2007).

Separation and Quantification of Peptides

One hundred milligrams of plantlets samples were mechanically crushed in liquid nitrogen, and proteins were extracted with 1 mL of protein extraction buffer as described above. After incubation and centrifugation at 4°C, the supernatant was recovered and 50 μL was separated by fast protein liquid chromatography (AKTA Explorer 10S; GE Healthcare) on a gel filtration column optimized for peptides analysis (Superdex peptide 10/300 GL; GE Healthcare). Elution was performed with a buffer at pH 7.0 containing 50 mM sodium phosphate and 150 mM NaCl at a flow rate of 0.5 mL/min⁻¹ and recorded at 215 nm. Then, 1-mL fractions were collected and the peptide content of each fraction was quantified using the LavaPep Peptide and Protein Assay Kit (FluoProbes; Interchim) according to the procedure provided by the manufacturer. Fluorescence (excitation 540 nm; emission 630 nm) was recorded by a fluorescence microplate reader (Infinite M200; Tecan), and the peptide concentration was deduced from a standard curve. Each measurement is the average of three independent biological replicates each assessed twice.

Analysis of Small Metabolites

Analysis of small metabolic compounds was as previously described (Queval and Noctor, 2007). Oxidized and reduced forms of glutathione, ascorbate, and NADP(+) were quantified in HCl extracts. NADH and NADPH were quantified in alkaline extracts using spectrophotometric cycling assays. Thiol analyses were validated by HPLC after a derivatization with monobromobimane as described (Queval and Noctor, 2007). GC-TOF-MS was performed as described elsewhere (Noctor et al., 2007).

Staining of Specific Protein Modifications

To detect the phosphorylated proteins, 1D gels were stained with ProQ-Diamond Phosphoprotein (Molecular Probes). Gels were stained

according to the manufacturer's protocol. Carbonylated proteins were detected with the chemical and immunological reagents of the OxyBlot Oxidized Protein Detection Kit (Chemicon). The carbonyl groups in the protein side chains were derivatized to 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNP) by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). The chemiluminescence blotting substrate (ECLplus) was obtained from GE Healthcare Life Sciences and used according to the instructions provided by the manufacturer. Immobilon-P polyvinylidene difluoride membrane was from GE Healthcare Life Sciences. As described above, crude protein extracts were obtained at various developmental stages, the extracts were reacted with the carbonyl reagent, DNPH, dot-blotted onto polyvinylidene difluoride membranes, and oxidatively modified proteins were detected with anti-DNP antibodies. In general, 10 to 15 μg of protein were loaded into the slot-blot apparatus.

Antioxidant Enzyme Activity Measurements

Plantlet material (100 mg) was ground in liquid nitrogen, 100 mg insoluble polyvinylpyrrolidone was added, and the powder was extracted into 1.5 mL 0.1 M NaH_2PO_4 , pH 7.5, and 1 mM EDTA. Samples were taken for chlorophyll analysis and the remainder of the extract was centrifuged for 10 min. An aliquot of the supernatant was loaded onto NAP-5 columns and the desalted eluant used for enzyme assays. Catalase was assayed as previously described (Veljovic-Jovanovic et al., 2001). Protein was assayed using the Bio-Rad kit. Chlorophyll was measured in 80% acetone at 663 and 645 nm. GR activity was determined by monitoring the oxidation of NADPH at 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) as described by Donahue et al. (1997). Ascorbate peroxidase activity was determined by monitoring the oxidation of ascorbate at 290 nm ($\epsilon = 2.88 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) as described elsewhere (Dutilleul et al., 2003).

Endoproteolytic Activities

Endoproteolytic activities were investigated using the EnzChek peptidase/protease assay kit (Invitrogen). Proteins were obtained using the extraction buffer described above without EDTA, PMSF, and protease cocktail inhibitors. After cell breaking and 30 min incubation at 4°C with extraction buffer, crude extracts were collected by centrifugation. One microliter was used in the test. The final volume was 100 μL with 90 μL of the manufacturer's buffer, 4 μL water, and 5 μL of the substrate solution. Time-course fluorescence intensity studies of the product released were performed with a Tecan Infinite M200 microplate fluorescence reader (excitation wavelength 490 nm and emission 520 nm). Slopes were determined during the first 20 min. Results were normalized for 1 μg of proteins in crude extract.

Proteasome Assay

Protein extracts were obtained using the procedure as described above. The extraction buffer contained no EDTA, PMSF, or protease cocktail inhibitor. Protein quantification was performed using the Bradford principle (Bio-Rad) with BSA as the standard. Proteasome assays were performed with the commercially available 20S Proteasome Activity Assay Kit (Chemicon International) and the fluorogenic substrates pack provided by Biomol. Suc-LLVY-AMC, Boc-LRR-AMC, or Z-LLE-AMC was used for assays of the chymotrypsin-like, trypsin-like, and caspase-like activity, respectively. Proteasome assays were performed at 37°C in 100- μL reaction volume containing 50 μM fluorogenic substrate and protein sample. The same amount of protein was used in each test (10 μg for 3-DAI samples and 15 μg for 8-DAI samples). Fluorescence intensity ($\lambda_{\text{ex.}} = 380 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em.}} = 460 \text{ nm}$) was monitored with a Tecan Infinite microplate fluorescence reader for 2 h, with measurements taken every 3 min. Initial velocities were determined from the first linear part of the curves, and data were normalized per μg proteins. Specific activity, in

pmol/min/ μg of protein, was obtained with AMC standard curve. Statistical analysis was performed with R software (<http://cran.cict.fr/>).

Real-Time Quantitative RT-PCR

Total RNA extraction was performed from *Arabidopsis* tissues as previously described (Kay et al., 1987). Poly(A)⁺ RNA were purified using oligo (dT) 25 Dynabeads (Dyna). mRNA (200 ng) was reverse-transcribed and the obtained cDNA was then diluted 20 times. The PCR amplification was performed using the following specific oligonucleotides: for the cytosolic glutathione reductase (GR1; At3g24170), 5'-TGGATTAAGCCTGAGGTGAAGACCAGAAT-3' and 5'-CAGCAATGTCGCCTGTGCTGATTTT-GCA-3'; for the chloroplastic glutathione reductase (GR2; At3g54660), 5'-GCCCTCATAGTGACAACTCCTCAGCT-3' and 5'-GGGGATGTTAC-TGACCGAATCAATTTGACT-3'. Real-time PCR mix was optimized with the LightCycler Faststart DNA Master SYBER Green Kit (Roche) for each primer pair using a standard cDNA. After the initial activation step (95°C, 10 min), amplification and quantification were performed as follows: denaturation for 5 s at 95°C, annealing for 5 s at 60°C, and extension for 10 s (for GR1 and GR2) or 20 s (for EF1 α) at 72°C. The absence of nonspecific products was checked by melting curve analysis (95°C, 5 s and 60°C, 15 s, 95°C, heating rate 0.1°C/s). Each cDNA sample was quantified at least twice, using as reference a standard cDNA, studied in the same conditions. All experiments were performed with a LightCycler (Roche) and the data were processed with the LightCycler quantitative software 1.0 (Roche).

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL databases under the following accession numbers: MAP2A (At2g44180), MAP2B (At3g59990), MAP1A (At2g45240), the cytosolic MAPs; At3g24170, the cytosolic GR1 gene; and At3g54660, the plastid GR2 gene.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. cNME Inhibition Does Not Modify the Phosphoproteome or Protein Oxidation Levels.

Supplemental Figure 2. Rescue of the Defect Associated with cNME Inhibition in dsRNA Interference *Arabidopsis* Lines with Cys and Impact of Iron Cations on Growth.

Supplemental Figure 3. The High Level of GSSG in cNME-Deficient Plants Is Not Due to a Decrease in Glutathione Reductase Concentration.

Supplemental Figure 4. cNME Inhibition Rapidly Induces a Decrease in NADPH Nucleotide Levels.

Supplemental Figure 5. NME Perturbation Induced a Slight Adjustment of Proteolytic Activities.

Supplemental Table 1. Identities of Protein Spots with a Higher Intensity in NME-Inhibited Conditions.

Supplemental Table 2. Low Molecular Weight Proteins Are More Abundant in *map1A*+F 3 DAI Than in the Equivalent Fractions from the Wild Type.

Supplemental Data Set 1. A Complete List of the 441 Analyzed Spots (Giving a Total of 821 Expressed Protein Identifications) for Wild-Type and *map1A*+F Plantlets at 8 DAI.

Supplemental Data Set 2. Mass Spectrometry-Based Analysis of the Identified N Termini from Supplemental Table 1.

Supplemental Data Set 3. Identities of Protein Spots with a Lower Intensity in NME-Inhibited Conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

F.F. was supported by a PhD grant from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENRT) as part of Ecole Doctorale ED145 (Université Paris-Sud). We thank H. Millikallio (IGM, Orsay, France) and Guillaume Queval (IBP, Orsay, France) for technical advice and E. Espagne (IGM), D. Libri (CGM, Gif/Yvette, France), Z. Adam (Rehovot, Israel), and C. Foyer for critical reading of the manuscript. We also thank B. Franzetti (IBS, Grenoble, France) for providing *H. volcanii* wild-type strain and M. Toledano (CEA, Gif/Yvette, France) for providing the *S. cerevisiae* strains and helpful comments. This work was supported by Grant PGP04-11 from Centre National de la Recherche Scientifique, Grant BCMS-275 (MENRT, France), by Projets transversaux Institut Fédératif 87, and by Grants 3603 and 4920 from the Association pour la Recherche sur le Cancer (Villejuif, France).

Received July 1, 2009; revised September 17, 2009; accepted October 5, 2009; published October 23, 2009.

REFERENCES

- Ball, L., Accotto, G.P., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A., Kular, B., Leyland, N., Mejia-Carranza, J., Reynolds, H., Karpinski, S., and Mullineaux, P.M. (2004). Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2448–2462.
- Bhatnagar, R.S., Ashrafi, K., Futterer, K., Waksman, G., and Gordon, J.I. (2001). Biology and enzymology of protein N-myristoylation. In *The Enzymes*, F. Tamanoi and D.S. Sigman, eds (San Diego, CA: Academic Press), pp. 241–286.
- Boucherie, H., Saggiocco, F., Joubert, R., Maillet, I., Labarre, J., and Perrot, M. (1996). Two-dimensional gel protein database of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis* **17**: 1683–1699.
- Boularot, A., Giglione, C., Artaud, I., and Meinnel, T. (2004). Structure-activity relationship and therapeutic potential of peptide deformylase inhibitors. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **5**: 809–822.
- Boxem, M., Tsai, C.W., Zhang, Y., Saito, R.M., and Liu, J.O. (2004). The *C. elegans* methionine aminopeptidase 2 analog map-2 is required for germ cell proliferation. *FEBS Lett.* **576**: 245–250.
- Breusing, N., and Grune, T. (2008). Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. *Biol. Chem.* **389**: 203–209.
- Cai, J., and Jones, D.P. (1998). Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J. Biol. Chem.* **273**: 11401–11404.
- Cairns, N.G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C.S., and Meyer, A.J. (2006). Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol.* **141**: 446–455.
- Capecchi, M.R. (1966). Initiation of *E. coli* proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**: 1517–1524.
- Chew, O., Whelan, J., and Millar, A.H. (2003). Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J. Biol. Chem.* **278**: 46869–46877.
- Cleary, M.D., Singh, U., Blader, I.J., Brewer, J.L., and Boothroyd, J.C. (2002). *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryot. Cell* **1**: 329–340.
- Dargelos, E., Poussard, S., Brule, C., Daury, L., and Cottin, P. (2008). Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie* **90**: 359–368.
- Dasgupta, B., Yi, Y., Hegedus, B., Weber, J.D., and Gutmann, D.H. (2005). Cerebrospinal fluid proteomic analysis reveals dysregulation of methionine aminopeptidase-2 expression in human and mouse neurofibromatosis 1-associated glioma. *Cancer Res.* **65**: 9843–9850.
- Dill, B.D., Dessus-Babus, S., and Raulston, J.E. (2009). Identification of iron-responsive proteins expressed by *Chlamydia trachomatis* reticulate bodies during intracellular growth. *Microbiology* **155**: 210–219.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Grundy, N.M., and Edwards, R. (2005). Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **138**: 2233–2244.
- Donahue, J.L., Okpodu, C.M., Cramer, C.L., Grabau, E.A., and Alscher, R.G. (1997). Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves (relationships to resistance). *Plant Physiol.* **113**: 249–257.
- Doucet, A., Butler, G.S., Rodriguez, D., Prudova, A., and Overall, C.M. (2008). Metadegradomics: Toward in vivo quantitative degradomics of proteolytic post-translational modifications of the cancer proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **7**: 1925–1951.
- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chetrit, P., Foyer, C.H., and de Paepe, R. (2003). Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell* **15**: 1212–1226.
- Endo, H., Takenaga, K., Kanno, T., Satoh, H., and Mori, S. (2002). Methionine aminopeptidase 2 is a new target for the metastasis-associated protein, S100A4. *J. Biol. Chem.* **277**: 26396–26402.
- Espagne, C., Martinez, A., Valot, B., Meinnel, T., and Giglione, C. (2007). Alternative and effective proteomic analysis in *Arabidopsis*. *Proteomics* **7**: 3788–3799.
- Florens, L., et al. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* **419**: 520–526.
- Foyer, C.H., and Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866–1875.
- Frottin, F., Martinez, A., Peynot, P., Mitra, S., Holz, R.C., Giglione, C., and Meinnel, T. (2006). The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mol. Cell. Proteomics* **5**: 2336–2349.
- Giglione, C., Boularot, A., and Meinnel, T. (2004). Protein N-terminal methionine excision. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**: 1455–1474.
- Giglione, C., Fioulaine, S., and Meinnel, T. (2009). Cotranslational processing mechanisms: Towards a dynamic 3D model. *Trends Biochem. Sci.* **34**: 417–426.
- Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**: 895–899.
- Griffith, E.C., Su, Z., Turk, B.E., Chen, S., Chang, Y.-H., Wu, Z., Biemann, K., and Liu, J. (1997). Methionine aminopeptidase (type 2) is the common target for angiogenesis AGM-1470 and ovalicin. *Chem. Biol.* **4**: 461–471.
- Hanna, J., and Finley, D. (2007). A proteasome for all occasions. *FEBS Lett.* **581**: 2854–2861.
- Henmi, K., Demura, T., Tsuboi, S., Fukuda, H., Iwabuchi, M., and Ogawa, K. (2005). Change in the redox state of glutathione regulates differentiation of tracheary elements in *Zinnia* cells and *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1757–1765.
- Ito, H., Iwabuchi, M., and Ogawa, K. (2003). The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: Detection using biotinylated glutathione. *Plant Cell Physiol.* **44**: 655–660.

- Johansson, E., Olsson, O., and Nystrom, T.** (2004). Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**: 22204–22208.
- Kanno, T., Endo, H., Takeuchi, K., Morishita, Y., Fukayama, M., and Mori, S.** (2002). High expression of methionine aminopeptidase type 2 in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Lab. Invest.* **82**: 893–901.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M., and McPherson, J.** (1987). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**: 1299–1302.
- Kim, J., Lee, M., Chalam, R., Martin, M.N., Leustek, T., and Boerjan, W.** (2002). Constitutive overexpression of cystathionine gamma-synthase in *Arabidopsis* leads to accumulation of soluble methionine and S-methylmethionine. *Plant Physiol.* **128**: 95–107.
- Kurepa, J., and Smalle, J.A.** (2008). Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie* **90**: 324–335.
- Li, X., and Chang, Y.H.** (1995). Amino-terminal protein processing in *Saccharomyces cerevisiae* is an essential function that requires two distinct methionine aminopeptidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12357–12361.
- Lockwood, T.D.** (2005). The transfer of reductive energy and pace of proteome turnover: A theory of integrated catabolic control. *Antioxid. Redox Signal.* **7**: 982–998.
- Logue, S.E., and Martin, S.J.** (2008). Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* **36**: 1–9.
- Lopez-Otin, C., and Overall, C.M.** (2002). Protease degradomics: A new challenge for proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 509–519.
- Marino, G., Ugalde, A.P., Salvador-Montoliu, N., Varela, I., Quiros, P.M., Cadinanos, J., van der Pluijm, I., Freije, J.M., and Lopez-Otin, C.** (2008). Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Hum. Mol. Genet.* **17**: 2196–2211.
- Martinez, A., Traverso, J.A., Valot, B., Ferro, M., Espagne, C., Ephritikhine, G., Zivy, M., Giglione, C., and Meinnel, T.** (2008). Extent of N-terminal modifications in cytosolic proteins from eukaryotes. *Proteomics* **8**: 2809–2831.
- Marty, L., Siala, W., Schwarzlander, M., Fricker, M.D., Wirtz, M., Sweetlove, L.J., Meyer, Y., Meyer, A.J., Reichheld, J.P., and Hell, R.** (2009). The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 9109–9114.
- Meinnel, T., and Giglione, C.** (2008a). Protein lipidation meets proteomics. *Front. Biosci.* **13**: 6326–6340.
- Meinnel, T., and Giglione, C.** (2008b). Tools for analyzing and predicting N-terminal protein modifications. *Proteomics* **8**: 626–649.
- Meinnel, T., Serero, A., and Giglione, C.** (2006). Impact of the N-terminal amino acid on targeted protein degradation. *Biol. Chem.* **379**: 839–851.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J.** (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**: 1069–1075.
- Montuori, N., Carriero, M.V., Salzano, S., Rossi, G., and Ragno, P.** (2002). The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *J. Biol. Chem.* **277**: 46932–46939.
- Noctor, G., Bergot, G., Mauve, C., Thominet, D., Lelarge-Trouverie, C., and Prioul, J.-L.** (2007). A comparative study of amino acid measurement in leaf extracts by gas chromatography-time of flight-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Metabolomics* **3**: 161–174.
- Pierre, M., Traverso, J.A., Boisson, B., Domenichini, S., Bouchez, D., Giglione, C., and Meinnel, T.** (2007). N-Myristoylation regulates the SnRK1 pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2804–2821.
- Queval, G., and Noctor, G.** (2007). A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal. Biochem.* **363**: 58–69.
- Ravid, T., and Hochstrasser, M.** (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 679–690.
- Resh, M.D.** (2006). Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 584–590.
- Ross, S., Giglione, C., Pierre, M., Espagne, C., and Meinnel, T.** (2005). Functional and developmental impact of cytosolic protein N-terminal methionine excision in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **137**: 623–637.
- Sanchez-Fernandez, R., Fricker, M., Corben, L.B., White, N.S., Sheard, N., Leaver, C.J., Van Montagu, M., Inze, D., and May, M. J.** (1997). Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2745–2750.
- Schwender, J., Ohlrogge, J.B., and Shachar-Hill, Y.** (2003). A flux model of glycolysis and the oxidative pentosephosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos. *J. Biol. Chem.* **278**: 29442–29453.
- Selvakumar, P., Lakshmikuttyamma, A., Dimmock, J.R., and Sharma, R.K.** (2006). Methionine aminopeptidase 2 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1765**: 148–154.
- Selvakumar, P., Lakshmikuttyamma, A., Lawman, Z., Bonham, K., Dimmock, J.R., and Sharma, R.K.** (2004). Expression of methionine aminopeptidase 2, N-myristoyltransferase, and N-myristoyltransferase inhibitor protein 71 in HT29. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**: 1012–1017.
- Shin, R., Alvarez, S., Burch, A.Y., Jez, J.M., and Schachtman, D. P.** (2007). Phosphoproteomic identification of targets of the *Arabidopsis* sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2.8 reveals a connection to metabolic processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 6460–6465.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J.** (2008). Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 231–241.
- Tommasi, F., Paciolla, C., de Pinto, M.C., and De Gara, L.** (2001). A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *J. Exp. Bot.* **52**: 1647–1654.
- van der Hoorn, R.A.** (2008). Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 191–223.
- Veljovic-Jovanovic, S.D., Pignocchi, C., Noctor, G., and Foyer, C.H.** (2001). Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol.* **127**: 426–435.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., Van Montagu, M., Inze, D., May, M.J., and Sung, Z.R.** (2000). The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* **12**: 97–110.
- Vierstra, R.D.** (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.* **8**: 135–142.
- Waller, J.-P.** (1963). The NH₂-terminal residue of the proteins from cell-free extract of *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **7**: 483–496.
- Wang, J., Lou, P., and Henkin, J.** (2000). Selective inhibition of endothelial cell proliferation by fumagillin is not due to differential expression of methionine aminopeptidases. *J. Cell. Biochem.* **77**: 465–473.
- Wladyka, B., and Pustelny, K.** (2008). Regulation of bacterial protease activity. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **13**: 212–229.

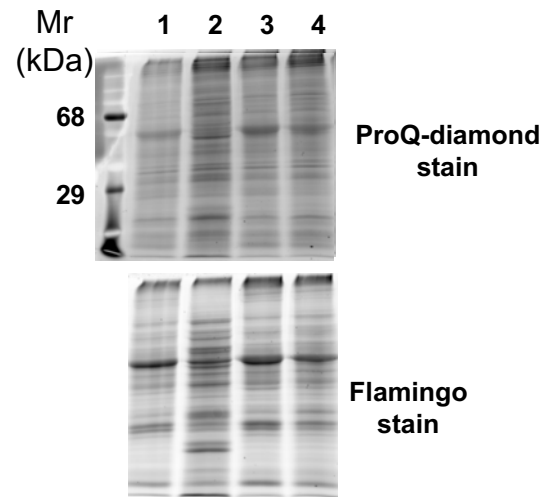
- Yan, C., and Boyd, D.D.** (2007). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Physiol.* **211**: 19–26.
- Yeh, J.R., Ju, R., Brdlik, C.M., Zhang, W., Zhang, Y., Matyskiela, M.E., Shotwell, J.D., and Crews, C.M.** (2006). Targeted gene disruption of methionine aminopeptidase 2 results in an embryonic gastrulation defect and endothelial cell growth arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 10379–10384.
- Yeh, J.R., Mohan, R., and Crews, C.M.** (2000). The antiangiogenic agent TNP-470 requires p53 and p21^{CIP/WAF} for endothelial cell growth arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12782–12787.
- Yen, H.C., Xu, Q., Chou, D.M., Zhao, Z., and Elledge, S.J.** (2008). Global protein stability profiling in mammalian cells. *Science* **322**: 918–923.
- Yoshida, T., Kaneko, Y., Tsukamoto, A., Han, K., Ichinose, M., and Kimura, S.** (1998). Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase. *Cancer Res.* **58**: 3751–3756.
- Zhang, Y., Griffith, E.C., Sage, J., Jacks, T., and Liu, J.O.** (2000). Cell cycle inhibition by the anti-angiogenic agent TNP-470 is mediated by p53 and p21^{WAF1/CIP1}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6427–6432.
- Zhang, Y., Yeh, J.R., Mara, A., Ju, R., Hines, J.F., Cirone, P., Griesbach, H.L., Schneider, I., Slusarski, D.C., Holley, S.A., and Crews, C.M.** (2006). A chemical and genetic approach to the mode of action of fumagillin. *Chem. Biol.* **13**: 1001–1009.

Supplemental Figure 1. cNME-inhibition does not modify the phosphoproteome or protein oxidation levels.

A, A representative SDS-PAGE gel showing the time course of protein phosphorylation in crude homogenates detected with ProQ-diamond staining (top gel). Lanes 1 and 3 correspond to WT plants at 3 and 8 days after germination, respectively. Lanes 2 and 4 correspond to *map1A* mutants treated with 100 nM of Fumagillin for 3 and 8 days after germination, respectively. For normalization, the total amount of protein loaded was determined by staining the gel with Flamingo stain (bottom gel).

B, A representative immunoblot showing the time course of protein carbonylation in crude homogenates, as determined with the Oxiblot Kit. Lanes 1 and 3 refers to WT plants at 3 and 8 days after germination, respectively. Lanes 2 and 4 correspond to *map1A* mutants treated with 100 nM of Fumagillin for 3 and 8 days after germination, respectively. Lanes 5,6,7,8 correspond to negative controls consisting of the same samples shown in lanes 1,2,3,4 not subjected to the derivatization reaction.

A



B

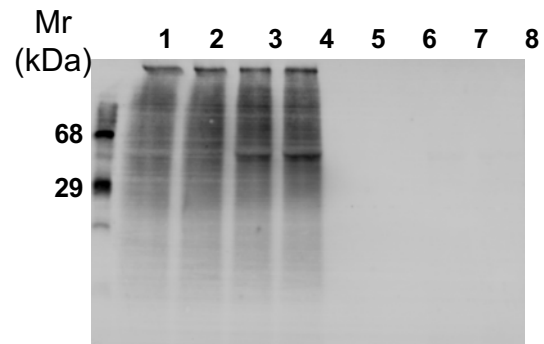


Figure 1

Supplemental Figure 2. Rescue of the defect associated with cNME inhibition in dsRNA interference *Arabidopsis* lines with Cys and impact of iron cations on growth.

A, Plantlets were vertically grown in the presence or absence of 2 mM cysteine. The *ΨMAP1A2* line, a dsRNA-interference *Arabidopsis* line with reduced levels of both MAP1A and MAP2s, mimics the phenotype of the *map1A* line when grown in the presence of 100 nM of Fumagillin. Both the phenotype and MAP content are described in Ross et al. (2005).

B, *map1A* and WT plantlets were vertically grown in the presence or absence of iron chloride salts (FeII or FeIII) and in the presence or absence of 100 nM Fumagillin. The highest iron concentrations are expected to induce a Fenton reaction producing OH radicals and oxidative stress. The data show that the cNME inhibited line does not exhibit additional oxidative stress sensitivity or protection compared to the controls.

A

ΨMAP1A2
Cys (mM)
- 2mM

**B**

Fumagillin- - - - - + + + + +
Fe II (μM) 2000 1000 500 50 - - 50 500 1000 2000

map1A

Fumagillin - - - - - + + + + +
Fe II (μM) 2000 1000 500 50 - - 50 500 1000 2000

WT



Fumagillin - - - - - + + + + +
Fe III (μM) 2000 1000 500 50 - - 50 500 1000 2000

map1A

Fumagillin - - - - - + + + + +
Fe III (μM) 2000 1000 500 50 - - 50 500 1000 2000

WT

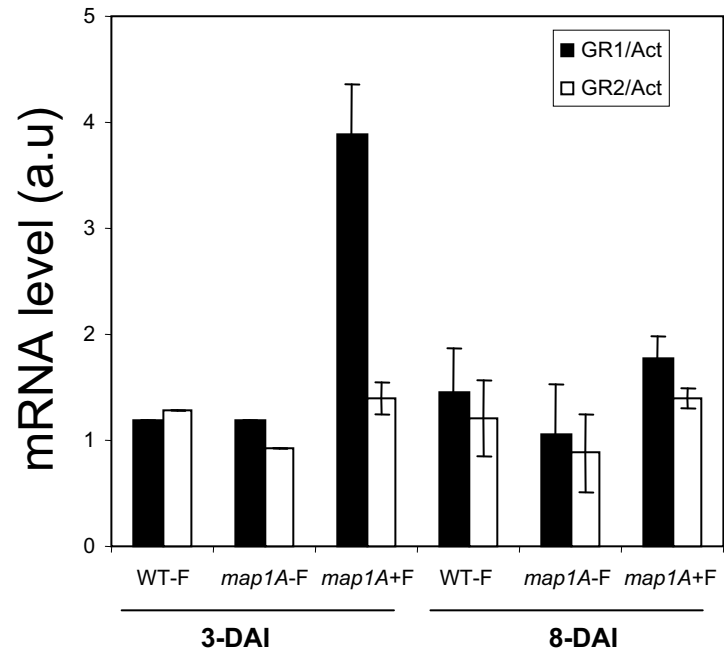
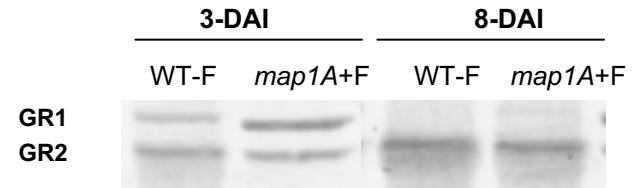
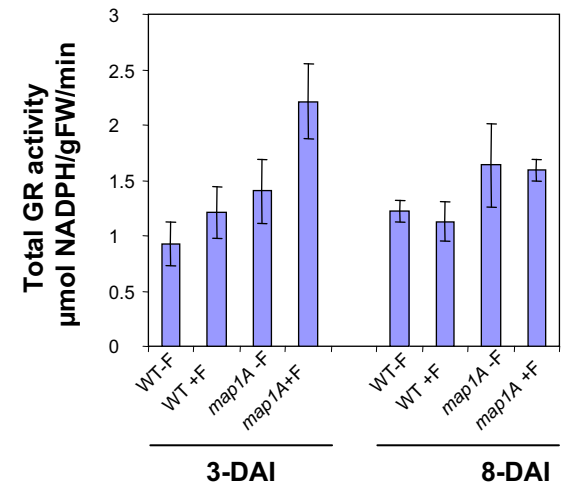
**Figure 2**

Supplemental Figure 3. The high level of GSSG in cNME deficient plants is not due to a decrease in Glutathione reductase concentration.

A, Levels of transcripts for cytoplasmic Glutathione reductase (*GR1*) and chloroplastic Glutathione reductase (*GR2*) expressed relative to actin transcript levels. Measurements were made by real-time PCR. A.u, Arbitrary units.

B, Relative levels of GR1 and GR2 proteins as analyzed by Western blot. We analyzed 30 µg of total proteins by 10% denaturing PAGE, followed by electroblotting and probing of the resulting membrane with an anti-GR antibody recognizing both GR1 and GR2 (Agrisera, Vännäs, Sweden).

C, The total GR activity of the indicated protein extracts was determined as described.

A**B****C****Figure 3**

Supplemental Figure 4. cNME-inhibition rapidly induces a decrease in NADPH nucleotide levels.

The amount of pyridine nucleotides in total extracts from WT and cNME-deficient plants was determined at various stages, as reported in Methods. The measurements of NADH (top, left), NADP (bottom, left) and NADPH (right panel) are displayed.

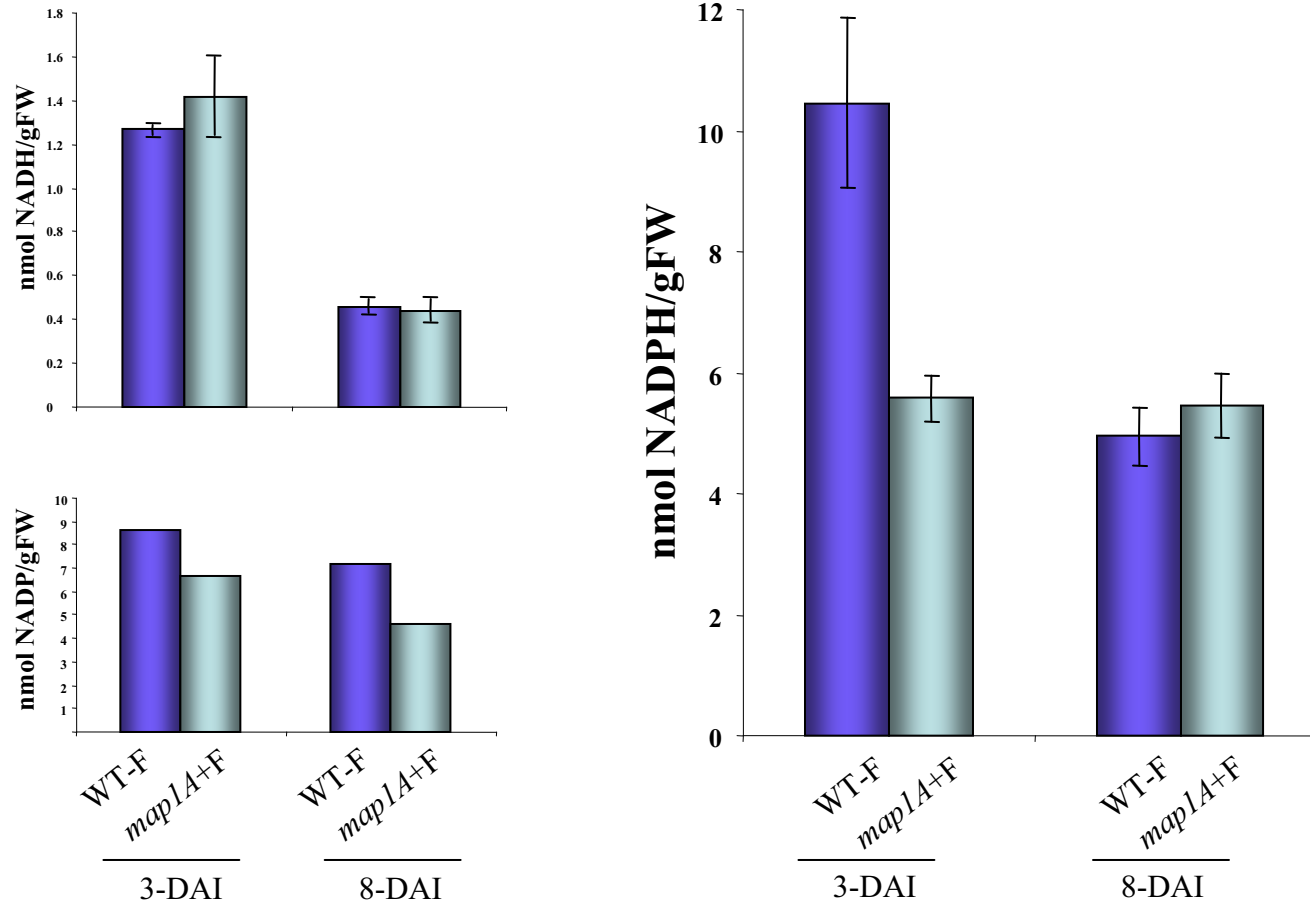


Figure 4

Supplemental Figure 5. NME perturbation induced a slight adjustment of proteolytic activities.

A, Investigation of global proteolytic activities in the sample. 3 and 8-DAI-old seedlings were vertically grown in the presence or absence of 100 nM of Fumagillin. Endoproteolytic activities were measured with the EnzChek peptidase/protease substrate as described in Methods. Mean of activities are given in RFU/min/ μ g of proteins.

B, Late induction of proteasome-like activities following cNME inhibition. Caspase-like, Trypsin-like and Chymotrypsin-like activities were investigated with specific substrates (see Methods for further details) in WT-F and *map1A*+F plantlets at 3 and 8-DAI. Mean specific proteolytic activities (pmol/min/ μ g of protein) are given. P, error probability (two-tailed t-test. Relative Fluorescence Unit, RFU. One star indicates a P value less than 0.05 while two stars indicate a P value less than 0.01.

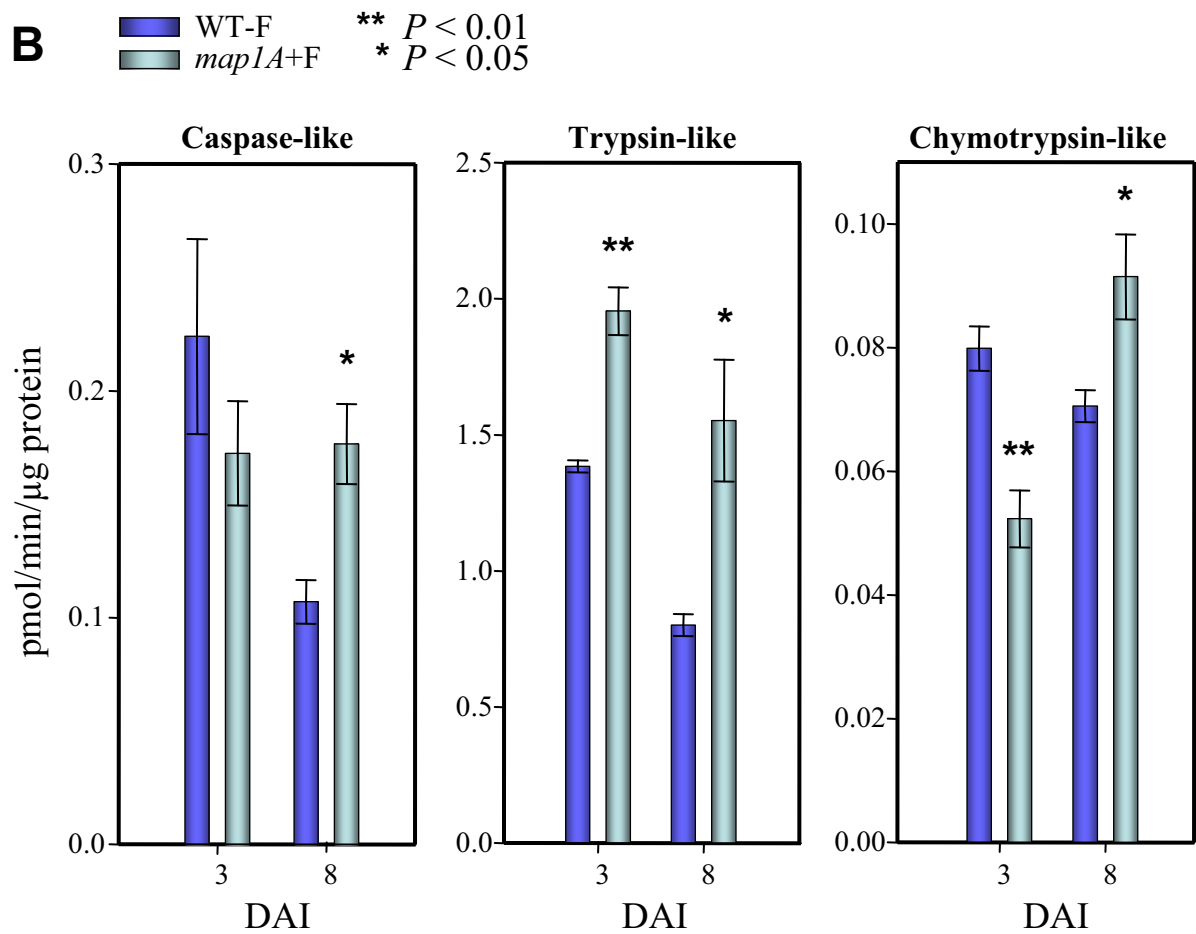
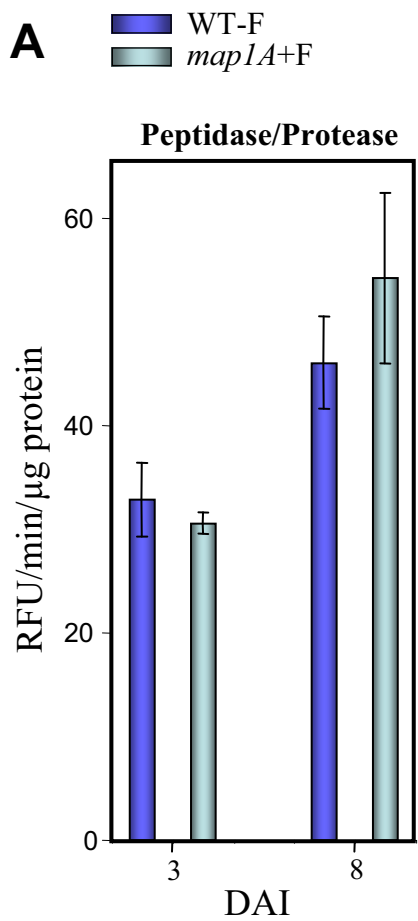


Figure 5

Supplemental Table 1 Identities of protein spots with a higher intensity in NME-inhibited conditions

Spot number	Function	Localization	N-terminus	Measured MW (kDa)	Theoretical MW (kDa)	Measured pI	Theoretical pI
190-212-213 (238 in WT)	AT5G17920 Cobalamine-independent methionine synthase 3	cytoplasmic	ma	67	84	6.6	6.1
190	AT3G03780 Cobalamine-independent methionine synthase 2	cytoplasmic	ma	67	84	6.6	6.1
55	AT1g21720 PBC1 (20S proteasome beta subunit C1)	cytoplasmic	ma	30	23	5.5	5.3
55	AT2g40600 (appr-1-p processing enzyme family protein)	chloroplast	mr	30	21	5.5	5.6
55	AT5G66550 Maf family protein	cytoplasmic	mt	30	20	5.5	4.8
95-96	AT1G53240 malate dehydrogenases (MDH)	glycosomal/mitochondria	mf	38	33	6.4	6.4
75	AT5G23140 CLPP2 (Clp protease proteolytic subunit 2)	chloroplast/mitochondria	mm	31	24	6.4	5.8
222-223	AT1G30230 elongation factor 1-beta	cytoplasm	ma	41	25	4.5	4.4
222	AT2G18110 elongation factor 1-beta, putative	cytoplasm	ma	41	25	4.6	4.5
78	AT4G02520 Glutathione S-transferase PM24	cytoplasm	ma	31	24	6.3	5.9
79	AT1G02930 ATGSTF6 (early responsive to dehydration 11)	cytoplasm	ma	30	23	6.3	5.8

The intensity of the spots in sample *map1A*+F was compared to that of the WT-F sample at 8 DAI.

Supplemental Table 2 Low molecular weight proteins are more abundant in *map1A*+F 3

DAI than in the equivalent fractions from WT.

Spot number	gene	Measured Mr (kDa)	Theoretical Mr (kDa)
1	AT1G62290.1	6.5	60
1	AT5G42890.1	6.5	14
2	AT5G19090.1	6	60
2	AT4G04460.1	6	55
2	AT1G11910.1	6	55
2	AT5G44120.1	6	53
2	AT2G39730.1	6	52
2	AT1G03880.1	6	51
2	AT3G08580.1	6	41
2	AT5G19760.1	6	32
2	AT5G13430.1	6	30
2	AT5G07190.1	6	23
2	AT5G38410.1	6	20
2	AT4G27150.1	6	19
2	AT4G01150.1	6	18
2	AT2G36170.1	6	15
2	AT3G47650.1	6	15
2	AT5G63030.1	6	14
2	AT4G16500.1	6	13
2	AT2G35605.1	6	12
2	AT2G38530.1	6	12
2	AT5G40370.1	6	12
2	AT1G66240.1	6	11
2	AT1G31812.1	6	10
2	AT3G48140.1	6	10
2	AT5G47930.1	6	9
2	AT1G61570.1	6	9
2	AT2G45710.1	6	9
2	AT3G52730.1	6	8
2	AT1G51650.1	6	8
3	AT4G28520.1	4.5	58
4	AT4G28520.1	6.5	58
4	AT1G62290.1	6.5	56
4	AT5G44120.2	6.5	53
4	AT1G03880.1	6.5	51
4	AT1G13440.1	6.5	37
4	AT1G50900.1	6.5	19
4	AT4G01150.1	6.5	18
4	AT1G23410.1	6.5	18
4	AT1G54630.1	6.5	15
4	AT1G54580.1	6.5	15
4	AT4G16500.1	6.5	13
4	AT2G38530.1	6.5	12

4	AT5G40370.1	6.5	12
4	AT1G66240.1	6.5	11
4	AT1G31812.1	6.5	10
4	AT5G47930.1	6.5	9
4	ATCG00580.1	6.5	9
4	AT2G45710.1	6.5	9

ANNEXE 2

«The proteomics of N-terminal methionine cleavage »

L'article et l'ensemble des données supplémentaires :

<http://www.mcponline.org/content/5/12/2336.full?sid=be5118f3-fb93-4594-87ed-83dc2c306494>

The Proteomics of N-terminal Methionine Cleavage*[§]

Frédéric Frottin^{‡§}, Aude Martinez^{‡§}, Philippe Peynot[‡], Sanghamitra Mitra^{¶||},
Richard C. Holz^{¶||}, Carmela Giglione[‡], and Thierry Meinel^{‡**}

Methionine aminopeptidase (MAP) is a ubiquitous, essential enzyme involved in protein N-terminal methionine excision. According to the generally accepted cleavage rules for MAP, this enzyme cleaves all proteins with small side chains on the residue in the second position (P1'), but many exceptions are known. The substrate specificity of *Escherichia coli* MAP1 was studied *in vitro* with a large (>120) coherent array of peptides mimicking the natural substrates and kinetically analyzed in detail. Peptides with Val or Thr at P1' were much less efficiently cleaved than those with Ala, Cys, Gly, Pro, or Ser in this position. Certain residues at P2', P3', and P4' strongly slowed the reaction, and some proteins with Val and Thr at P1' could not undergo Met cleavage. These *in vitro* data were fully consistent with data for 862 *E. coli* proteins with known N-terminal sequences *in vivo*. The specificity sites were found to be identical to those for the other type of MAPs, MAP2s, and a dedicated prediction tool for Met cleavage is now available. Taking into account the rules of MAP cleavage and leader peptide removal, the N termini of all proteins were predicted from the annotated genome and compared with data obtained *in vivo*. This analysis showed that proteins displaying N-Met cleavage are over-represented *in vivo*. We conclude that protein secretion involving leader peptide cleavage is more frequent than generally thought. *Molecular & Cellular Proteomics* 5: 2336–2349, 2006.

Protein N-terminal methionine excision (NME)¹ is an essential cotranslational process that occurs in the cytoplasm of all organisms and in the two organelles (*i.e.* mitochondria and plastids) displaying protein synthesis (for reviews, see Refs. 1 and 2). NME involves two types of methionine aminopeptidase (MAP), MAP1 (type-I) and MAP2 (type-II), which have similar three-dimensional structures despite having only low

From the [‡]Protein Maturation, Cell Fate, and Therapeutics, Institut des Sciences du Végétal, UPR2355, CNRS, Bâtiment 23, 1 avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette cedex, France, [¶]Department of Chemistry and Biochemistry, Utah State University, Logan, Utah 84322-0300, and ^{||}Department of Chemistry, Loyola University, Chicago, Illinois 60626

Received, June 16, 2006, and in revised form, September 1, 2006
Published, MCP Papers in Press, September 8, 2006, DOI 10.1074/mcp.M600225-MCP200

¹ The abbreviations used are: NME, N-terminal Met excision; LPR, leader peptide removal; MAP, methionine aminopeptidase; Nva, norvaline; Aba, α -aminobutyrate.

levels of sequence identity (for a review, see Ref. 3). Higher eukaryotes have at least one MAP1 (MAP1A, also known as MetAP1b; Ref. 4) and one MAP2 in the cytoplasm and one MAP1 (MAP1D) in the organelles. Archaea, such as *Pyrococcus furiosus*, have one MAP2, and eubacteria, such as *Escherichia coli*, have only MAP1. In eubacteria and the organelles, a peptide deformylase systematically removes the N-formyl group, leading to the activation of MAP cleavage (5–7). Bacterial MAP1 cannot cleave N-blocked polypeptides (6).

The role of NME remains poorly understood (2), but this process is recognized to be the major source of N-terminal amino acid diversity. It is thought that up to 80% of the proteins of any given proteome undergo this modification (8–10). Early biochemical and genetic studies indicated that this activity was very specific for peptides with an N-terminal Met residue (P1 position according to Schechter's nomenclature, Ref. 11), and the penultimate position (P1') was identified as the major determinant for cleavage (for reviews, see Refs. 12 and 13). The rule of thumb is that cleavage occurs if the side chain is small enough as is the case for Ala, Cys, Pro, Ser, Thr, and Val. According to this rule, cleavage is not possible for larger side chains. This stochastic rule, which emerged from early bioinformatics analysis based on compilation of the few protein sequences available at the time (14), was confirmed by biochemical analysis of MAP activity *in vitro* with about a dozen model tri- and tetrapeptides (6, 15, 16). Edman degradation sequencing of two reporter proteins in *E. coli* was used to further the analysis (17, 18). The authors of these studies suggested that the process was statistical rather than stochastic and that cleavage efficiency was correlated with side-chain length or gyration radius as defined by Levitt (19) at P1' (20). This is fully confirmed by the structural analysis of many MAPs (3, 4). Cleavage probability was found to be highest for Gly (97%) followed by Ala, Thr (90%), Pro, Ser, and Val (84%). Cleavage was less probable for the substrates Cys (71%), Ile (18%), Asp, Leu, and Asn (16%). The underlying idea is that the S1' binding pocket, into which the P1' side chain must fit, is small and tolerates smaller side chains with Gly being the optimal residue. However, these two analyses were based on only two reporter proteins, although the comparison was straightforward as the protein sequences differed only at position P1'. These findings form the basis of our current understanding of the process (for a review, see Ref. 1; see also Fig. 1 in Ref. 21), which is used for bioinformatics

analysis of the process in genomes (see Scheme 1 and Fig. 4 in Ref. 22). More recent proteomics analysis in *E. coli* (23, 24) has generated a comprehensive overview, and the N terminus has now been clearly determined for the products of a total of 862 open reading frames (of the 4071 proteins in the *E. coli* proteome). However, the conclusions of this analysis (23) conflicted with the deduced rules of NME. Unlike proteins with Ala and Ser at P1', the authors concluded that those with Gly, Pro, and Thr in this position displayed fastidious, "variable cleavage." Finally proteins with Val at P1' were found to resist NME.

It is therefore difficult to predict the rules of N-terminal cleavage reliably based on a compilation of all these data. For example, it is unclear whether proteins with Gly, Pro, Thr, Val, Cys, Ile, Asp, Asn, or Leu at P1' are cleaved and, if so, whether some of the rules for MAP cleavage have yet to be determined or whether other competing mechanisms, such as protein exportation, secretion, or insolubility due to membrane localization, may have biased analysis *in vivo*. This ambiguity makes reliable proteome annotations difficult for 27% of the proteins in the bacterial proteome and renders the production of recombinant proteins of therapeutic interest risky given the high antigenicity of the N terminus if incorrectly processed (25). This problem was initially encountered in the production of human hemoglobin (26). Closer examination of published biochemical analyses (6, 15, 16, 27) showed that these analyses were not really systematic as they compared peptides of different lengths with different residues in positions 3 (P2') and 4 (P3'). These differences may have greatly influenced data interpretation. In addition, by analogy with the cleavage rules of similar peptidases with extended recognition regions around the cleavage site, it is unclear whether MAP enzymes have a P2' or a P3' recognition site (S2' and S3') and whether these two sites influence substrate specificity *in vivo*. Furthermore we noted that, in analyses *in vitro*, data were systematically compared at fixed peptide concentrations (usually 4 or 20 mM), although K_m values are known to range from 1 to 5 mM, and the steady-state concentration of the nascent peptide is of the order of 0.1 mM (28). Thus, k_{cat}/K_m measurements (*i.e.* catalytic efficiency) were required for the modeling of MAP activity from *in vitro* studies, facilitating the comparison of coherent peptide series essential for the drawing of definitive conclusions.

The aim of this study was to reconcile the data from *in vivo* and *in vitro* analysis using combined biochemical and bioinformatics analysis to draw a definitive and coherent picture of NME and its cleavage rules *in vivo*. We first used *E. coli* as a model system, making use of the large body of *in vivo* sequence determination data for the direct comparison of *in vitro* and *in vivo* data. We found that proteins with Thr and Val at P1' were poor substrates of MAP1 and MAP2, frequently resisting NME cleavage, and that the P2' and P3' positions had a strong effect on specificity for both MAP types. These elements would be expected to have different effects on

intrinsic protein processing in the natural proteome or the overproduction of foreign, recombinant proteins in bacteria.

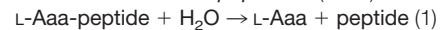
EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and Peptides—All chemicals were purchased from Sigma. Most peptides were synthesized as custom products at GenScript Corp. (Piscataway, NJ). Others were purchased from Bachem (Well-am-Rhein, Germany) or Sigma. All peptides were >95% pure and were dissolved in water at a final concentration of 50–150 mM. Heating at 50 °C was required to achieve dissolution in a few cases. Four peptides (MGF, MFG, MWG, MGW, and MPG) had to be dissolved in water plus dimethyl sulfoxide (5–10% final concentration) at a concentration of 3–10 mM. Each addition of 1% dimethyl sulfoxide to the MAP-coupled assay was found to decrease MAP activity by only 10%.

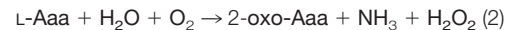
Methionine Aminopeptidase Purification—Native *E. coli* methionine aminopeptidase (EcMAP1) was overproduced from plasmid pXL1071 (29). JM83 cells expressing the plasmid were grown at 37 °C for 8–12 h in 2× TY medium (16 g/liter Bacto-tryptone, 10 g/liter Bacto-yeast extract, 5 g/liter NaCl and adjusted to pH 7.0 with NaOH) supplemented with 50 μg/ml ampicillin to an A_{600} of ~ 0.9. Cells were induced with 0.3 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside and incubated for a further 12 h with shaking. The cells were harvested by centrifugation and resuspended in 10–20 ml of buffer A consisting of 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.5) and 0.2 mM CoCl₂. The samples were sonicated, and cell debris were removed by centrifugation. The supernatant was subjected to 0–80% ammonium sulfate precipitation and centrifuged for 30 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 5 ml of buffer A, applied to a Superose-6 column (1.6 × 60 cm; GE Healthcare) and eluted at a flow rate of 0.5 ml/min in buffer A. The pool with MAP activity (30 ml) was loaded on a Q-Sepharose (1.6 × 10 cm; GE Healthcare) anion-exchange column equilibrated in buffer A, and the sample was eluted with a 0.2 M/h linear NaCl gradient (2.5 ml/min). The proteins recovered were homogeneous and were stored at –30 °C in buffer A plus 55% glycerol. *P. furiosus* MAP2 (PfMAP2) was purified as described elsewhere (30).

MAP Activity Measurements—MAP activity was assayed at 30 °C by continuously monitoring the absorbance of oxidized *o*-dianisidine at 440 nm, coupling MAP activity to both L-amino-acid oxidase and peroxidase activities, according to Scheme 1 (where Aaa is any α-amino acid).

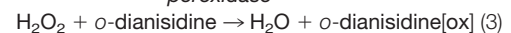
methionine aminopeptidase (MAP)



L-amino-acid oxidase



peroxidase



SCHEME 1

The conditions of this assay were set according to published observations (16, 31–33). The standard assay was performed in a final volume of 100 μl in plastic cuvettes with a 1-cm optical path (UVettes; Eppendorf). Changes in absorbance over time were followed using an Ultrospec-4000 spectrophotometer (GE Healthcare) equipped with a thermostat and a six-position Peltier heated cell changer. The reaction mixtures (95 μl) contained (final concentrations in 100 μl) 45 mM Hepes, pH 7.4, 0.2 mM CoCl₂ (Sigma; catalog number C8661) unless otherwise stated (Fig. 1A), 0.1 mg/ml *o*-dianisidine (Sigma; catalog number D9154, solution prepared from one tablet every other day and stored at 4 °C in the dark), 3 units of horseradish peroxidase (2000 units/ml, Sigma; catalog number P8415, stored for months at –20 °C), 0.5 units of L-amino-acid oxi-

dase (63 units/ml, Sigma; catalog number A9378, stored for months at 4 °C in the dark), and 0.01–20 mM peptide (see above). This premixture was incubated for 4–15 min in the spectrophotometer at 30 °C until the base line at 440 nm was stable. At this point, the spectrophotometer was set to zero. The reaction was started by adding 5 μ l of purified 0.1–20 μ M (final concentration) MAP in 50 mM Hepes, pH 7.4, 0.2 mM CoCl₂, and 150 mM NaCl, and the reaction was followed for 2–15 min. The initial velocity could generally be calculated after the first 2 min for MAP1 and the first 5 min for MAP2. This assay can measure six velocities of 0.001–0.5 A₄₄₀/min in parallel; this is generally sufficient to determine the catalytic constants. Above 0.5 A₄₄₀/min, MAP must be diluted. The measured velocities were transformed into s⁻¹ by dividing the values by the enzyme concentration used, the molar extinction coefficient of oxidized *o*-dianisidine (10,580 M⁻¹·cm⁻¹ as determined experimentally by incubating L-Met in the reaction mixture and allowing the reaction to continue to completion), and the length of the optical path (1 cm). Amino-acid oxidase has a broad enough substrate specificity for the efficient oxidation of many amino acids (31). Cysteine-containing peptides were systematically avoided as they are not compatible with the assay. This incompatibility is probably due to reduction, by the thiol group of Cys, of the H₂O₂ produced by amino-acid oxidase and used as the substrate of peroxidase, resulting in assay inhibition. We confirmed that the coupled assay was indeed inhibited by the Cys-Gly dipeptide. In a few cases, at concentrations higher than the *K_m* value, we noted that establishment of the stationary phase was delayed, although the associated reason was unclear. This problem was easily avoided provided kinetics was followed for a longer time.

Interpretation of Kinetic Data—The kinetic parameters *k_{cat}* and *K_m* were obtained using Enzyme Kinetics module 1.1 of Sigma plot (version 8.0) by non-linear Michaelis-Menten equation fitting. The confidence limits given are those associated with the data set. The kinetic parameter *k_{cat}*/*K_m* was derived from iterative non-linear least square fits of the Michaelis-Menten equation using the experimental data (34). Confidence limits for the fitted *k_{cat}*/*K_m* values were determined by 100 Monte Carlo iterations using the experimental standard deviations on individual measurements. We obtained similar data with the two peptides of the same sequence obtained from (i) the same supplier and (ii) two different suppliers.

Sequence Databases and Protein Pattern Syntax—The 4071 ORF sequences of *E. coli* were retrieved from the EcoGene website (ecogene.org/VerifiedInfo.php?download=true). The compiled N-terminal protein sequence data were retrieved from bmb.med.miami.edu/EcoGene/EcoWeb/CeSSPages/VerifiedProts.htm (see also Ref. 35). The data were ordered and classified by categories for statistical analysis. The complete proteomes of *Bacillus subtilis* and *P. furiosus* were retrieved at www.ebi.ac.uk/integr8/FtpSearch.do; jsessionid=98818969299187E6D1B9222E3B694316?orgProteomeID=6 and www.ebi.ac.uk/integr8/OrganismHomeAction.do?orgProteomeID=77, respectively.

We searched for protein patterns (36) at www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/patternp_in.pl. The pattern syntax used in this text was: “<M” constrains the pattern to the N-terminal residue (*i.e.* an initiator Met). “(^XY)” means that residues X and Y (or a subset list) are excluded, and “(Y/Z)” means that residue Y or Z (or a subset list) is included. X, Y, or Z correspond to any normal amino acid.

RESULTS

Validation of the Experimental In Vitro Model, E. coli Methionine Aminopeptidase (EcMAP1)—A high throughput, substrate-independent assay was required to investigate EcMAP1 substrate specificity. Most of the available assays were not suitable (37–39). The only available test that appeared fully

independent of the peptide sequence had only been used in a discontinuous manner. This assay involved coupling with two other activities, those of amino-acid oxidase and peroxidase (16, 31–33). We set up this assay for use in continuous conditions. This continuous version of the assay proved extremely rapid, reliable, and cheap, and all the peptides used were soluble enough for kinetic measurements. That Cys-containing peptides inhibited the assay as a result of the reducing effect of the thiol group of Cys made it necessary to ensure that none of the peptides tested included a Cys. Other MAP activity assays are also subject to interference from Cys-containing peptides (40). However, this problem is not particularly important as Cys is the rarest amino acid at the N termini of proteins. For example, only six (0.17%) of the 4071 ORFs of *E. coli* are predicted to have a Cys as the second residue, 14 (0.34%) are predicted to have a Cys as the third residue, and 26 are predicted to have a Cys as the fourth residue (0.64%). Thus, our study covers 99% of the proteins of *E. coli*.

We first assessed the relevance of our assay with our purified EcMAP1. We evaluated the impact of the nature of the cocatalytic metal cation (see references compiled in Ref. 2) (Fig. 1A). Cobalt cations appeared to be the most efficient and were used in all MAP assays. In this study, our final goal was to measure *in vitro* the values of catalytic cleavage of Met cleavage (*i.e.* *k_{cat}*/*K_m*) and to compare these data with those derived from N-terminal sequence analysis of proteins expressed *in vivo*. We therefore systematically measured the *k_{cat}* and *K_m* values associated with a given peptide. Fig. 1B provides an example of fit quality and shows the relevance of fitting the Michaelis-Menten model to the data. With peptide Met-Ala-Met-Lys-Ser, the substrate most efficiently processed in this study, a catalytic efficiency value of 81,700 ± 8,000 M⁻¹·s⁻¹, associated with *K_m* = 0.05 ± 0.01 mM and *k_{cat}* = 3.9 ± 0.2 s⁻¹, was measured. These data, obtained for more than 120 different peptides (compiled data are shown in Supplemental Table S1), showed that both *k_{cat}* and *K_m* values were extremely variable with ranges covering more than 2 orders of magnitude (0.01–4 s⁻¹ and 0.05–15 mM, respectively). It would therefore not be possible to make reliable comparisons between the data obtained for peptide concentrations of 4 and 20 mM in previous publications. These findings also suggest that the enzyme worked below the *k_{cat}*/*K_m* rate of cleavage as the steady-state peptide concentration is about 0.1 mM.

In Vitro Characterization of E. coli Methionine Aminopeptidase: the S1 Site and the Influence of Peptide Length—We assessed whether EcMAP1 could be used as a broader specificity aminopeptidase by varying the nature of the P1 side chain (Fig. 2A). All experiments were carried out with tripeptides containing Ala and Ser in the second and third positions, respectively. Met-Ala-Ser proved to be one of the most efficient substrates in our analysis (see below and Supplemental Table S1). We found that Met and its unnatural norleucine

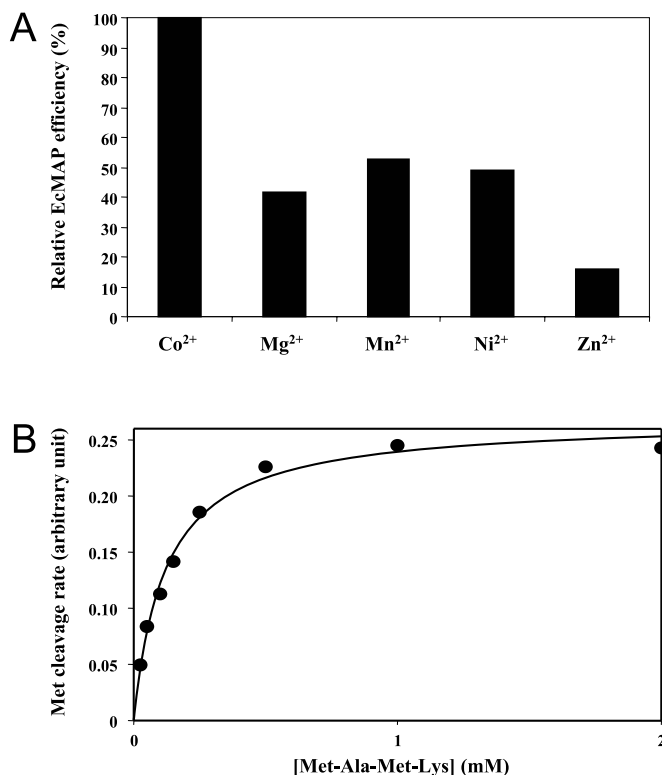


FIG. 1. Validation of the continuous enzymatic assay of MAP for the medium throughput determination of catalytic efficiency. *A*, influence of the metal cation on EcMAP cleavage efficiency. The assay was performed in the presence of 0.2 mM of the indicated metal cation, provided as a dichloride derivative in the solutions. The enzyme was also diluted in the presence of the concentration of the metal salt. *B*, example of the determination of kinetic parameters and fitting to a data set of the theoretical Michaelis-Menten equation. The peptide used was Met-Ala-Met-Lys.

(Nle) classic mimic were the only residues at position P1 that gave efficient cleavage. This finding is consistent with the tapered shape of the S1 pocket (41). The natural amino acids Leu and Phe could be processed *in vitro* but with a catalytic efficiency more than 3 orders of magnitudes lower. Similar results were obtained with methionine sulfoxide (Mox) or norvaline (Nva), which features an *n*-propyl side chain. Decreasing the length of the side chain to α -aminobutyrate (Aba), an unusual amino acid with a two-carbon linear side chain mimicking Cys and Ser, or Ala led to resistance to enzyme cleavage. We concluded that EcMAP1 could not further process its natural substrates and that the kinetic data were representative of a single cleavage site between P1 and P1' provided that Met was the first amino acid of the peptide.

We investigated the role of the interface between the P1 and P1' sites by synthesizing three peptides derived from Met-Ala-Ser: one with 2-methyl alanine (2mA), the second with oxamic acid (no side chain but with a keto group instead, Oxa), and the third with a D-Ala in position 2 replacing L-Ala. The first two peptides were not cleaved. This was in contrast to the D-Ala variant at P1' that was 2 times more efficiently

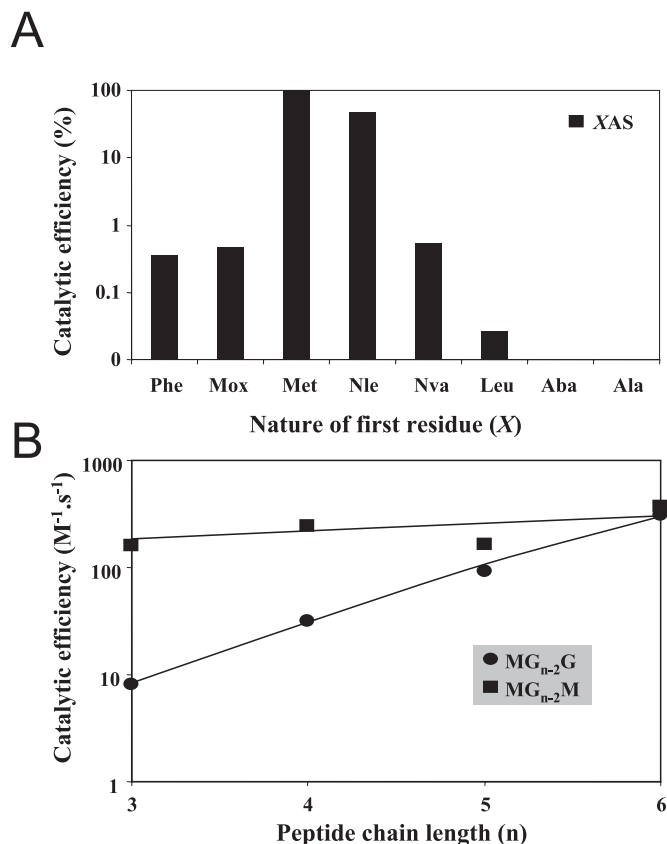


FIG. 2. Impact of P1 and peptide chain length on cleavage by MAP. *A*, influence of P1 on MAP cleavage efficiency *in vitro*. The peptide series was X-Ala-Ser where X is the indicated amino acid. A value of 100 was assigned to the k_{cat}/K_m value of Met-Ala-Ser. *B*, influence of peptide chain length. Two series of peptides were assayed, Met-(Gly) $_{n-2}$ -Gly and Met-(Gly) $_{n-2}$ -Met where $n = 3-6$ corresponds to the length of the peptide. Differences in length between peptides were ensured by a poly-Gly linker. The x axis corresponds to the full-length sequence. The shortest peptide tested was three amino acids long. The k_{cat}/K_m value is plotted as a function of peptide chain length. Mox, methionine sulfoxide; Nle, norleucine.

cleaved (Table S1). Thus, both geometry and the hydrogen environment around the α carbon of the second residue had a critical influence on cleavage by EcMAP1.

We also investigated the impact of the length of the polypeptide chain. We first confirmed that EcMAP1 cleaved dipeptides extremely inefficiently: Met-Ala or Met-Gly were cleaved with a k_{cat}/K_m value 2 orders of magnitude lower than that for the reference tripeptide with a serine in position P2' (Supplemental Table S1). In contrast, tripeptides and larger peptides starting with Met-Gly proved to be efficient substrates (Fig. 2B). We assessed the impact of side chain and length by comparing two peptides series. The last amino acid in these two series of peptides was Gly or Met, and the linker peptide consisted of Gly. The k_{cat}/K_m value was found to be maximal for peptides more than five residues long (Fig. 2B). Comparison of the data obtained for peptides of a given peptide length between the two series indicated that the

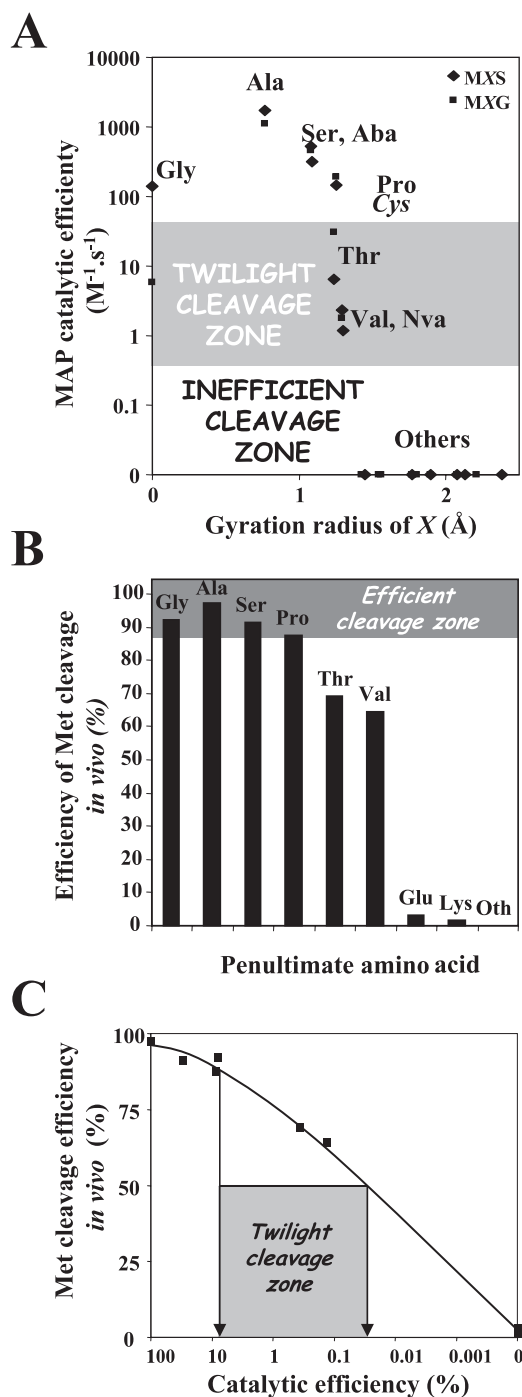


FIG. 3. Tight correlation between *in vitro* and *in vivo* cleavage efficiency with variation of the penultimate (P1') residue. A, influence of P1' *in vivo* and correlation with side-chain radius gyration (19). Two series were tested, Met-X-Gly and Met-X-Ser, where X is any amino acid. Cys could not be tested directly (it is therefore shown in *italics* here; see text); two unnatural amino acids, Aba and Nva, were included. The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) is plotted as a function of the side-chain radius gyration (data from Ref. 19). The nature of the corresponding amino acid is given. "Others" corresponds to all natural amino acids not indicated in the figure. B, influence of P1' on *in vivo* cleavage efficiency. Data were taken from the 862-sequence database of proteins with determined N-terminal sequences. "Oth"

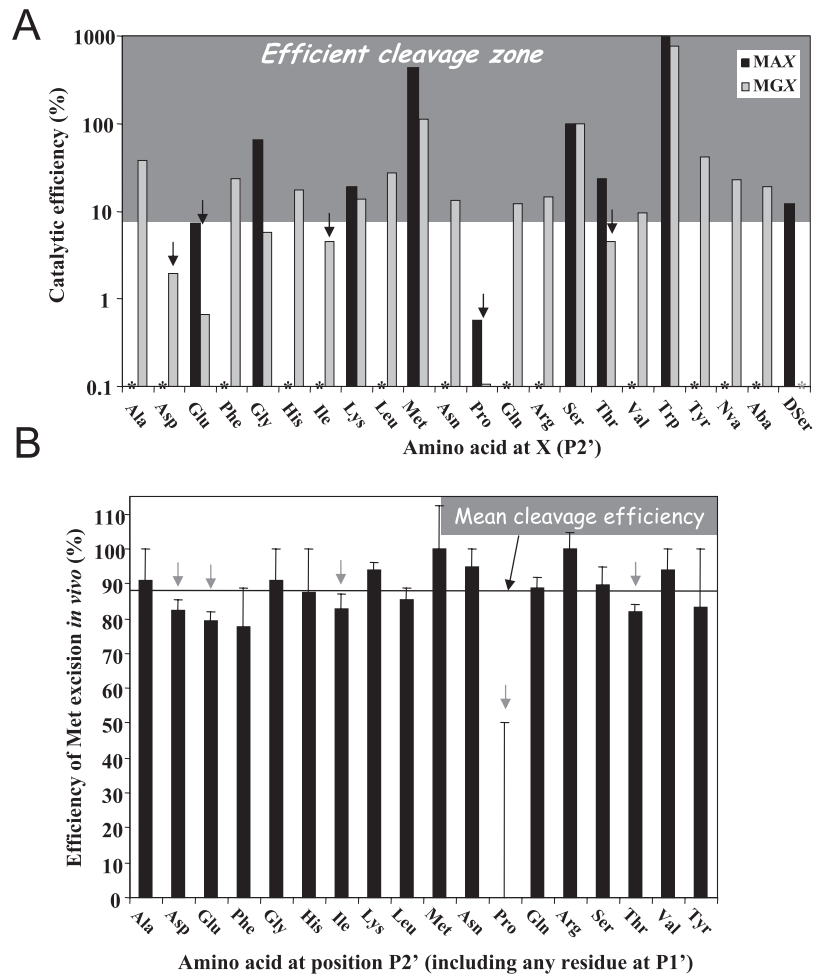
nature of the side chain at position 3 (P2' site) or 4 (P3' site) had a strong effect and that position 5 (P4' site) also had a significant effect. A thorough analysis of the impact of the amino acids at these positions is therefore required.

The S1' Subsite of EcMAP1: Difficult Cleavage of the Thr and Val Residues—MAPs are known to cleave peptides selectively between the terminal Met and the penultimate or P1' residue. In two tripeptide series, one with Ser and the other with Gly at P2', we measured the catalytic efficiency of Met cleavage for the complete set of amino acids with the exception of Cys (Fig. 3A). Ala was cleaved most efficiently followed by Ser, Gly, and Pro. Thr and Val were cleaved less efficiently with k_{cat}/K_m values 2 orders of magnitude lower in both series. We could not determine k_{cat}/K_m values for other amino acids (at least 5 orders of magnitude lower). In particular, peptides with Ile, Asn, Asp, Met, or Leu at P1' were not cleaved. These findings contrast with two reports using reporter proteins *in vivo* (17, 18). At this stage, we do not know whether our *in vitro* assay was representative of *in vivo* conditions or whether it was not sensitive enough. Nevertheless there was a clear relationship between gyration radius (as defined by Levitt (19)) of the side chain at P1' and catalytic efficiency as reported previously (Fig. 3A). This relationship was fully confirmed in the context of the most efficient series, the one derived from tetrapeptide MXMK (with X = Ala, Gly, Pro, Ser, Thr, Val, Asn, Ile, Leu, Asp, Glu, Phe, Gln, Lys, or Arg; data reported in Supplemental Table S1). In contrast to previous reports suggesting that Gly in the penultimate position gave the most efficient processing, our data clearly show that the side chain of Ala is optimal at P1'. We analyzed two tripeptides with unusual P1' side chains. One contained Nva, and the second contained Aba, mimicking Cys and Ser, respectively. The deduced k_{cat}/K_m values for these peptides were entirely consistent with the model. This strongly suggests that the values for Cys would be similar to that of Pro, which has the most similar gyration radius (19).

In Vivo N-terminal Met Cleavage Is a Statistical Process Mostly Dependent on the Catalytic Efficiency of MAP—The data described above indicated that only peptides with Ala, Gly, Ser, Cys, or Pro at P1' are substrates of EcMAP1 and that the cleavage of peptides with Thr or Val at this position is less predictable, possibly depending on other features. We compared this *in vitro* analysis with *in vivo* results using compiled data from N-terminal protein sequencing (data available at ecogene.org/VerifiedInfo.php?download=true). This analysis

corresponds to all natural amino acids not indicated in the figure. C, Met cleavage efficiency at P1' *in vivo* is directly correlated with MAP cleavage efficiency assessed *in vitro*. The data set in Fig. 1 was associated with that of A for a given amino acid at position P1'. The panel shows a plot of the cleavage efficiency *in vivo* for a given P1' position versus the activation energy (a value proportional to the logarithm of the k_{cat}/K_m value; see Ref. 79) of the reaction *in vitro* measured with a model substrate with the same P1'.

FIG. 4. Comparison of the impact of the nature of the P2' position on NME *in vitro* and *in vivo*. *A*, influence of the P2' position *in vitro*. The data came from two data sets, one with Met-Ala-X (black bars) and the second with Met-Gly-X (gray bars), where X is any natural amino acid. The relative catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) is plotted as a function of X. A value of 100 was assigned to X = Ser in both series. A black or gray asterisk (*) indicates that the corresponding peptide in either series was not characterized. *B*, influence of the P2' position *in vivo*. Data were taken from the 862-sequence database of proteins with determined N-terminal sequences. The efficiency of Met cleavage was defined as the percentage of proteins with a <M(A/C/G/P/S/T/V) pattern resistant to Met cleavage (385 instances). The general mean value of 87% was used to display differences optimally. Given the small number of instances, an error bar corresponding to one more or less uncleaved example was introduced. Arrows indicate the amino acids leading to significant decrease of cleavage efficiency in the series.



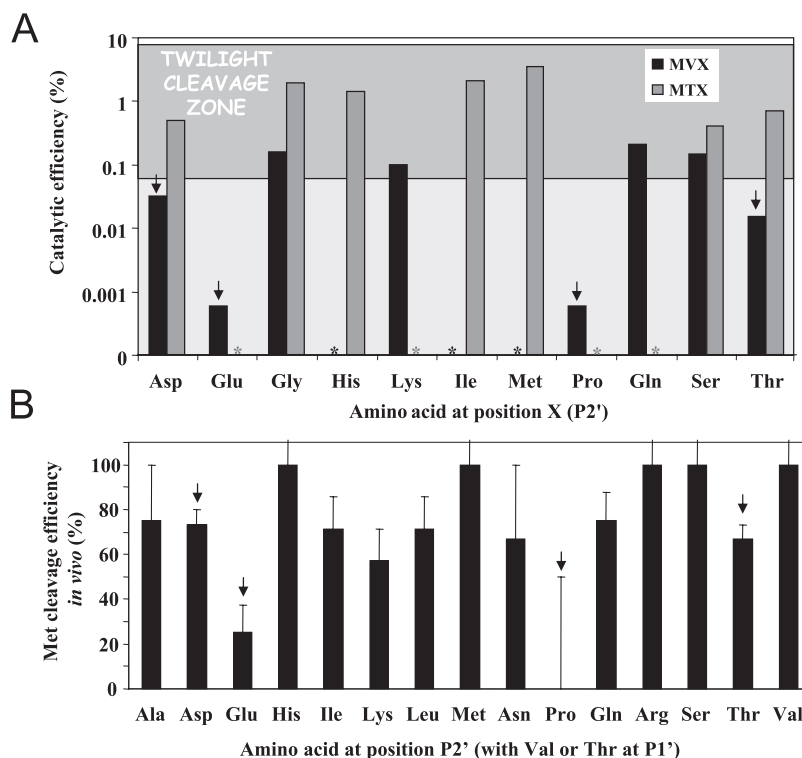
showed that 14.4% of the proteins are cleaved by a signal peptidase. Cleavage usually occurs between two alanine residues located at positions 23–27 of the polypeptide sequence. The remaining proteins (85.6%) either retain or lose their N-terminal Met. We analyzed this pool of proteins (738 sequences) to draw up the rules of NME *in vivo* and compared the data obtained with our *in vitro* analysis. Cleavage was not reported with Ile, Asp, Asn, Leu, Met, or Gln at P1'. This fully confirmed the results of our *in vitro* analysis, conflicting with previous analyses based on reporter proteins (17, 18). No cleavage was reported if the P1' residue was Arg, Phe, His, Tyr, or Trp as suggested *in vitro*. Finally one cleavage with Glu (42) and two with Lys (43, 44) at P1' were reported, but these cleavages concerned only 3.0 and 1.5%, respectively, of all the sequences containing these amino acids at this position. These exceptional cases of cleavage may result from the action of dedicated acylaminopeptidases rather than MAP as shown previously for actin in animals (45, 46).

Met excision was not systematic with Ala, Cys, Pro, Ser, Thr, and Val at P1' as 13% of such proteins escaped Met cleavage (NME). Cleavage efficiency was maximal with Ala (97%) and minimal with Thr (69%) and Val (64%) (Fig. 3B).

This efficiency was similar to that found in the kinetic analysis shown in Fig. 3A. For each type of residue found at P1', we therefore plotted *in vivo* cleavage efficiency as a function of EcMAP1-mediated cleavage efficiency measured *in vitro*. There was an extremely strong correlation between the two data sets (Fig. 3C). Thus, NME or resistance to NME was limited essentially by MAP catalytic efficiency *in vivo*, and the data obtained *in vitro* were reliable for the modeling of NME *in vivo*. We defined a “twilight cleavage zone” as the catalytic cleavage efficiency leading to partial cleavage efficiency *in vivo* (Fig. 3). Below this zone, cleavage is considered as inefficient.

The S2' Subsite of EcMAP1: Pro and Glu Are Inefficiently Cleaved Residues—We first investigated the impact of the P2' amino acid in the context of two series of tripeptides beginning with Met-Ala, the most efficient substrate of EcMAP1, and Met-Gly, an intermediate substrate for EcMAP1. The P2' side chain clearly had a strong effect on the catalytic efficiency of Met excision catalyzed by EcMAP1. Some residues, such as Pro and Glu, decreased the k_{cat}/K_m ratio by more than an order of magnitude in both series with others, such as Asp, Ile, and Thr, significantly decreasing this value by at least 1

FIG. 5. Impact of the nature of P2' on NME when P1' is a residue processed inefficiently (i.e. Thr or Val) for MAP. **A**, influence of the P2' position *in vitro*. The data were obtained from two data sets, one with Met-Val-X (black bars) and the second with Met-Thr-X (gray bars), where X is the indicated natural amino acid. The relative catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) is plotted as a function of X. A value of 100 was assigned to Met-Ala-Ser. A black or gray asterisk (*) indicates that the corresponding peptide in either series was not characterized. **B**, influence of the P2' position *in vivo*. Data were taken from the 862-sequence database of proteins with determined N-terminal sequences. The efficiency of Met cleavage was defined as the percentage of proteins with a <M(A/C/G/P/S/T/V) pattern resistant to Met cleavage. Arrows indicate the amino acids leading to significant decrease of cleavage efficiency in the series.



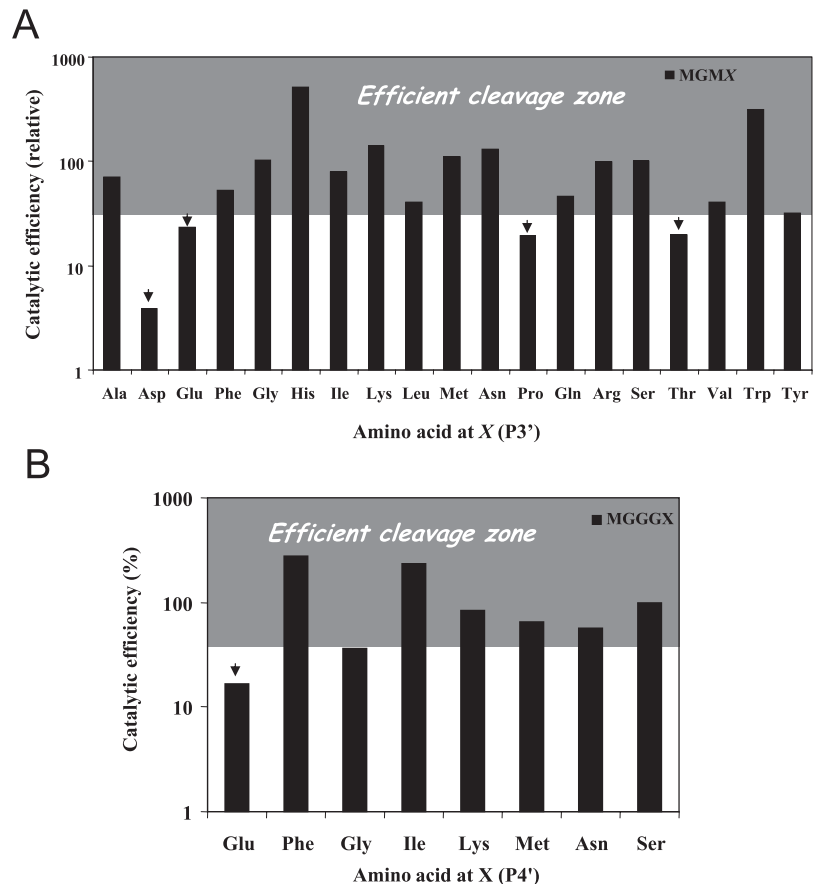
order of magnitude (Fig. 4A). Efficiency was optimal for peptides with Trp, Met, or Ser at P2' as these residues increased the k_{cat}/K_m ratio. Other residues gave intermediate values. We next analyzed the impact of the P2' position on the efficiency of cleavage *in vivo* using cleavage data for this position in the 385-sequence data library. The data are displayed in Fig. 4B. They show a clear trend toward difficult cleavage when the P2' residue is Asp, Glu, Ile, Pro, or Thr. Phe and Tyr were also suggested to decrease cleavage efficiency *in vivo*, although this prediction was not consistent with the data for catalysis. Nevertheless the small number of peptides containing these residues resulted in the data not being robust enough for confident prediction of the *in vivo* behavior linked to the presence of these two aromatic amino acids at position P2' (Fig. 4B). We concluded that the kinetic data were representative of the *in vivo* efficiency of cleavage.

In a second series of investigations of the impact of position P2' in EcMAP1 cleavage, we assessed tripeptides with Thr or Val at position P1', corresponding to substrates for fastidious cleavage by EcMAP1 (i.e. zone leading to the twilight cleavage zone). A similar trend was observed for this series (Fig. 5A): Pro and Glu and, to a lesser extent, Asp and Thr at P2' were less likely to result in cleavage than other residues. If we considered only those proteins starting with Val or Thr at P1', the number of examples was significantly reduced, and the statistics were therefore not robust enough for significant conclusions to be drawn, but Glu and Pro seemed to reduce cleavage efficiency (Fig. 5B). We concluded that the cleavage of proteins with <M(V/T)(E/P) patterns was virtually impossi-

ble *in vivo* and that the cleavage of proteins with <M(V/T)(D/T) patterns was difficult (i.e. "inefficient"), resulting in partial Met retention in some cases.

The S3' Subsite of EcMAP1 Shows Negative Discrimination Similar to That for the S2' Subsite—In a final systematic search for EcMAP1 cleavage criteria, we investigated the role of position P3' and P4'. Data were obtained with a tetrapeptide, Met-Gly-Met-X, in which position X (P3') was varied with all natural amino acids (except Cys). Significant differences were observed, but only Asp, Glu, Pro, and Thr, i.e. the same residues as for P2', resulted in a significantly lower cleavage efficiency (Fig. 6A). Another set of data were obtained with a pentapeptide, Met-Gly-Gly-Gly-X, in which position X (P4') was varied with a reduced set of 10 amino acids (Fig. 6B). Phe was the most efficient, and Glu (again) was the least efficient residue. Cleavage efficiency was only modestly increased when peptides Met-Ala-Met-Lys and Met-Ala-Met-Lys-Ser were compared (Supplemental Table S1). The impact of P3' or P4' *in vivo* was investigated (Supplemental Fig. S1). Concerning position P4', a negative influence of Cys and to a lesser extent Glu and His emerged (Supplemental Fig. S1B). The set of fastidious cleavage substrates with Val and Thr at position P1' was next investigated. The very small size and the composition of the sample analyzed with Val and Thr (only 91 cases covering 18 different residues) resulted in less conclusive data than for position P2' (Supplemental Fig. S1AB). Nevertheless the negative impact of Cys, Glu, His, and Pro at P4' appeared clearly (Supplemental Fig. S1C).

FIG. 6. Comparison of the influence of the nature of the P3' and P4' positions on Met cleavage *in vitro*. A, influence of the P3' position *in vitro*. The data were obtained with the Met-Gly-Met-X peptide where X is any natural amino acid. The relative catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) is plotted as a function of X. A value of 100 was assigned to X = Gly. B, influence of the P4' position *in vitro*. The data were obtained with the Met-Gly-Gly-Gly-X peptide where X is any natural amino acid. The relative catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) is plotted as a function of X. A value of 100 was assigned to X = Ser. Arrows indicate the amino acids leading to significant decrease of cleavage efficiency in the series.



Cleavage Specificity Is Very Similar for Type-1 and Type-2 MAPs—We extended our analysis to type-2 MAP, performing the same analysis with *P. furiosus* MAP (PfMAP2), an archaeal enzyme. Little is known about the cleavage capacity of PfMAP2. Cleavage data are reported in the Takara catalog (catalog number 7335), but no detailed protocol is described. We extended our study aiming to confirm the validity of our peptide array by studying PfMAP2-mediated cleavage in detail. This enzyme was characterized under the same conditions as EcMAP1. A catalytic efficiency of $44,275 \pm 10,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, associated with $K_m = 0.9 \pm 0.2 \text{ mM}$ and $k_{cat} = 38 \pm 3 \text{ s}^{-1}$, was measured for this enzyme with Met-Gly-Met-Met, the most efficiently processed substrate studied. This catalytic efficiency is similar to that reported for EcMAP1 (see above).

We then studied a set of substrates with various residues in the P1' and P2' positions (the complete data are reported in Supplemental Table S2 and displayed in Fig. 7). For P1', the data obtained were similar to those obtained with EcMAP1 (Fig. 7A) and those available from Takara with peptide series MXAAA (where X is any natural amino acid except Cys). Thus, although MAP1 and MAP2 differ in terms of their amino acid sequences, the S1' binding pockets of these two types of enzyme have similar sieve capacities. Cleavage was optimal for Ala and Pro and minimal for Thr and Val. The enzyme

showed a strong preference for large hydrophobic side chains, such as those of Met and Trp, in the P2' position with strong hindrance observed for residues such as Glu and Pro and, to a lesser extent, Thr, Ile, and Asp (Fig. 7B). Some differences were observed between MAP1 and MAP2. For example, Ser and, to a lesser extent, Lys in P2' were less optimal for MAP2 cleavage than for MAP1 cleavage, but the presence of these residues is unlikely to have a major effect on cleavage efficiency.

Thus, the substrate specificities of PfMAP2 and EcMAP1 seem to be similar, including for instance difficult cleavage if Thr or Val is at P1' and if Glu or Pro is at P2'. This similarity was unexpected given the differences in the sequences of the two enzymes. To give access to these data for the whole community, we created a prediction tool, Terminoator2. This predictor was created as a web tool by combining php/HTML/MySQL/javascript languages to predict NME in prokaryotes (*i.e.* both eubacteria and Archaea) and other associated N-terminal modifications in eukaryotes. It is available on line at www.isv.cnrs-gif.fr/terminator2/index.html. This tool allows also complete proteomes to be analyzed (see below).

The Predicted N-terminal Proteome Shows a Strong Bias toward MAP Substrates with Respect to the Proteome Deduced from the Most Abundant Proteins—The *E. coli* data sets studied included both *in vivo* and *in vitro* studies, making

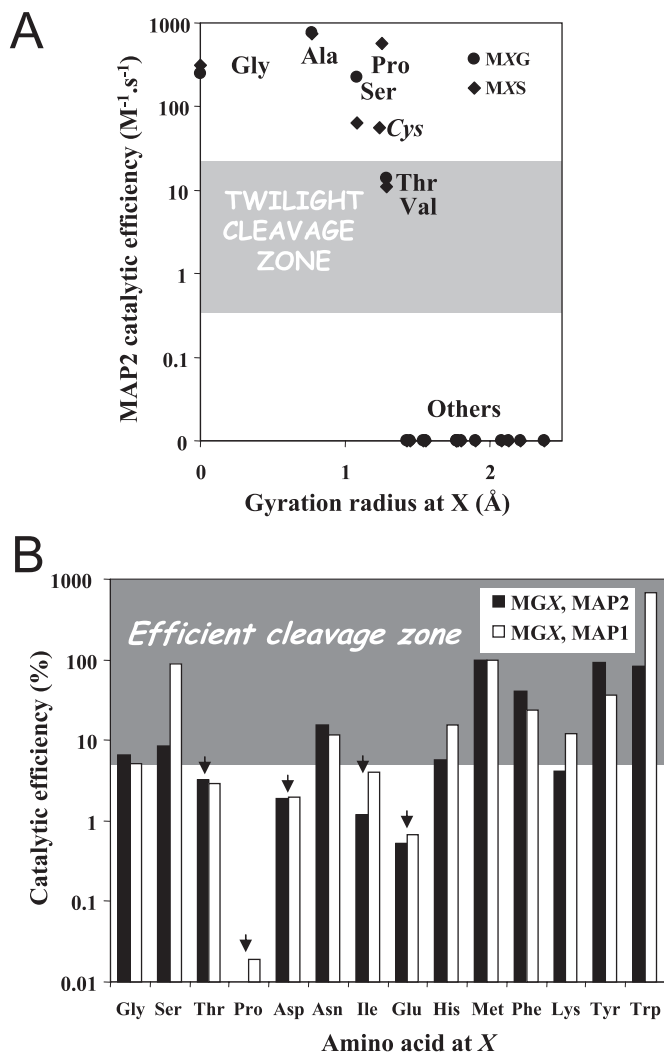


FIG. 7. Impact of P1' and P2' positions on MAP2 cleavage efficiency in vitro. A, influence of P1' *in vivo* and correlation with side-chain radius gyration (19). Two series were tested, Met-X-Gly and Met-X-Ser, where X is any amino acid. "Oth" corresponds to all natural amino acids not indicated in the figure. B, influence of the P2' position *in vitro* (black bars) and comparison with EcMAP1 (white bars). The data were obtained from the Met-Gly-X series where X is any natural amino acid. The relative catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) is plotted as a function of X. A value of 100 was assigned to X = Met in both series. Arrows indicate the amino acids leading to significant decrease of cleavage efficiency in the series.

this a unique system for further functional analysis of the impact of the N-terminal residue. In a previous analysis of the *E. coli* NME machinery, we showed that MAP was the primary determinant of the nature of the N terminus of a protein and that the most sensitive position for EcMAP1 action was position P1' (Fig. 3). We investigated the frequency and nature of particular N-terminal residues in *E. coli*. We extracted all proteins with the same penultimate (P1') residue from the complete proteome of *E. coli* (4071 entries) and calculated the percentage of proteins with each of the amino acids in the penultimate position. We compared this data set with that

calculated only for proteins with N-terminal sequences that had been determined and shown to follow the rules of NME (738 entries; Fig. 8A). All residues predicted to undergo NME, except Val, the least efficiently processed of these substrates, were underrepresented by a factor of 2–3 in the complete proteome with respect to the restricted proteome. These data suggest that the accumulation of proteins sensitive to NME is favored in bacteria. Using the MAP cleavage prediction tool, Terminoator2, and the complete proteomes of *E. coli* (representative of Gram-negative bacteria), *B. subtilis* (representative of Gram-positive bacteria), and *P. furiosus* (representative of Archaea), we predicted the N-terminal amino acid distribution. In each of these cell types, the N-terminal amino acid distribution was very similar, featuring Met as the major N-terminal residue (Fig. 8B). Residues appearing as a result of NME corresponded to less than 30% of the proteome. These data indicate that (i) *E. coli* is a good model for NME studies in prokaryotes and that (ii) NME involves only a minority of the proteins in a given proteome in contrast to the general belief.

In addition, we investigated whether these findings were biased by the lack of consideration of leader peptide removal (LPR). LPR may play an important role, in addition to MAP cleavage, in influencing the exposure of specific and functionally important N-terminal residues. Another possible bias is the dependence of NME on the residue in the P1' position and also on the residues in the P2' and P3' positions (Fig. 3B). Therefore, a second series of predictive analyses were performed based on the 4071 entries of the complete proteome of *E. coli*, taking into account both (i) the extent of LPR and (ii) Met cleavage efficiency (data shown in Fig. 3B). Statistical analysis of the restricted proteome (862 entries) was used (i) to predict the extent of LPR (14.4%) in a robust manner and (ii) to determine the nature and probability of the appearance of a new N-terminal amino acid as a result of LPR (*i.e.* Ala >> Asp, Glu, Lys > Val > Gln, His, Tyr; values indicated in the legend to Fig. 8). Our data are consistent with published results (47), which reveal a clear bias in cleavage site selection and in the nature of the amino acid unmasked at the N terminus. We used these data and the associated probabilities to calculate the mean percentage of mature proteins from the complete proteome with a given amino acid at their N terminus (Fig. 8C, black bars). As many as 60% of the proteins considered were predicted to retain their N-terminal Met residue. These data were compared with experimental data obtained by Edman N-terminal sequence determination of crude *E. coli* extracts (white bars; average of data from Refs. 8–10 and 23). The experimental data set differs from the calculated data in that only $35 \pm 5\%$ of the proteins were found to retain their N-terminal Met residue. This value is half that obtained theoretically. In contrast, both Ala and Ser appeared to be overrepresented as N-terminal residues in the experimental data sets. These data indicate that taking into account LPR is not sufficient for significant modification of the data shown in Fig. 8, A and B, and that there is indeed (i) a strong bias

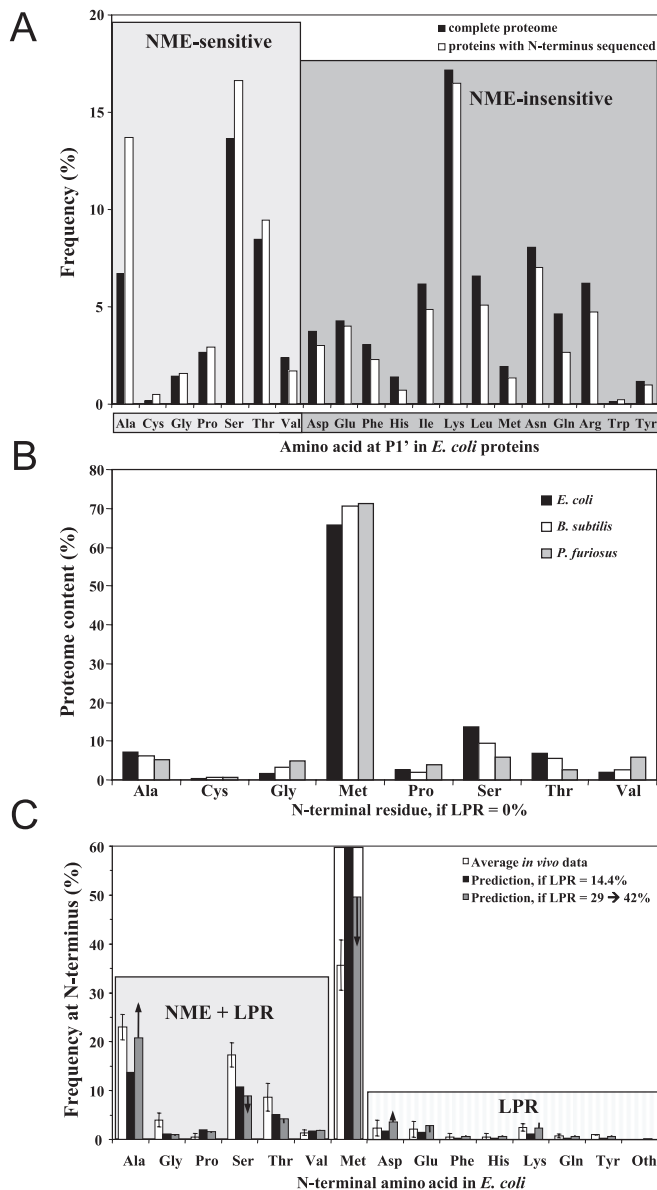


FIG. 8. Existence of a strong positive bias between proteins with an N terminus identical to that revealed by NME and proteins accumulating *in vivo*. *A*, comparison between the penultimate (P1') residues predicted in the 4071 ORFs annotated in the *E. coli* genome (black bars) and those of the 862-protein set for which the N-terminal residue has been determined by sequencing (white bars). The proteins undergoing LPR (14.4%) in this second set were excluded from the analysis. *B*, amino acids unmasked by NME in various prokaryotic proteomes. The Termino2 prediction tool was used to analyze the three complete proteomes from *E. coli*, *B. subtilis*, and *P. furiosus*. LPR was not considered and assumed to be 0 (see *C*). *C*, comparison of a model of N-terminal protein maturation *in vivo*, predicting the nature of the N-terminal residue (calculation involved the 4071 ORFs; black bars), with the average of N termini (white bars) determined from two-dimensional gel electrophoresis (data from Ref. 23) and crude extracts (data from Refs. 8–10). The bioinformatic model took into account the efficiency of NME *in vivo* as a function of the nature of the residue in the P1' position, as shown in Fig. 3B, and the LPR of 14.4% of the proteins. In this subset (data available from Ref. 23), we assumed that 57% of the proteins undergoing LPR eventually start with

toward the *in vivo* accumulation of proteins losing their N-terminal Met and/or (ii) a negative bias against proteins resistant to NME.

DISCUSSION

We report here the first extensive, coherent, and comprehensive analysis of the substrate specificity of MAP *in vitro*. Our data indicate that the P1', P2', and P3' positions of the protein substrate (*i.e.* the three residues following the first Met (P1 position)) have a major effect on cleavage efficiency. Our data were obtained with MAPs of both types: type-1, exemplified by *E. coli* MAP, and type-2, exemplified by *P. furiosus* MAP. The *E. coli* system, with a large number of available protein sequences, has provided unique information, making it possible to demonstrate a direct correlation between MAP activity *in vitro* and NME *in vivo*. Together these data indicate that the assessment of MAP catalytic efficiency *in vitro* is the best way to assess MAP cleavage efficiency *in vivo*. Based on our data, we also developed a new bioinformatics tool for improving Met cleavage prediction for prokaryotic, eubacterial and archaeal, MAPs that is available from www.isv.cnrs-gif.fr/terminator2/index.html. The prediction of Met cleavage for organellar and nucleus-encoded eukaryotic proteins is also possible via the same site using data for the prokaryotic enzyme (this work and Ref. 48).

NME Prediction of Natural Bacterial Substrates and Recombinant Proteins Overproduced in *E. coli*—The nature of position P1' in a polypeptide chain affects cleavage efficiency, depending on the nature of the amino acid, from highly efficient cleavage, as observed with Ala, to fastidious cleavage, as seen with Thr and Val. MAP k_{cat}/K_m (catalytic efficiency) and *in vivo* cleavage efficiency were found to be directly correlated (Fig. 3C). This explains why most proteins resistant to NME according to the usual rules of thumb have Val or Thr in the penultimate residue. Positions P2' and, to a lesser extent, P3' and P4' also affected cleavage probability with the same series of amino acids, Asp, Glu, Pro, and Thr, having a negative effect. A Glu or a Pro at P2' appeared to have the most negative effect. For the prediction of MAP cleavage *in vivo* directly from analysis of the N terminus of a protein, it is important to take into account whether the protein is (i) a natural protein substrate or (ii) an overproduced recombinant protein. For natural substrates, we suggest that proteins beginning with a <M(^ACGPSTV) or <M(V/T)(E/P) (note that "(^XY)" means that residues X and Y or a subset list is ex-

Ala, 12.2% with Asp, 10.2% with Glu, 8.2% with Lys, 4.1% with Val, and 2% with each of Gln, His, Phe, and Tyr, respectively. "Oth" corresponds to the sum of all the other amino acids (0.1%). This assessment was highly consistent with the data set shown in Fig. 1 (for Gram-negative bacteria) of Ref. 47. Data were calculated from the same set but with a probability of LPR of 29% (gray bars, tendency up to 42% is schematized with a black arrow on the bar) rather than 14.4% (black bars).

cluded, and “(Y/Z)” means that residue Y or Z or a subset list is included; X, Y, or Z correspond to any normal amino acid) are unlikely to be cleaved. There is a strong risk of lack of cleavage for proteins beginning with <M(G/P/V/T)(D/T)(D/E/P/T), <M(G/P/V/T)(D/T)(^DEPT)(C/E/H/P), and <M(G/P/V/T)(^DEPT)(D/E/P/T)(C/E/H/P). In this last situation, incomplete maturation *in vivo* is most likely to occur, resulting in two types of the protein: one, major with an N-terminal Met, and the other, minor without an N-terminal Met. There are already a few well documented examples of such behavior (23). These simple rules account for 60% of the proteins displaying as yet unexplained Met retention in the proteome of *E. coli*.

E. coli is widely used for the overproduction of recombinant proteins. In the last 20 years, many instances of improperly processed N termini have been reported. This recurrent issue, known as the “methionine problem” (49), has not yet been resolved. MAP cleavage is thought to become limiting because the amount of overproduced protein exceeds the capacity for MAP activity. Our findings are entirely consistent with MAP activity being the limiting factor for NME *in vivo* (Fig. 3C). They also suggest that the conclusions drawn from studies based on overproduced reporter proteins (17, 18) should be interpreted with caution. Unexpected complete or partial Met retention is known to lead to many defects, including an increase in antigenicity or a decrease in biological activity. This is true for the N-terminal nucleophile hydrolase (Ntn) family of enzymes, which use both the free N terminus and the corresponding Thr, Ser, and Cys side chains in the catalytic mechanism (50) as reviewed in Ref. 51. Before envisaging the production of a protein in *E. coli*, particularly for heterologous proteins, the NME behavior of the protein must be correctly predicted to ensure that the expected protein, with the expected N terminus, is produced. The data reported herein is particularly useful in this respect as illustrated by the following examples concerning the production of human proteins of therapeutic interest by recombinant DNA methods in *E. coli*.

“Unexpected” blockage of Met cleavage has been reported for granulocyte colony-stimulating factor (Met-Thr-Pro-Leu; see Ref. 52) and α - or β -hemoglobins (Met-Val-His-Leu; see Ref. 53). In all these cases, the overproduced protein contains a fastidious P1' (Val or Thr) residue as revealed in our study (Fig. 3), and one of these proteins also contains the most negative P2' residue, Pro. Other well documented examples of Met retention include the cytokine RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) (Met-Ser-Pro-Tyr) and the interleukins 1 β and 2 (Met-Ala-Pro-Thr/Val; see Refs. 54 and 55). For the interleukins, Met cleavage is crucial as the N-terminal Ala must interact with the C-terminal Thr-133 (56). Our study provides a rationale for the retention of Met as both Pro and Thr at positions P2' and P3' tend to inhibit Met cleavage. Another example is provided by interleukin-6, which begins with Met-Pro-Val-Pro (57). We show here that a Pro at position P3' significantly decreases the efficiency of the process. We conclude from the aforemen-

tioned examples that, when a given protein is overproduced, substrates displaying fastidious cleavage by MAP may not be completely processed by this enzyme. The prediction of MAP cleavage must therefore be more stringent than for intrinsic proteins. We suggest that processing is highly unlikely to occur for overproduced proteins beginning with <M(A/G/P/S/T)(D/E/P/T)(D/E/P/T), <M(A/G/P/S/T)(^DEPT)X(C/E/H/P), <M(A/G/P/S/T)X(^DEPT)(C/E/H/P), or <MV(D/T) and that there is a risk of non-processing for proteins beginning with <M(A/G/P/S/T)(D/E/P/T) or <MV(^DEPT), leading to partial Met retention. This rule should be useful for predicting the likelihood of cleavage for recombinant proteins. To this aim, we therefore added an option relative to the overexpression of any favorite protein in the TerminiNator2 prediction tool. If the protein has an N terminus associated with a risk of non-processing, various methods may be used to prevent Met retention: (i) adjusting expression conditions to optimize MAP activity according to the rate of protein synthesis *in vivo* (58), (ii) *in vitro* processing with purified wild-type or engineered MAP (59–62), (iii) dual co-overproduction of MAP and the protein of interest *in vivo* (25, 63, 64), (iv) processing *in vitro* or *in vivo* of the N terminus with another amino- or endoprotease (65–67), or (v) fusion of the ORF to a propeptide or ubiquitin sequence and use of endogenous signal peptidase specificity (68, 69). This last strategy has also proved successful for residues that cannot be unmasked by NME (this study, Fig. 3), such as the thrombin inhibitor hirudin, which must have Ile at its N terminus for biological activity, or human growth hormone, which must have Phe at its N terminus (70–73).

Comparison of NME Rules between Eubacteria and Archaea—In Archaea, most mature proteins have Ala, Met, Gly, Ser, Thr, or Pro at their N terminus (10). The N-terminal Met of proteins is believed to be frequently cleaved by MAP2 in Archaea, although few data are available to confirm this. This assumption is consistent with the *in vitro* data presented here (Fig. 7A). Specifically we have demonstrated that the rules governing cleavage are similar for MAP2 and MAP1, involving not only the P1' site but also the true P2' and P3' sites (Fig. 7B).

Archaea display 8–9% signal peptide cleavage, a frequency significantly lower than that in eubacteria (15–37%; Ref. 74). NME is therefore of greater importance for exposing the N termini of most proteins. The consequences of the observed differences in MAP substrate specificity for Met cleavage *in vivo* should be taken into account. In Archaea, the rules governing NME do not differ significantly from those of eubacteria with similar trends observed at P1' and P2'. We conclude that the use of identical cleavage rules should make it possible to predict NME accurately in Archaea.

Physiological Relevance of Improved NME Prediction for the *E. coli* Proteome—By improving NME prediction for natural proteins of the bacterial proteome, we were able to model the effect of this process on the whole proteome (Fig. 8). We observed an overrepresentation of proteins undergoing NME in bacteria: those that resisted the process and had se-

quences starting with a Met were underrepresented (Fig. 8C).

We tried to account for this discrepancy by modeling the impact of inadequate LPR assessment. The frequency of LPR used (14.4%) was directly deduced from data obtained from the 862-protein database. Interestingly this value is identical to that obtained from bioinformatics analysis using a maximal stringency cutoff applied to the complete proteome of *Haemophilus influenzae* (14% in Ref. 47). *H. influenzae* is a Gram-negative bacterium closely related to *E. coli* but with a significantly lower (by a factor of 2.5) number of associated ORFs (75). Doolittle (75) estimated that the signal peptide cleavage frequency might reach 15–20%, which is slightly higher than the frequency used here. A maximal value of 28% was proposed with lower stringency scoring. This value is consistent with other predictions of 25% in *H. influenzae* and 29% in *E. coli* (74). A higher frequency of signal peptide cleavage might therefore account for the bias observed in the distribution of N-terminal amino acids. It should be borne in mind that the proteins analyzed correspond to a class of proteins with a compartmentation bias as these proteins are (i) soluble (as opposed to membrane proteins) and (ii) not secreted outside the bacterium as the only secreted proteins that can be retrieved by the fractionation strategies used are those exported to the periplasmic space. LPR is thought to be frequent in membrane and secreted proteins. We therefore modeled the impact of increasing LPR frequency. Only a huge increase in the proportion of these proteins to 42% (3 times experimental values) gave a satisfactory fit of N-terminal Met frequencies to the experimental values (Fig. 8C, *end of arrows in gray bars*). However, the correlation with Ala, Ser, and Thr was very weak with this value. Finally this value of 42% is much higher than the upper value of 29% proposed previously (74). A value of 29% gave a much better fit to the data (Fig. 8C, *gray bars*). We conclude that the protein pool undergoing signal peptide cleavage is probably underestimated in our study but that this underestimation alone is unlikely to account for the trend observed toward a lower content of proteins retaining their N-terminal Met.

Most of the data for the 862-sequence compilation concerned proteins extracted by two-dimensional gel electrophoresis (23). As a result of this, these proteins were probably the most abundant proteins in the bacterium. Another possible reason for the poor correlation between the data sets in Fig. 8C is likely due to the assumption that the genes for these abundant proteins may have been selected to encode residues such as Ala or Ser at P1' so that their N-terminal Met is efficiently cleaved and recycled. Met is indeed an "expensive" amino acid to biosynthesize. The capacity to recover a majority of the N-terminal Met (*i.e.* especially those corresponding to the most abundant proteins) could have been favored throughout bacterial evolution (see also concluding remarks in Ref. 21 for further discussion). One could also suggest that all or some of the proteins retaining their N-terminal Met are likely to be less stable. Recent data obtained in the search for

proteins cleaved by the ClpAXP proteolytic machinery of *E. coli* have indeed identified an N-terminal motif including an N-terminal Met. The recurring N-terminal motif <MKΦΦXΦ (where Φ is any hydrophobic amino acid and X is any amino acid) is involved in cleavage by the bacterial ClpAXP protease (76). This hypothesis seems likely given that Lys is the most frequent amino acid in position 2 (Fig. 8A) and prevents NME. However, a less stringent motif would be required to obtain a better fit to the experimental values. It should be noted that a single proteolytic cleavage of a mature protein by cellular machinery other than a leader peptidase and ClpAXP may lead to enhanced protein degradation. This hypothesis, in which protein half-life and signal peptide prediction accounts for the amino acid bias observed in experimentally determined protein N termini with respect to proteomic predictions, may also account for the accumulation of fewer proteins with an N-Met than predicted on the basis of the genome sequence (Fig. 8B).

Generalization, Introducing a Bioinformatics Tool to Predict NME—We show here that detailed characterization of the catalytic efficiency of MAP can be used to predict the *in vivo* Met cleavage of any protein of a given proteome. NME prediction within the proteome is indeed crucial as a database of protein N termini as representative (*i.e.* about 20%) as that available for *E. coli* will probably never be available for any other organism. However, published data for the two cytosolic *Saccharomyces cerevisiae* MAPs (ScMAPs) suggest that the substrate specificity of these enzymes may differ from that of prokaryotic MAPs. For example, studies of ScMAP1 have shown fastidious processing of peptides with Pro at P1' or with Val or Thr in this position (Fig. 4A in Ref. 40). Studies with ScMAP2 and low concentrations of peptide (*i.e.* mimicking k_{cat}/K_m conditions) have suggested fastidious processing for peptides with Pro at P1' but not with Val in this position (Table V in Ref. 77). Thus, in higher eukaryotes, prediction is complicated by the occurrence of at least one MAP1 and one MAP2, which do not necessarily have identical specificities. If the two enzymes have similar specific activities *in vivo*, cleavage efficiency is likely to be increased. However, this does not appear to be the case in yeast in which MAP1 behaves as the most active, major MAP (78). Data on relative MAP expression and regulation are therefore required to complement prediction algorithms.

The associated crucial physiological consequences, such as protein stabilization associated with Met removal, highlight the importance of correctly predicting the N termini of proteins as recently reported for higher eukaryotes (48). Further detailed kinetic characterization of the actual substrate specificity of each eukaryotic MAP is required to increase the confidence of predictions made with this tool.

* This work was supported by the CNRS (France), CNRS (France) Grant PGP04-11, Fonds National de la Science (France) Grant BCMS-275, Association pour la Recherche sur le Cancer (Villejuif,

France) Grant 3603, and National Science Foundation Grant CHE-0549221. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ The on-line version of this article (available at <http://www.mcponline.org>) contains supplemental material.

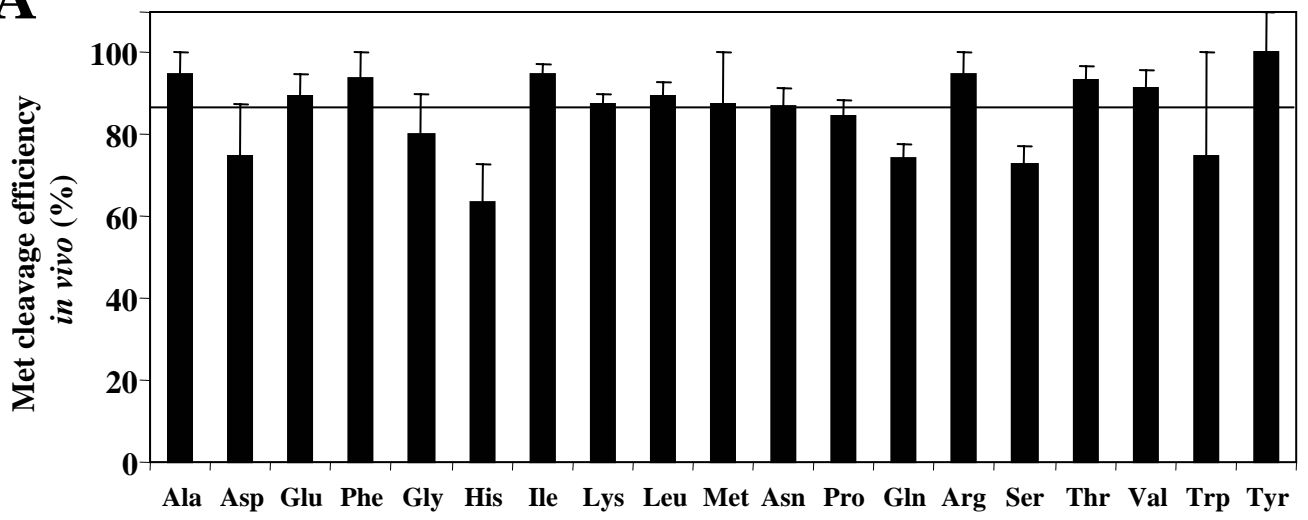
§ Both first authors contributed equally to this work.

** To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33169823612; Fax: 33169823607; E-mail: thierry.meinzel@isv.cnrs-gif.fr.

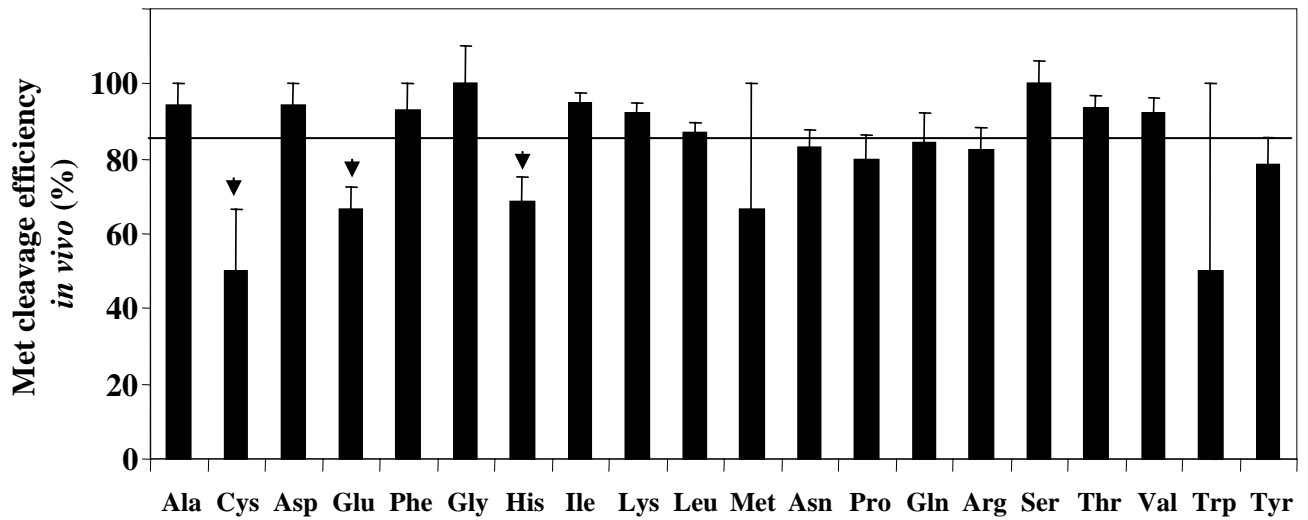
REFERENCES

1. Bradshaw, R. A., Brickey, W. W., and Walker, K. W. (1998) N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N α -acetyl transferase families. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 263–267
2. Giglione, C., Boularot, A., and Meinzel, T. (2004) Protein N-terminal methionine excision. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1455–1474
3. Lowther, W. T., and Matthews, B. W. (2000) Structure and function of the methionine aminopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 157–167
4. Addlagatta, A., Hu, X., Liu, J. O., and Matthews, B. W. (2005) Structural basis for the functional differences between type I and type II human methionine aminopeptidases. *Biochemistry* **44**, 14741–14749
5. Giglione, C., Pierre, M., and Meinzel, T. (2000) Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents. *Mol. Microbiol.* **36**, 1197–1205
6. Solbiati, J., Chapman-Smith, A., Miller, J. L., Miller, C. G., and Cronan, J. E., Jr. (1999) Processing of the N termini of nascent polypeptide chains requires deformylation prior to methionine removal. *J. Mol. Biol.* **290**, 607–614
7. Giglione, C., and Meinzel, T. (2001) Organellar peptide deformylases: universality of the N-terminal methionine cleavage mechanism. *Trends Plant Sci.* **6**, 566–572
8. Waller, J.-P. (1963) The NH $_2$ -terminal residue of the proteins from cell-free extract of *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **7**, 483–496
9. Brown, J. L. (1970) The N-terminal region of soluble proteins from prokaryotes and eucaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **221**, 480–488
10. Matheson, A. T., Yaguchi, M., and Visentin, L. P. (1975) The conservation of amino acids in the N-terminal position of ribosomal and cytosol proteins from *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus*, and *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Biochem.* **53**, 1323–1327
11. Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157–162
12. Miller, C. G. (1975) Peptidases and proteases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Annu. Rev. Microbiol.* **29**, 485–504
13. Miller, C. G. (1987) Protein degradation and proteolytic modification, in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H. E., eds) pp. 680–691, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
14. Flinta, C., Persson, B., Jomvall, H., and von Heijne, G. (1986) Sequence determinants of cytosolic N-terminal protein processing. *Eur. J. Biochem.* **154**, 193–196
15. Miller, C. G., Strauch, K. L., Kukral, A. M., Miller, J. L., Wingfield, P. T., Mazzei, G. J., Werlen, R. C., Graber, P., and Movva, N. R. (1987) N-terminal methionine-specific peptidase in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2718–2722
16. Ben-Bassat, A., Bauer, K., Chang, S.-Y., Myambo, K., Boosman, A., and Chang, S. (1987) Processing of the initiation methionine from proteins: Properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. *J. Bacteriol.* **169**, 751–757
17. Dalboge, H., Bayne, S., and Pedersen, J. (1990) *In vivo* processing of N-terminal methionine in *E. coli*. *FEBS Lett.* **266**, 1–3
18. Hirel, P. H., Schmitter, M. J., Dessen, P., Fayat, G., and Blanquet, S. (1989) Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 8247–8251
19. Levitt, M. (1976) A simplified representation of protein conformations for rapid simulation of protein folding. *J. Mol. Biol.* **104**, 59–107
20. Sherman, F., Stewart, J. W., and Tsunasawa, S. (1985) Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *BioEssays* **3**, 27–31
21. Meinzel, T., Mechulam, Y., and Blanquet, S. (1993) Methionine as translation start signal: a review of the enzymes of the pathway in *Escherichia coli*. *Biochimie (Paris)* **75**, 1061–1075
22. Demirev, P. A., Lin, J. S., Pineda, F. J., and Fenselaut, C. (2001) Bioinformatics and mass spectrometry for microorganism identification: proteome-wide post-translational modifications and database search algorithms for characterization of intact *H. pylori*. *Anal. Chem.* **73**, 4566–4573
23. Link, A. J., Robison, K., and Church, G. M. (1997) Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* **18**, 1259–1313
24. Wasinger, V. C., and Humphery-Smith, I. (1998) Small genes/gene-products in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**, 375–382
25. Ben-Bassat, A., and Bauer, K. (1987) Amino-terminal processing of proteins. *Nature* **326**, 315
26. Olson, K. C., Fenno, J., Lin, N., Harkins, R. N., Snider, C., Kohr, W. H., Ross, M. J., Fodge, D., Prender, G., and Stebbing, N. (1981) Purified human growth hormone from *E. coli* is biologically active. *Nature* **293**, 408–411
27. Boufous, H., and Vadeboncoeur, C. (2003) Purification and characterization of the *Streptococcus salivarius* methionine aminopeptidase (MetAP). *Biochimie (Paris)* **85**, 993–997
28. Ragusa, S., Blanquet, S., and Meinzel, T. (1998) Control of peptide deformylase activity by metal cations. *J. Mol. Biol.* **280**, 515–523
29. Mayaux, J. F., Soubrier, F., and Latta, M. (1987) Cloning *E. coli* genes by oligonucleotide hybridization. *Nucleic Acids Res.* **15**, 10593–10594
30. Meng, L., Ruebush, S., D'Souza, V. M., Copik, A. J., Tsunasawa, S., and Holz, R. C. (2002) Overexpression and divalent metal binding properties of the methionyl aminopeptidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* **41**, 7199–7208
31. Massey, V., and Curti, B. (1967) On the reaction mechanism of *Crotalus adamanteus* L-amino acid oxidase. *J. Biol. Chem.* **242**, 1259–1264
32. Lewis, W. H., and Harris, H. (1967) Human red cell peptidases. *Nature* **215**, 351–355
33. Carter, T. H., and Miller, C. G. (1984) Aspartate-specific peptidases in *Salmonella typhimurium*: mutants deficient in peptidase E. *J. Bacteriol.* **159**, 453–459
34. Dardel, F. (1994) MC-Fit: using Monte-Carlo methods to get accurate confidence limits on enzyme parameters. *Comput. Appl. Biosci.* **10**, 273–275
35. Rudd, K. E. (2000) EcoGene: a genome sequence database for *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **28**, 60–64
36. Cockwell, K. Y., and Giles, I. G. (1989) Software tools for motif and pattern scanning: program descriptions including a universal sequence reading algorithm. *Comput. Appl. Biosci.* **5**, 227–232
37. Walker, K. W., Yi, E., and Bradshaw, R. A. (1999) Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) methionine aminopeptidase I: rapid purification and improved activity assay. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 157–163
38. Zhou, Y., Guo, X. C., Yi, T., Yoshimoto, T., and Pei, D. (2000) Two continuous spectrophotometric assays for methionine aminopeptidase. *Anal. Biochem.* **280**, 159–165
39. Larrabee, J. A., Thamrong-Nawasawat, T., and Mon, S. Y. (1999) High-pressure liquid chromatographic method for the assay of methionine aminopeptidase activity: application to the study of enzymatic inactivation. *Anal. Biochem.* **269**, 194–198
40. Walker, K. W., and Bradshaw, R. A. (1999) Yeast methionine aminopeptidase I. Alteration of substrate specificity by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 13403–13409
41. Lowther, W. T., Orville, A. M., Madden, D. T., Lim, S., Rich, D. H., and Matthews, B. W. (1999) *Escherichia coli* methionine aminopeptidase: implications of crystallographic analyses of the native, mutant, and inhibited enzymes for the mechanism of catalysis. *Biochemistry* **38**, 7678–7688
42. Schurmann, M., and Sprenger, G. A. (2001) Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *J. Biol. Chem.* **276**, 11055–11061
43. Zavitz, K. H., DiGate, R. J., and Mariani, K. J. (1991) The *prfB* and *prfC* replication proteins of *Escherichia coli*. Genes, DNA sequence, overexpression, and purification. *J. Biol. Chem.* **266**, 13988–13995
44. Poulsen, P., Jensen, K. F., Valentin-Hansen, P., Carlsson, P., and Lundberg, L. G. (1983) Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *pyrE* gene and of the DNA in front of the protein-coding region. *Eur. J. Biochem.*

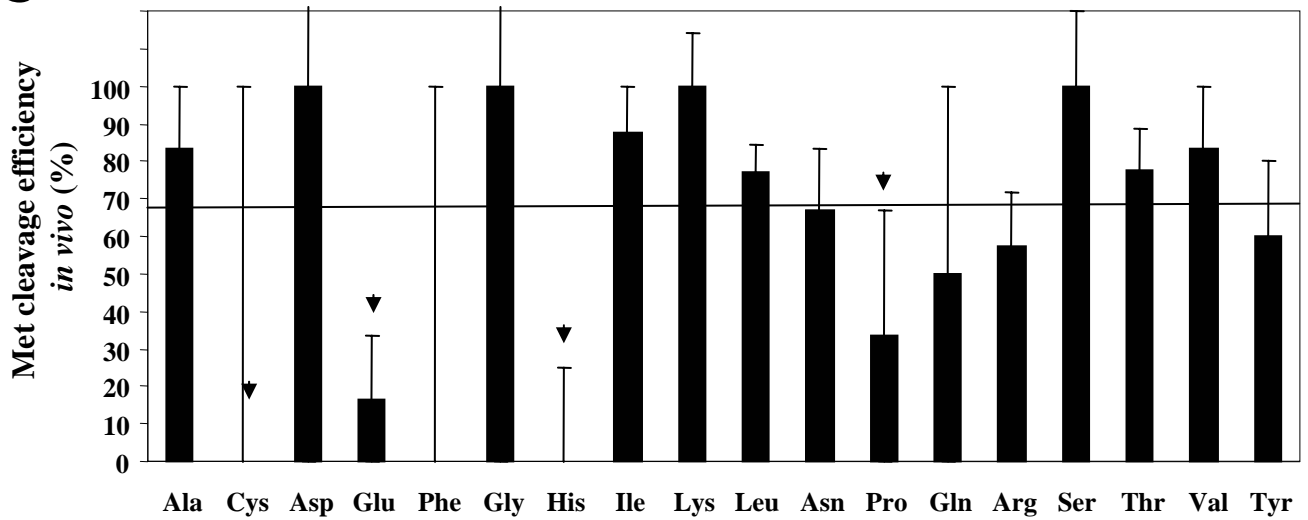
- 135, 223–229
45. Sheff, D. R., and Rubenstein, P. A. (1992) Isolation and characterization of the rat liver actin N-acetylaminopeptidase. *J. Biol. Chem.* **267**, 20217–20224
 46. Polevoda, B., and Sherman, F. (2000) N α -terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 36479–36482
 47. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1–6
 48. Meinel, T., Peynot, P., and Giglione, C. (2005) Processed N-termini of mature proteins in higher eukaryotes and their major contribution to dynamic proteomics. *Biochimie (Paris)* **87**, 701–712
 49. Bialy, H. (1989) The methionine problem solved, ubiquitously. *Bio/Technology* **7**, 649
 50. Brannigan, J. A., Dodson, G., Duggleby, H. J., Moody, P. C., Smith, J. L., Tomchick, D. R., and Murzin, A. G. (1995) A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* **378**, 416–419
 51. Meinel, T., Serero, A., and Giglione, C. (2006) Impact of the N-terminal amino acid on targeted protein degradation. *Biol. Chem.* **87**, 839–851
 52. Devlin, P. E., Drummond, R. J., Toy, P., Mark, D. F., Watt, K. W., and Devlin, J. J. (1988) Alteration of amino-terminal codons of human granulocyte-colony-stimulating factor increases expression levels and allows efficient processing by methionine aminopeptidase in *Escherichia coli*. *Gene (Amst.)* **65**, 13–22
 53. Shen, T. J., Ho, N. T., Simplaceanu, V., Zou, M., Green, B. N., Tam, M. F., and Ho, C. (1993) Production of unmodified human adult hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8108–8112
 54. Liang, S. M., Allet, B., Rose, K., Hirschi, M., Liang, C. M., and Thatcher, D. R. (1985) Characterization of human interleukin 2 derived from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **229**, 429–439
 55. Kikumoto, Y., Hong, Y. M., Nishida, T., Nakai, S., Masui, Y., and Hirai, Y. (1987) Purification and characterization of recombinant human interleukin-1 beta produced in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 315–321
 56. Endo, S., Yamamoto, Y., Sugawara, T., Nishimura, O., and Fujino, M. (2001) The additional methionine residue at the N-terminus of bacterially expressed human interleukin-2 affects the interaction between the N- and C-termini. *Biochemistry* **40**, 914–919
 57. Yasueda, H., Nagase, K., Hosoda, A., Akiyama, Y., and Yamada, K. (1990) High-level direct expression of semi-synthetic human interleukin-6 in *Escherichia coli* and production of N-terminus met-free product. *Bio-technology (N. Y.)* **8**, 1036–1040
 58. Covalt, J. C., Jr., Cao, T. B., Magdaroag, J. R., Gross, L. A., and Jennings, P. A. (2005) Temperature, media, and point of induction affect the N-terminal processing of interleukin-1 β . *Protein Expr. Purif.* **41**, 45–52
 59. Nakagawa, S., Yamada, T., Kato, K., and Nishimura, O. (1987) Enzymatic cleavage of amino terminal methionine from recombinant human interleukin 2 and growth hormone by aminopeptidase M. *Bio/Technology* **5**, 824–827
 60. Ben-Bassat, A., Bauer, K., Chang, S., and Chang, S.-Y. (May 7, 1991) Bacterial methionine N-terminal peptidase. U. S. Patent 5,013,662
 61. Liao, Y. D., Jeng, J. C., Wang, C. F., Wang, S. C., and Chang, S. T. (2004) Removal of N-terminal methionine from recombinant proteins by engineered *E. coli* methionine aminopeptidase. *Protein Sci.* **13**, 1802–1810
 62. Liu, L. F., Hsieh, C. H., Liu, P. F., Tsai, S. P., and Tam, M. F. (2004) *Escherichia coli* methionine aminopeptidase with Tyr168 to alanine substitution can improve the N-terminal processing of recombinant proteins with valine at the penultimate position. *Anal. Biochem.* **329**, 345–347
 63. Shen, T. J., Ho, N. T., Zou, M., Sun, D. P., Cottam, P. F., Simplaceanu, V., Tam, M. F., Bell, D. A., Jr., and Ho, C. (1997) Production of human normal adult and fetal hemoglobins in *Escherichia coli*. *Protein Eng.* **10**, 1085–1097
 64. Hwang, D. D., Liu, L. F., Kuan, I. C., Lin, L. Y., Tam, T. C., and Tam, M. F. (1999) Co-expression of glutathione S-transferase with methionine aminopeptidase: a system of producing enriched N-terminal processed proteins in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **338**, 335–342
 65. Yasueda, H., Kikuchi, Y., Kojima, H., and Nagase, K. (1991) In-vivo processing of the initiator methionine from recombinant methionyl human interleukin-6 synthesized in *Escherichia coli* overproducing aminopeptidase-P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 211–215
 66. Latta, M., Knapp, M., Sarmientos, P., Bréfert, G., Becquart, J., Guerrier, L., Jung, G., and Mayaux, J.-F. (1987) Synthesis and purification of mature human serum albumin from *E. coli*. *Bio/Technology* **5**, 1309–1314
 67. Dalboge, H., Dahl, H.-H.M., Pedersen, J., Hansen, J., and Christensen, T. (1987) A novel enzymatic method for production of authentic hGH from an *Escherichia coli* produced hGH precursor. *Bio/Technology* **5**, 161–164
 68. Miller, H. I., Henzel, W. J., Ridgway, J. B., Kuang, W. J., Chisholm, V., and Liu, C. C. (1989) Cloning and expression of a yeast ubiquitin-protein cleaving activity in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* **7**, 698–704
 69. Soares, C. R., Gomide, F. I., Ueda, E. K., and Bartolini, P. (2003) Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the APL promoter: use of HPLC for product quantification. *Protein Eng.* **16**, 1131–1138
 70. Kohr, W. J., Keck, R., and Harkins, R. N. (1982) Characterization of intact and trypsin-digested biosynthetic human growth hormone by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **122**, 348–359
 71. Becker, G. W., and Hsiung, H. M. (1986) Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. Purification and characterization. *FEBS Lett.* **204**, 145–150
 72. Loison, G., Findelli, A., Bernard, S., Nguyen-Juilleret, M., Marquet, M., Riehl-Bellon, N., Carvallo, D., Guerra-Santos, L., Brown, S., Courtney, M., Roitsch, C., and Lemoine, Y. (1988) Expression and secretion of biologically active leech hirudin. *Bio/Technology* **6**, 72–77
 73. Sabin, E. A., Lee-Ng, C. T., Shuster, J. R., and Barr, P. J. (1989) High-level expression and *in vivo* processing of chimeric ubiquitin fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technology* **7**, 705–709
 74. Saleh, M. T., Fillon, M., Brennan, P. J., and Belisle, J. T. (2001) Identification of putative exported/secreted proteins in prokaryotic proteomes. *Gene (Amst.)* **269**, 195–204
 75. Doolittle, R. F. (1997) Microbial genomes opened up. *Nature* **392**, 339–342
 76. Flynn, J. M., Neher, S. B., Kim, Y. I., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol. Cell* **11**, 671–683
 77. Kendall, R. L., and Bradshaw, R. A. (1992) Isolation and characterization of the methionine aminopeptidase from porcine liver responsible for the co-translational processing of proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 20667–20673
 78. Chen, S., Vetro, J. A., and Chang, Y. H. (2002) The specificity *in vivo* of two distinct methionine aminopeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **398**, 87–93
 79. Fersht, A. R. (1998) *Structure and Mechanism in Protein Science*, pp. 103–129, W. H. Freeman & Co., New York

A**B**

Amino acid at position P3' (any residue at P1')



Amino acid at position P4' (any residue at P1')

C

Amino acid at position P4' (with Thr or Val at P1')

Fig.S1

Table S1: Catalytic parameters of Met cleavage by EcMAP for the complete set of peptides used in the study

Peptide length	Peptide	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ .s ⁻¹)
2	CG	nm*	nm*	nm*
	MA	nm*	nm*	1.1 ± 0.2
	MG	nm*	nm*	0.28 ± 0.03
3	MVD	nm	nm	0.5 ± 0.2
	MVE	nm	nm	<0.01
	MVG	15±8	0.04±0.02	2.5 ± 0.3
	MVK	8±3	0.011±0.002	1.6 ± 0.3
	MVP	nm	nm	<0.01
	MVQ	2.9±1.2	0.010±0.001	3.3 ± 1.0
	MVT	nm	nm	0.25 ± 0.04
	MTD	1.1±0.6	0.008±0.002	7.7 ± 0.8
	MTH	2.4±0.1	0.054±0.005	22.5 ± 2.3
	MTI	3.4±0.8	0.11±0.02	32 ± 3
	MTM	5.4±3.0	0.29±0.09	54 ± 10
	MTT	3.1±0.6	0.034±0.003	11 ± 1
	MAE	>8	1.0±0.2	127 ± 10
	MAK	10±4	3.1±1.0	325 ± 25
	MAM	0.54±0.05	4.0±0.1	7425 ± 721
	MAP	2.6±0.8	0.026±0.004	10 ± 1
	MAdS	3.2±1.6	0.67±0.16	211 ± 16
	MAT	1.9±0.1	0.96±0.02	508 ± 29
	MAW	0.03±0.01	1.9±0.1	58005 ± 17850
	AAA	>8	nm	<0.01
	AbaAS	nm	nm	<0.01
	LAS	7±1	0.0032±0.0003	0.5 ± 0.1
	NleAS	3.6±0.6	2.9±0.2	803 ± 79
	MoxAS	2.6±1.3	0.021±0.005	8.1 ± 1.1
	NvaAS	5±1	0.046±0.006	9.2 ± 2.6
	FAS	5.5±1.5	0.034±0.005	6.2 ± 1.9
MdAS	1.0±0.1	2.99±0.04	3008 ± 184	
MAS	1.8±0.6	3.1±0.6	1722 ± 206	

3	MAbaS	2.2±0.9	0.68±0.16	315 ± 60
	MCS	nm*	nm	nm*
	MNvaS	26±10	0.031±0.010	1.2 ± 0.2
	M2mAS	nm	nm	<0.01
	MOxaS	nm	nm	<0.01
	MDS	nm	nm	<0.01
	MES	nm	nm	<0.01
	MGS	3.5±0.9	0.49±0.05	140 ± 19
	MKS	nm	nm	<0.01
	MNS	nm	nm	<0.01
	MMM	nm	nm	<0.01
	MPS	1.8±0.4	0.26±0.03	144 ± 39
	MRS	nm	nm	<0.01
	MSS	1.0±0.5	0.53±0.12	517 ± 290
	MTS	>3	nm	6.4 ± 1
	MVS	6.4±3.1	0.015±0.004	2.3 ± 0.3
	MYS	nm	nm	<0.01
	MAG	1.5±0.4	1.7±0.1	1110 ± 316
	MDG	nm	nm	<0.01
	MFG	nm	nm	<0.01
	MGG	6.5±2.0	0.14±0.02	8.1 ± 3
	MIG	nm	nm	<0.01
	MLG	nm	nm	<0.01
	MPG	3.5±1.6	0.67±0.14	192 ± 113
	MQG	nm	nm	<0.01
	MSG	2.6±0.5	1.2±0.1	453 ± 89
	MTG	3.1±0.7	0.094±0.012	30 ± 8
	MWG	nm	nm	<0.01
	MGNva	5.0±1.8	0.16±0.03	32 ± 3
	MGAb	6.4±1.7	0.17±0.01	27 ± 2
MGA	1.5±0.2	0.09±0.01	60 ± 6	
MGD	4.6±0.6	0.014±0.010	3.1 ± 0.3	
MGE	10.5±1.8	0.011±0.001	1.1 ± 0.2	
MGF	4.0±0.2	0.15±0.01	38 ± 3	

3	MGH	1.6±0.5	0.040±0.006	24 ± 3
	MGI	9.2±2.1	0.06±0.01	6.3 ± 1.7
	MGK	4.1±0.7	0.08±0.01	19 ± 4
	MGL	2.7±0.4	0.11±0.01	39 ± 5
	MGM	4.3±0.9	0.69±0.05	159 ± 35
	MGN	3.0±0.7	0.06±0.01	19 ± 1
	MGP	nm	nm	<0.01
	MGQ	5.1±0.4	0.086±0.005	17 ± 2
	MGR	>10	nm	20 ± 2
	MGT	11±3	0.07±0.01	6.4 ± 1.1
	MGV	6.1±3.6	0.08±0.03	13.5 ± 1.3
	MGW	0.16±0.01	0.17±0.01	1057 ± 189
	MGY	2.5±0.2	0.15±0.01	57 ± 5
4	MGMA	1.6±0.7	1.2±0.3	758 ± 76
	MGMD	3.6±0.6	0.15±0.01	40.8 ± 7.5
	MGME	>18	nm	250 ± 50
	MGMF	2.3±0.9	1.3±0.3	564 ± 60
	MGMG	1.6±0.1	1.6±0.1	1085 ± 120
	MGMH	0.5±0.1	2.5±0.4	5480 ± 550
	MGMI	1.2±0.6	1.0±0.2	842 ± 84
	MGMK	0.8±0.3	1.2±0.2	1488 ± 140
	MGML	2.2±0.6	1.0±0.1	433 ± 40
	MGMM	2.0±0.6	2.4±0.2	1173 ± 107
	MGMN	0.7±0.3	0.93±0.16	1384 ± 120
	MGMP	0.4±0.1	0.082±0.008	206 ± 90
	MGMQ	1.9±0.7	0.9±0.1	488 ± 50
	MGMR	2.0±0.4	2.1±0.2	1057 ± 80
	MGMS	1.2±0.5	1.3±0.3	1064 ± 106
	MGMT	>8	nm	208 ± 18
	MGMV	1.8±0.7	0.8±0.1	432 ± 42
	MGMW	0.5±0.2	1.7±0.6	3411 ± 500
MGMY	3.6±0.2	1.22±0.03	342 ± 38	
MAMK	0.12±0.01	4.2±0.1	35238 ± 3077	
MDMK	>4	nm	<0.1	

4	MENK	>4	nm	<0.1
	MFNK	>4	nm	<0.1
	MIMK	>4	nm	3 ± 1
	MKMK	>4	nm	<0.1
	MLMK	>4	nm	<0.1
	MNMK	>4	nm	1.8 ± 0.3
	MPMK	0.70±0.11	2.6±0.1	3646 ± 360
	MQMK	>4	nm	<0.1
	MRMK	>4	nm	<0.1
	MSMK	0.30±0.06	3.2±0.2	10760 ± 1200
	MTMK	2.0±0.1	0.45±0.02	228 ± 17
	MVMK	>6	nm	42 ± 4
	MRFA	nm	nm	<0.1
	MGGG	>8	nm	31.5 ± 3.0
5	MGGM	1.9±0.5	0.47±0.05	247 ± 27
	MGGGE	1.3±0.3	0.09±0.01	43 ± 4
	MGGGF	1.60±0.24	1.13±0.08	709 ± 70
	MGGGG	4.8±1.7	0.045±0.09	93 ± 9
	MGGGH	>6	>1	218 ± 20
	MGGGI	1.94±0.42	1.17±0.11	601 ± 60
	MGGGK	4.8±1.1	1.0±0.1	211 ± 21
	MGGGM	5.1±2.7	0.84±0.26	166 ± 15
	MGGGN	2.7±1.0	0.39±0.08	146 ± 14
	MGGGP	0.98±0.17	0.46±0.03	469 ± 86
	MGGGS	2.8±0.8	0.7±0.1	254 ± 24
6	MAMKS	0.05±0.01	3.9±0.2	82000 ± 8000
	MGGGGG	2.1±0.2	0.65±0.03	308 ± 31
	MGGGGM	2.6±0.2	0.98±0.03	372 ± 5
	MAWHIS	0.027±.002	2.58±0.05	96000 ± 5000

See text for meaning of the abbreviations of unusual aminoacids, d is for a D enantiomer
^a nm means not measurable; * means that the measurement was not compatible with the assay.

Table S2: Catalytic parameters of Met cleavage by PfMAP for a selected set of peptides

Peptide	K_m (mM) ^a	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ .s ⁻¹) ^a
MAG	1.8 ± 0.1	1.37 ± 0.04	776 ± 97
MSG	7.0 ± 2.1	1.58 ± 0.30	224 ± 18
MGG	2.0 ± 0.2	0.48 ± 0.02	245 ± 25
MVG	2.9 ± 0.1	0.040 ± 0.001	14 ± 1
MTG	0.9 ± 0.1	0.07 ± 0.00	80 ± 14
MSS	1.8 ± 0.2	0.11 ± 0.01	63 ± 6
MAS	4.9 ± 0.6	3.7 ± 0.2	751 ± 42
MPS	1.4 ± 0.5	0.80 ± 0.14	575 ± 36
MTS	0.9 ± 0.2	0.048 ± 0.004	55 ± 7
MVS	3.3 ± 1.4	0.04 ± 0.01	11 ± 1
MGS	0.9 ± 0.1	0.30 ± 0.01	314 ± 48
MDS	nm	nm	< 0.002
MNS	nm	nm	< 0.002
MES	nm	nm	< 0.002
MKS	nm	nm	< 0.002
MYS	nm	nm	< 0.002
MRS	nm	nm	< 0.002
MGK	2.3 ± 0.4	0.36 ± 0.03	154 ± 19
MGH	1.1 ± 0.2	0.23 ± 0.02	212 ± 25
MGE	2.9 ± 0.9	0.06 ± 0.01	19 ± 2
MGI	3.3 ± 0.6	0.15 ± 0.01	45 ± 4
MGT	2.2 ± 0.3	0.26 ± 0.01	119 ± 13
MGF	3.6 ± 1.1	5.4 ± 0.9	1524 ± 135
MGY	0.9 ± 0.2	3.1 ± 0.2	3395 ± 442
MGM	4.8 ± 1.0	18 ± 2	3703 ± 213
MGW	0.04 ± 0.01	0.13 ± 0.01	3099 ± 286
MGD	0.62 ± 0.14	0.043 ± 0.004	69 ± 8
MGP	>30	>0.2	0.32 ± 0.02
MGN	0.7 ± 0.2	0.39 ± 0.03	574 ± 70
MAMK	1.0 ± 0.2	10.8 ± 0.8	11300 ± 800
MGMM	0.9 ± 0.2	38 ± 3	44300 ± 3000

^a nm means that the value was not measurable within the sensitivity of the assay as no Met cleavage was observed at the highest PfMAP concentrations; the lowest detectable value corresponds to a k_{cat}/K_m value of 0.002 M⁻¹.s⁻¹

Bibliographie

- [1] F. Frottin, C. Espagne, J. A. Traverso, C. Mauve, B. Valot, C. Lelarge-Trouverie, M. Zivy, G. Noctor, T. Meinnel, and C. Giglione, “Cotranslational proteolysis dominates glutathione homeostasis to support proper growth and development.,” *Plant Cell*, vol. 21, pp. 3296–3314, Oct 2009.
- [2] P. Cohen, “The origins of protein phosphorylation.,” *Nat Cell Biol*, vol. 4, pp. E127–E130, May 2002.
- [3] G. Walsh and R. Jefferis, “Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins.,” *Nat Biotechnol*, vol. 24, pp. 1241–1252, Oct 2006.
- [4] D. Nandi, P. Tahiliani, A. Kumar, and D. Chandu, “The ubiquitin-proteasome system.,” *J Biosci*, vol. 31, pp. 137–155, Mar 2006.
- [5] E. R. Stadtman and R. L. Levine, “Protein oxidation.,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 899, pp. 191–208, 2000.
- [6] T. A. Farazi, G. Waksman, and J. I. Gordon, “The biology and enzymology of protein n-myristoylation.,” *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 39501–39504, Oct 2001.
- [7] J. Moskovitz and D. B. Oien, “Protein carbonyl and the methionine sulfoxide reductase system.,” *Antioxid Redox Signal*, vol. 12, pp. 405–415, Mar 2010.
- [8] N. Rouhier, S. D. Lemaire, and J.-P. Jacquot, “The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation.,” *Annu Rev Plant Biol*, vol. 59, pp. 143–166, 2008.
- [9] A. Ciechanover, “Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome.,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 6, pp. 79–87, Jan 2005.
- [10] C. López-Otín and C. M. Overall, “Protease degradomics: a new challenge for proteomics.,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 3, pp. 509–519, Jul 2002.
- [11] A. L. Goldberg, “Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins.,” *Nature*, vol. 426, pp. 895–899, Dec 2003.
- [12] R. A. L. van der Hoorn, “Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms.,” *Annu Rev Plant Biol*, vol. 59, pp. 191–223, 2008.
- [13] B. Turk, “Targeting proteases: successes, failures and future prospects.,” *Nat Rev Drug Discov*, vol. 5, pp. 785–799, Sep 2006.
- [14] G. Mariño, A. P. Ugalde, N. Salvador-Montoliu, I. Varela, P. M. Quirós, J. Cadiñanos, I. van der Pluijm, J. M. P. Freije, and C. López-Otín, “Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction.,” *Hum Mol Genet*, vol. 17, pp. 2196–2211, Jul

2008.

- [15] N. Mizushima, B. Levine, A. M. Cuervo, and D. J. Klionsky, "Autophagy fights disease through cellular self-digestion.," *Nature*, vol. 451, pp. 1069–1075, Feb 2008.
- [16] R. C. Taylor, S. P. Cullen, and S. J. Martin, "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level.," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 9, pp. 231–241, Mar 2008.
- [17] P. Jarvis, "Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants.," *New Phytol*, vol. 179, pp. 257–285, Jul 2008.
- [18] N. J. Patron and R. F. Waller, "Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals.," *Bioessays*, vol. 29, pp. 1048–1058, Oct 2007.
- [19] C. Giglione, S. Fieulaine, and T. Meinnel, "Cotranslational processing mechanisms: towards a dynamic 3d model.," *Trends Biochem Sci*, vol. 34, pp. 417–426, Aug 2009.
- [20] H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne, "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.," *Protein Eng*, vol. 10, pp. 1–6, Jan 1997.
- [21] C. Giglione, A. Boularot, and T. Meinnel, "Protein n-terminal methionine excision.," *Cell Mol Life Sci*, vol. 61, pp. 1455–1474, Jun 2004.
- [22] E. R. Stadtman, "Protein oxidation and aging.," *Science*, vol. 257, pp. 1220–1224, Aug 1992.
- [23] K. S. Egorova, O. M. Olenkina, and L. V. Olenina, "Lysine methylation of nonhistone proteins is a way to regulate their stability and function.," *Biochemistry (Mosc)*, vol. 75, pp. 535–548, May 2010.
- [24] R. A. Bradshaw, W. W. Brickey, and K. W. Walker, "N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and n alpha-acetyl transferase families.," *Trends Biochem Sci*, vol. 23, pp. 263–267, Jul 1998.
- [25] M. Arif, P. Senapati, J. Shandilya, and T. K. Kundu, "Protein lysine acetylation in cellular function and its role in cancer manifestation.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1799, no. 10-12, pp. 702–716, 2010.
- [26] V. L. Davidson, "Protein-derived cofactors. expanding the scope of post-translational modifications.," *Biochemistry*, vol. 46, pp. 5283–5292, May 2007.
- [27] T. Meinnel and C. Giglione, "Protein lipidation meets proteomics.," *Front Biosci*, vol. 13, pp. 6326–6340, 2008.
- [28] K. Breitschopf, E. Bengal, T. Ziv, A. Admon, and A. Ciechanover, "A novel site for ubiquitination: the n-terminal residue, and not internal lysines of myod, is essential for conjugation and degradation of the protein.," *EMBO J*, vol. 17, pp. 5964–5973, Oct 1998.
- [29] Y. Mechulam, T. Meinnel, and S. Blanquet, "A family of rna-binding enzymes. the aminoacyl-trna synthetases.," *Subcell Biochem*, vol. 24, pp. 323–376, 1995.

- [30] T. Meinnel, Y. Mechulam, and S. Blanquet, "Methionine as translation start signal: a review of the enzymes of the pathway in escherichia coli.," *Biochimie*, vol. 75, no. 12, pp. 1061–1075, 1993.
- [31] M. Kozak, "Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles.," *Microbiol Rev*, vol. 47, pp. 1–45, Mar 1983.
- [32] J. Solbiati, A. Chapman-Smith, J. L. Miller, C. G. Miller, and J. E. Cronan, "Processing of the n termini of nascent polypeptide chains requires deformylation prior to methionine removal.," *J Mol Biol*, vol. 290, pp. 607–614, Jul 1999.
- [33] V. Ramesh, C. Köhrer, and U. L. RajBhandary, "Expression of escherichia coli methionyl-trna formyltransferase in saccharomyces cerevisiae leads to formylation of the cytoplasmic initiator trna and possibly to initiation of protein synthesis with formylmethionine.," *Mol Cell Biol*, vol. 22, pp. 5434–5442, Aug 2002.
- [34] S. M. Arfin and R. A. Bradshaw, "Cotranslational processing and protein turnover in eukaryotic cells.," *Biochemistry*, vol. 27, pp. 7979–7984, Oct 1988.
- [35] D. Housman, D. Gillespie, and H. F. Lodish, "Removal of formyl-methionine residue from nascent bacteriophage f2 protein.," *J Mol Biol*, vol. 65, pp. 163–166, Mar 1972.
- [36] M. J. Pine, "Kinetics of maturation of the amino termini of the cell proteins of escherichia coli.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 174, pp. 359–372, Jan 1969.
- [37] L. A. Ball and P. Kaesberg, "Cleavage of the n-terminal formylmethionine residue from a bacteriophage coat protein in vitro.," *J Mol Biol*, vol. 79, pp. 531–537, Sep 1973.
- [38] S. M. Arfin, R. L. Kendall, L. Hall, L. H. Weaver, A. E. Stewart, B. W. Matthews, and R. A. Bradshaw, "Eukaryotic methionyl aminopeptidases: two classes of cobalt-dependent enzymes.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, pp. 7714–7718, Aug 1995.
- [39] N. D. Rawlings and A. J. Barrett, "Evolutionary families of metallopeptidases.," *Methods Enzymol*, vol. 248, pp. 183–228, 1995.
- [40] N. D. Rawlings, E. O'Brien, and A. J. Barrett, "Merops: the protease database.," *Nucleic Acids Res*, vol. 30, pp. 343–346, Jan 2002.
- [41] A. Addlagatta, X. Hu, J. O. Liu, and B. W. Matthews, "Structural basis for the functional differences between type i and type ii human methionine aminopeptidases.," *Biochemistry*, vol. 44, pp. 14741–14749, Nov 2005.
- [42] S. L. Roderick and B. W. Matthews, "Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from escherichia coli: a new type of proteolytic enzyme.," *Biochemistry*, vol. 32, pp. 3907–3912, Apr 1993.
- [43] W. T. Lowther, Y. Zhang, P. B. Sampson, J. F. Honek, and B. W. Matthews, "Insights into the mechanism of escherichia coli methionine aminopeptidase from the structural analysis of reaction products and phosphorus-based transition-state analogues.," *Biochemistry*, vol. 38, pp. 14810–14819,

Nov 1999.

- [44] A. Douangamath, G. E. Dale, A. D'Arcy, M. Almstetter, R. Eckl, A. Frutos-Hoener, B. Henkel, K. Illgen, S. Nerdinger, H. Schulz, A. M. Sweeney, A. MacSweeney, M. Thormann, A. Trembl, S. Pierau, S. Wadman, and C. Oefner, "Crystal structures of staphylococcus aureus methionine aminopeptidase complexed with keto heterocycle and aminoketone inhibitors reveal the formation of a tetrahedral intermediate.," *J Med Chem*, vol. 47, pp. 1325–1328, Mar 2004.
- [45] G. Spraggon, R. Schwarzenbacher, A. Kreuzsch, D. McMullan, L. S. Brinen, J. M. Canaves, X. Dai, A. M. Deacon, M.-A. Elsliger, S. Eshagi, R. Floyd, A. Godzik, C. Grittini, S. K. Grzechnik, L. Jaroszewski, C. Karlak, H. E. Klock, E. Koesema, J. S. Kovarik, P. Kuhn, T. M. McPhillips, M. D. Miller, A. Morse, K. Moy, J. Ouyang, R. Page, K. Quijano, F. Rezezadeh, A. Robb, E. Sims, R. C. Stevens, H. van den Bedem, J. Velasquez, J. Vincent, F. von Delft, X. Wang, B. West, G. Wolf, Q. Xu, K. O. Hodgson, J. Wooley, S. A. Lesley, and I. A. Wilson, "Crystal structure of a methionine aminopeptidase (tm1478) from thermotoga maritima at 1.9 Å resolution.," *Proteins*, vol. 56, pp. 396–400, Aug 2004.
- [46] S. Liu, J. Widom, C. W. Kemp, C. M. Crews, and J. Clardy, "Structure of human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin.," *Science*, vol. 282, pp. 1324–1327, Nov 1998.
- [47] T. H. Tahirov, H. Oki, T. Tsukihara, K. Ogasahara, K. Yutani, C. P. Libeu, Y. Izu, S. Tsunasawa, and I. Kato, "High-resolution crystals of methionine aminopeptidase from pyrococcus furiosus obtained by water-mediated transformation.," *J Struct Biol*, vol. 121, pp. 68–72, Jan 1998.
- [48] T. H. Tahirov, H. Oki, T. Tsukihara, K. Ogasahara, K. Yutani, K. Ogata, Y. Izu, S. Tsunasawa, and I. Kato, "Crystal structure of methionine aminopeptidase from hyperthermophile, pyrococcus furiosus.," *J Mol Biol*, vol. 284, pp. 101–124, Nov 1998.
- [49] S. Tsunasawa, Y. Izu, M. Miyagi, and I. Kato, "Methionine aminopeptidase from the hyperthermophilic archaeon pyrococcus furiosus: molecular cloning and overexpression in escherichia coli of the gene, and characteristics of the enzyme.," *J Biochem*, vol. 122, pp. 843–850, Oct 1997.
- [50] J. J. Alvarado, A. Nemkal, J. M. Sauder, M. Russell, D. E. Akiyoshi, W. Shi, S. C. Almo, and L. M. Weiss, "Structure of a microsporidian methionine aminopeptidase type 2 complexed with fumagillin and tnp-470.," *Mol Biochem Parasitol*, vol. 168, pp. 158–167, Dec 2009.
- [51] W. T. Lowther and B. W. Matthews, "Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings.," *Chem Rev*, vol. 102, pp. 4581–4608, Dec 2002.
- [52] X. Li and Y. H. Chang, "Amino-terminal protein processing in saccharomyces cerevisiae is an essential function that requires two distinct methionine aminopeptidases.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, pp. 12357–12361, Dec 1995.
- [53] W. T. Lowther and B. W. Matthews, "Structure and function of the methionine aminopeptidases.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1477, pp. 157–167, Mar 2000.

- [54] C. Giglione and T. Meinel, "Organellar peptide deformylases: universality of the n-terminal methionine cleavage mechanism.," *Trends Plant Sci*, vol. 6, pp. 566–572, Dec 2001.
- [55] C. Giglione, A. Serero, M. Pierre, B. Boisson, and T. Meinel, "Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of n-terminal protein processing mechanisms.," *EMBO J*, vol. 19, pp. 5916–5929, Nov 2000.
- [56] R. Bingel-Erlenmeyer, R. Kohler, G. Kramer, A. Sandikci, S. Antoli?, T. Maier, C. Schaffitzel, B. Wiedmann, B. Bukau, and N. Ban, "A peptide deformylase-ribosome complex reveals mechanism of nascent chain processing.," *Nature*, vol. 452, pp. 108–111, Mar 2008.
- [57] U. Raue, S. Oellerer, and S. Rospert, "Association of protein biogenesis factors at the yeast ribosomal tunnel exit is affected by the translational status and nascent polypeptide sequence.," *J Biol Chem*, vol. 282, pp. 7809–7816, Mar 2007.
- [58] J. A. Vetro and Y.-H. Chang, "Yeast methionine aminopeptidase type 1 is ribosome-associated and requires its n-terminal zinc finger domain for normal function in vivo.," *J Cell Biochem*, vol. 85, no. 4, pp. 678–688, 2002.
- [59] T. Nagase, N. Seki, A. Tanaka, K. Ishikawa, and N. Nomura, "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. iv. the coding sequences of 40 new genes (kiaa0121-kiaa0160) deduced by analysis of cdna clones from human cell line kg-1.," *DNA Res*, vol. 2, pp. 167–74, 199–210, Aug 1995.
- [60] C. Giglione, A. Serero, M. Pierre, B. Boisson, and T. Meinel, "Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of n-terminal protein processing mechanisms.," *EMBO J*, vol. 19, pp. 5916–5929, Nov 2000.
- [61] A. Addlagatta, M. L. Quillin, O. Omotoso, J. O. Liu, and B. W. Matthews, "Identification of an sh3-binding motif in a new class of methionine aminopeptidases from mycobacterium tuberculosis suggests a mode of interaction with the ribosome.," *Biochemistry*, vol. 44, pp. 7166–7174, May 2005.
- [62] B. Datta, D. Chakrabarti, A. L. Roy, and N. K. Gupta, "Roles of a 67-kda polypeptide in reversal of protein synthesis inhibition in heme-deficient reticulocyte lysate.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 85, pp. 3324–3328, May 1988.
- [63] B. Datta, M. K. Ray, D. Chakrabarti, D. E. Wylie, and N. K. Gupta, "Glycosylation of eukaryotic peptide chain initiation factor 2 (eif-2)-associated 67-kda polypeptide (p67) and its possible role in the inhibition of eif-2 kinase-catalyzed phosphorylation of the eif-2 alpha-subunit.," *J Biol Chem*, vol. 264, pp. 20620–20624, Dec 1989.
- [64] M. K. Ray, A. Chakraborty, B. Datta, A. Chattopadhyay, D. Saha, A. Bose, T. G. Kinzy, S. Wu, R. E. Hileman, and W. C. Merrick, "Characteristics of the eukaryotic initiation factor 2 associated 67-kda polypeptide.," *Biochemistry*, vol. 32, pp. 5151–5159, May 1993.
- [65] M. K. Ray, B. Datta, A. Chakraborty, A. Chattopadhyay, S. Meza-Keuthen, and N. K. Gupta,

“The eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kda polypeptide (p67) plays a critical role in regulation of protein synthesis initiation in animal cells.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, pp. 539–543, Jan 1992.

[66] S. Wu, S. Gupta, N. Chatterjee, R. E. Hileman, T. G. Kinzy, N. D. Denslow, W. C. Merrick, D. Chakrabarti, J. C. Osterman, and N. K. Gupta, “Cloning and characterization of complementary dna encoding the eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kda protein (p67).,” *J Biol Chem*, vol. 268, pp. 10796–10801, May 1993.

[67] G. Yang, R. B. Kirkpatrick, T. Ho, G. F. Zhang, P. H. Liang, K. O. Johanson, D. J. Casper, M. L. Doyle, J. P. Marino, S. K. Thompson, W. Chen, D. G. Tew, and T. D. Meek, “Steady-state kinetic characterization of substrates and metal-ion specificities of the full-length and n-terminally truncated recombinant human methionine aminopeptidases (type 2).,” *Biochemistry*, vol. 40, pp. 10645–10654, Sep 2001.

[68] R. Datta, P. Choudhury, M. Bhattacharya, F. S. Leon, Y. Zhou, and B. Datta, “Protection of translation initiation factor eif2 phosphorylation correlates with eif2-associated glycoprotein p67 levels and requires the lysine-rich domain i of p67.,” *Biochimie*, vol. 83, pp. 919–931, Oct 2001.

[69] R. Datta, P. Choudhury, A. Ghosh, and B. Datta, “A glycosylation site, 60sgts63, of p67 is required for its ability to regulate the phosphorylation and activity of eukaryotic initiation factor 2alpha.,” *Biochemistry*, vol. 42, pp. 5453–5460, May 2003.

[70] R. Datta, R. Tammali, and B. Datta, “Negative regulation of the protection of eif2alpha phosphorylation activity by a unique acidic domain present at the n-terminus of p67.,” *Exp Cell Res*, vol. 283, pp. 237–246, Feb 2003.

[71] N. J. Cospers, V. M. D’souza, R. A. Scott, and R. C. Holz, “Structural evidence that the methionyl aminopeptidase from escherichia coli is a mononuclear metalloprotease.,” *Biochemistry*, vol. 40, pp. 13302–13309, Nov 2001.

[72] V. M. D’souza, B. Bennett, A. J. Copik, and R. C. Holz, “Divalent metal binding properties of the methionyl aminopeptidase from escherichia coli.,” *Biochemistry*, vol. 39, pp. 3817–3826, Apr 2000.

[73] L. Meng, S. Ruebush, V. M. D’souza, A. J. Copik, S. Tsunasawa, and R. C. Holz, “Overexpression and divalent metal binding properties of the methionyl aminopeptidase from pyrococcus furiosus.,” *Biochemistry*, vol. 41, pp. 7199–7208, Jun 2002.

[74] S. C. Chai, W.-L. Wang, and Q.-Z. Ye, “Fe(ii) is the native cofactor for escherichia coli methionine aminopeptidase.,” *J Biol Chem*, vol. 283, pp. 26879–26885, Oct 2008.

[75] J.-P. Lu, S. C. Chai, and Q.-Z. Ye, “Catalysis and inhibition of mycobacterium tuberculosis methionine aminopeptidase.,” *J Med Chem*, vol. 53, pp. 1329–1337, Feb 2010.

[76] J. Wang, G. S. Sheppard, P. Lou, M. Kawai, C. Park, D. A. Egan, A. Schneider, J. Bouska,

R. Lesniewski, and J. Henkin, "Physiologically relevant metal cofactor for methionine aminopeptidase-2 is manganese.," *Biochemistry*, vol. 42, pp. 5035–5042, May 2003.

[77] W.-L. Wang, S. C. Chai, M. Huang, H.-Z. He, T. D. Hurley, and Q.-Z. Ye, "Discovery of inhibitors of escherichia coli methionine aminopeptidase with the fe(ii)-form selectivity and antibacterial activity.," *J Med Chem*, vol. 51, pp. 6110–6120, Oct 2008.

[78] W.-L. Wang, S. C. Chai, and Q.-Z. Ye, "Synthesis and structure-function analysis of fe(ii)-form-selective antibacterial inhibitors of escherichia coli methionine aminopeptidase.," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 19, pp. 1080–1083, Feb 2009.

[79] Y. H. Chang, U. Teichert, and J. A. Smith, "Molecular cloning, sequencing, deletion, and overexpression of a methionine aminopeptidase gene from saccharomyces cerevisiae.," *J Biol Chem*, vol. 267, pp. 8007–8011, Apr 1992.

[80] B. Dummitt, W. S. Micka, and Y.-H. Chang, "N-terminal methionine removal and methionine metabolism in saccharomyces cerevisiae.," *J Cell Biochem*, vol. 89, pp. 964–974, Aug 2003.

[81] S. Ross, C. Giglione, M. Pierre, C. Espagne, and T. Meinnel, "Functional and developmental impact of cytosolic protein n-terminal methionine excision in arabidopsis.," *Plant Physiol*, vol. 137, pp. 623–637, Feb 2005.

[82] S. Ross, C. Giglione, M. Pierre, C. Espagne, and T. Meinnel, "Functional and developmental impact of cytosolic protein n-terminal methionine excision in arabidopsis.," *Plant Physiol*, vol. 137, pp. 623–637, Feb 2005.

[83] I. Schechter and A. Berger, "On the size of the active site in proteases. i. papain.," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 27, pp. 157–162, Apr 1967.

[84] C. G. Miller, "Peptidases and proteases of escherichia coli and salmonella typhimurium.," *Annu Rev Microbiol*, vol. 29, pp. 485–504, 1975.

[85] C. G. Miller, K. L. Strauch, A. M. Kukral, J. L. Miller, P. T. Wingfield, G. J. Mazzei, R. C. Werlen, P. Graber, and N. R. Movva, "N-terminal methionine-specific peptidase in salmonella typhimurium.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 84, pp. 2718–2722, May 1987.

[86] A. J. Link, K. Robison, and G. M. Church, "Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of escherichia coli k-12.," *Electrophoresis*, vol. 18, pp. 1259–1313, Aug 1997.

[87] V. C. Wasinger and I. Humphery-Smith, "Small genes/gene-products in escherichia coli k-12.," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 169, pp. 375–382, Dec 1998.

[88] A. Boularot, C. Giglione, I. Artaud, and T. Meinnel, "Structure-activity relationship analysis and therapeutic potential of peptide deformylase inhibitors.," *Curr Opin Investig Drugs*, vol. 5, pp. 809–822, Aug 2004.

[89] E. C. Griffith, Z. Su, B. E. Turk, S. Chen, Y. H. Chang, Z. Wu, K. Biemann, and J. O. Liu,

“Methionine aminopeptidase (type 2) is the common target for angiogenesis inhibitors agm-1470 and ovalicin.” *Chem Biol*, vol. 4, pp. 461–471, Jun 1997.

[90] N. Sin, L. Meng, M. Q. Wang, J. J. Wen, W. G. Bornmann, and C. M. Crews, “The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, metap-2.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, pp. 6099–6103, Jun 1997.

[91] E. S. Didier, “Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals.” *Acta Trop*, vol. 94, pp. 61–76, Apr 2005.

[92] M. Kusaka, K. Sudo, T. Fujita, S. Marui, F. Itoh, D. Ingber, and J. Folkman, “Potent anti-angiogenic action of agm-1470: comparison to the fumagillin parent.” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 174, pp. 1070–1076, Feb 1991.

[93] G. Zhou, C. W. Tsai, and J. O. Liu, “Fumagalone, a reversible inhibitor of type 2 methionine aminopeptidase and angiogenesis.” *J Med Chem*, vol. 46, pp. 3452–3454, Jul 2003.

[94] P. Selvakumar, A. Lakshmikuttyamma, J. R. Dimmock, and R. K. Sharma, “Methionine aminopeptidase 2 and cancer.” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1765, pp. 148–154, Apr 2006.

[95] D. Ingber, T. Fujita, S. Kishimoto, K. Sudo, T. Kanamaru, H. Brem, and J. Folkman, “Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth.” *Nature*, vol. 348, pp. 555–557, Dec 1990.

[96] C. M. Brdlik and C. M. Crews, “A single amino acid residue defines the difference in ovalicin sensitivity between type i and ii methionine aminopeptidases.” *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 9475–9480, Mar 2004.

[97] C. D. P. Klein and G. Folkers, “Understanding the selectivity of fumagillin for the methionine aminopeptidase type ii.” *Oncol Res*, vol. 13, no. 12, pp. 513–520, 2003.

[98] B. Liu, Y. Lin, and H. Yin, “[experimental study of the effect of angiogenesis inhibitor tnp-470 on the growth and metastasis of gastric cancer in vivo],” *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, vol. 20, pp. 34–36, Jan 1998.

[99] A. Addlagatta and B. W. Matthews, “Structure of the angiogenesis inhibitor ovalicin bound to its noncognate target, human type 1 methionine aminopeptidase.” *Protein Sci*, vol. 15, pp. 1842–1848, Aug 2006.

[100] J. Wang, G. S. Sheppard, P. Lou, M. Kawai, N. BaMaung, S. A. Erickson, L. Tucker-Garcia, C. Park, J. Bouska, Y.-C. Wang, D. Frost, P. Tapang, D. H. Albert, S. J. Morgan, M. Morowitz, S. Shusterman, J. M. Maris, R. Lesniewski, and J. Henkin, “Tumor suppression by a rationally designed reversible inhibitor of methionine aminopeptidase-2.” *Cancer Res*, vol. 63, pp. 7861–7869, Nov 2003.

[101] D. Nahari, R. Satchi-Fainaro, M. Chen, I. Mitchell, L. B. Task, Z. Liu, J. Kihnenman, A. B. Carroll, L. S. Terada, and F. E. Nwariaku, “Tumor cytotoxicity and endothelial rac inhibition induced

- by tnp-470 in anaplastic thyroid cancer.," *Mol Cancer Ther*, vol. 6, pp. 1329–1337, Apr 2007.
- [102] L. A. Tucker, Q. Zhang, G. S. Sheppard, P. Lou, F. Jiang, E. McKeegan, R. Lesniewski, S. K. Davidsen, R. L. Bell, and J. Wang, "Ectopic expression of methionine aminopeptidase-2 causes cell transformation and stimulates proliferation.," *Oncogene*, vol. 27, pp. 3967–3976, Jun 2008.
- [103] G. Bergers, K. Javaherian, K. M. Lo, J. Folkman, and D. Hanahan, "Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice.," *Science*, vol. 284, pp. 808–812, Apr 1999.
- [104] M. Yamaoka, T. Yamamoto, T. Masaki, S. Ikeyama, K. Sudo, and T. Fujita, "Inhibition of tumor growth and metastasis of rodent tumors by the angiogenesis inhibitor o-(chloroacetyl-carbamoyl)fumagillol (tnp-470; agm-1470).," *Cancer Res*, vol. 53, pp. 4262–4267, Sep 1993.
- [105] O. Benny, O. Fainaru, A. Adini, F. Cassiola, L. Bazinet, I. Adini, E. Pravda, Y. Nahmias, S. Koirala, G. Corfas, R. J. D'Amato, and J. Folkman, "An orally delivered small-molecule formulation with antiangiogenic and anticancer activity.," *Nat Biotechnol*, vol. 26, pp. 799–807, Jul 2008.
- [106] M. Emoto, K. Tachibana, H. Iwasaki, and T. Kawarabayashi, "Antitumor effect of tnp-470, an angiogenesis inhibitor, combined with ultrasound irradiation for human uterine sarcoma xenografts evaluated using contrast color doppler ultrasound.," *Cancer Sci*, vol. 98, pp. 929–935, Jun 2007.
- [107] M. Kanamori, T. Yasuda, K. Ohmori, S. Nogami, and M. Aoki, "Genetic analysis of high-metastatic clone of rct sarcoma in mice, and its growth regression in vivo in response to angiogenesis inhibitor tnp-470.," *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 26, pp. 101–107, Mar 2007.
- [108] S. Shusterman, S. A. Grupp, R. Barr, D. Carpentieri, H. Zhao, and J. M. Maris, "The angiogenesis inhibitor tnp-470 effectively inhibits human neuroblastoma xenograft growth, especially in the setting of subclinical disease.," *Clin Cancer Res*, vol. 7, pp. 977–984, Apr 2001.
- [109] Y. Takamiya, H. Brem, J. Ojeifo, T. Mineta, and R. L. Martuza, "Agm-1470 inhibits the growth of human glioblastoma cells in vitro and in vivo.," *Neurosurgery*, vol. 34, pp. 869–75; discussion 875, May 1994.
- [110] Y. Takamiya, R. M. Friedlander, H. Brem, A. Malick, and R. L. Martuza, "Inhibition of angiogenesis and growth of human nerve-sheath tumors by agm-1470.," *J Neurosurg*, vol. 78, pp. 470–476, Mar 1993.
- [111] T. Yanase, M. Tamura, K. Fujita, S. Kodama, and K. Tanaka, "Inhibitory effect of angiogenesis inhibitor tnp-470 on tumor growth and metastasis of human cell lines in vitro and in vivo.," *Cancer Res*, vol. 53, pp. 2566–2570, Jun 1993.
- [112] J. Folkman, "The role of angiogenesis in tumor growth.," *Semin Cancer Biol*, vol. 3, pp. 65–71, Apr 1992.
- [113] D. Hanahan, "A flanking attack on cancer.," *Nat Med*, vol. 4, pp. 13–14, Jan 1998.
- [114] J. Folkman, "Tumor angiogenesis: therapeutic implications.," *N Engl J Med*, vol. 285,

pp. 1182–1186, Nov 1971.

[115] J. Folkman, “Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.,” *Nat Med*, vol. 1, pp. 27–31, Jan 1995.

[116] G. D. Yancopoulos, M. Klagsbrun, and J. Folkman, “Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border.,” *Cell*, vol. 93, pp. 661–664, May 1998.

[117] M. Kusaka, K. Sudo, E. Matsutani, Y. Kozai, S. Marui, T. Fujita, D. Ingber, and J. Folkman, “Cytostatic inhibition of endothelial cell growth by the angiogenesis inhibitor tnp-470 (agm-1470).,” *Br J Cancer*, vol. 69, pp. 212–216, Feb 1994.

[118] T. Yamamoto, K. Sudo, and T. Fujita, “Significant inhibition of endothelial cell growth in tumor vasculature by an angiogenesis inhibitor, tnp-470 (agm-1470).,” *Anticancer Res*, vol. 14, no. 1A, pp. 1–3, 1994.

[119] L. Hou, D. Mori, Y. Takase, P. Meihua, K. Kai, and O. Tokunaga, “Fumagillin inhibits colorectal cancer growth and metastasis in mice: in vivo and in vitro study of anti-angiogenesis.,” *Pathol Int*, vol. 59, pp. 448–461, Jul 2009.

[120] X. Chen, S. Xie, S. Bhat, N. Kumar, T. A. Shapiro, and J. O. Liu, “Fumagillin and fumarranol interact with p. falciparum methionine aminopeptidase 2 and inhibit malaria parasite growth in vitro and in vivo.,” *Chem Biol*, vol. 16, pp. 193–202, Feb 2009.

[121] C. C. Arico-Muendel, D. R. Benjamin, T. M. Caiazzo, P. A. Centrella, B. D. Contonio, C. M. Cook, E. G. Doyle, G. Hannig, M. T. Labenski, L. L. Searle, K. Lind, B. A. Morgan, G. Olson, C. L. Paradise, C. Self, S. R. Skinner, B. Sluboski, J. L. Svendsen, C. D. Thompson, W. Westlin, and K. F. White, “Carbamate analogues of fumagillin as potent, targeted inhibitors of methionine aminopeptidase-2.,” *J Med Chem*, vol. 52, pp. 8047–8056, Dec 2009.

[122] E. A. Kruger and W. D. Figg, “Tnp-470: an angiogenesis inhibitor in clinical development for cancer.,” *Expert Opin Investig Drugs*, vol. 9, pp. 1383–1396, Jun 2000.

[123] P. Bhargava, J. L. Marshall, N. Rizvi, W. Dahut, J. Yoe, M. Figuera, K. Phipps, V. S. Ong, A. Kato, and M. J. Hawkins, “A phase i and pharmacokinetic study of tnp-470 administered weekly to patients with advanced cancer.,” *Clin Cancer Res*, vol. 5, pp. 1989–1995, Aug 1999.

[124] R. S. Herbst, “Targeted therapy using novel agents in the treatment of non-small-cell lung cancer.,” *Clin Lung Cancer*, vol. 3 Suppl 1, pp. S30–S38, Mar 2002.

[125] A. P. Kudelka, T. Levy, C. F. Verschraegen, C. L. Edwards, S. Piamsomboon, W. Termrungruanglert, R. S. Freedman, A. L. Kaplan, D. G. Kieback, C. A. Meyers, K. A. Jaeckle, E. Loyer, M. Steger, R. Mante, G. Mavligit, A. Killian, R. A. Tang, J. U. Gutterman, and J. J. Kavanagh, “A phase i study of tnp-470 administered to patients with advanced squamous cell cancer of the cervix.,” *Clin Cancer Res*, vol. 3, pp. 1501–1505, Sep 1997.

[126] A. P. Kudelka, C. F. Verschraegen, and E. Loyer, “Complete remission of metastatic cervical

- cancer with the angiogenesis inhibitor tnp-470.," *N Engl J Med*, vol. 338, pp. 991–992, Apr 1998.
- [127] C. J. Logothetis, K. K. Wu, L. D. Finn, D. Daliani, W. Figg, H. Ghaddar, and J. U. Gutterman, "Phase i trial of the angiogenesis inhibitor tnp-470 for progressive androgen-independent prostate cancer.," *Clin Cancer Res*, vol. 7, pp. 1198–1203, May 2001.
- [128] W. M. Stadler, T. Kuzel, C. Shapiro, J. Sosman, J. Clark, and N. J. Vogelzang, "Multi-institutional study of the angiogenesis inhibitor tnp-470 in metastatic renal carcinoma.," *J Clin Oncol*, vol. 17, pp. 2541–2545, Aug 1999.
- [129] H. T. Tran, G. R. Blumenschein, C. Lu, C. A. Meyers, V. Papadimitrakopoulou, F. V. Fossella, R. Zinner, T. Madden, L. G. Smythe, V. K. Puduvalli, R. Munden, M. Truong, and R. S. Herbst, "Clinical and pharmacokinetic study of tnp-470, an angiogenesis inhibitor, in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with solid tumors.," *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 54, pp. 308–314, Oct 2004.
- [130] P. M. Winter, A. H. Schmieder, S. D. Caruthers, J. L. Keene, H. Zhang, S. A. Wickline, and G. M. Lanza, "Minute dosages of alpha(nu)beta3-targeted fumagillin nanoparticles impair vx-2 tumor angiogenesis and development in rabbits.," *FASEB J*, vol. 22, pp. 2758–2767, Aug 2008.
- [131] Y. Zhao, Y. Zhou, K. M. O'Boyle, and P. V. Murphy, "Hybrids of 1-deoxynojirimycin and aryl-1,2,3-triazoles and biological studies related to angiogenesis.," *Bioorg Med Chem*, vol. 16, pp. 6333–6337, Jun 2008.
- [132] L. M. Weiss, S. F. Costa, and H. Zhang, "Microsporidian methionine aminopeptidase type 2.," *J Eukaryot Microbiol*, vol. Suppl, pp. 88S–90S, 2001.
- [133] J. H. KILLOUGH, G. B. MAGILL, and R. C. SMITH, "The treatment of amebiasis with fumagillin.," *Science*, vol. 115, pp. 71–72, Jan 1952.
- [134] P. Zhang, D. E. Nicholson, J. M. Bujnicki, X. Su, J. J. Brendle, M. Ferdig, D. E. Kyle, W. K. Milhous, and P. K. Chiang, "Angiogenesis inhibitors specific for methionine aminopeptidase 2 as drugs for malaria and leishmaniasis.," *J Biomed Sci*, vol. 9, no. 1, pp. 34–40, 2002.
- [135] J. Lu, C. R. Chong, X. Hu, and J. O. Liu, "Fumarranol, a rearranged fumagillin analogue that inhibits angiogenesis in vivo.," *J Med Chem*, vol. 49, pp. 5645–5648, Sep 2006.
- [136] I. Scroyen, V. Christiaens, and H. R. Lijnen, "Effect of fumagillin on adipocyte differentiation and adipogenesis.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1800, pp. 425–429, Apr 2010.
- [137] R. C. Priest, J. Spaul, J. Buckton, R. L. Grimley, M. Sims, M. Binks, and R. Malhotra, "Immunomodulatory activity of a methionine aminopeptidase-2 inhibitor on b cell differentiation.," *Clin Exp Immunol*, vol. 155, pp. 514–522, Mar 2009.
- [138] E. Cretton-Scott, L. Placidi, H. McClure, D. C. Anderson, and J. P. Sommadossi, "Pharmacokinetics and metabolism of o-(chloroacetyl-carbamoyl) fumagillol (tnp-470, agm-1470) in rhesus monkeys.," *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 38, no. 2, pp. 117–122, 1996.

- [139] R. Satchi-Fainaro, R. Mamluk, L. Wang, S. M. Short, J. A. Nagy, D. Feng, A. M. Dvorak, H. F. Dvorak, M. Puder, D. Mukhopadhyay, and J. Folkman, "Inhibition of vessel permeability by tnp-470 and its polymer conjugate, caplostatin.," *Cancer Cell*, vol. 7, pp. 251–261, Mar 2005.
- [140] S. G. Bernier, D. D. Lazarus, E. Clark, B. Doyle, M. T. Labenski, C. D. Thompson, W. F. Westlin, and G. Hannig, "A methionine aminopeptidase-2 inhibitor, ppi-2458, for the treatment of rheumatoid arthritis.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 10768–10773, Jul 2004.
- [141] R. Satchi-Fainaro, M. Puder, J. W. Davies, H. T. Tran, D. A. Sampson, A. K. Greene, G. Corfas, and J. Folkman, "Targeting angiogenesis with a conjugate of hpma copolymer and tnp-470.," *Nat Med*, vol. 10, pp. 255–261, Mar 2004.
- [142] G. S. Sheppard, J. Wang, M. Kawai, S. D. Fidanze, N. Y. BaMaung, S. A. Erickson, D. M. Barnes, J. S. Tedrow, L. Kolaczowski, A. Vasudevan, D. C. Park, G. T. Wang, W. J. Sanders, R. A. Mantei, F. Palazzo, L. Tucker-Garcia, P. Lou, Q. Zhang, C. H. Park, K. H. Kim, A. Petros, E. Olejniczak, D. Nettesheim, P. Hajduk, J. Henkin, R. Lesniewski, S. K. Davidsen, and R. L. Bell, "Discovery and optimization of anthranilic acid sulfonamides as inhibitors of methionine aminopeptidase-2: a structural basis for the reduction of albumin binding.," *J Med Chem*, vol. 49, pp. 3832–3849, Jun 2006.
- [143] J. Wang, L. A. Tucker, J. Stavropoulos, Q. Zhang, Y.-C. Wang, G. Bukofzer, A. Niquette, J. A. Meulbroek, D. M. Barnes, J. Shen, J. Bouska, C. Donawho, G. S. Sheppard, and R. L. Bell, "Correlation of tumor growth suppression and methionine aminopeptidase-2 activity blockade using an orally active inhibitor.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, pp. 1838–1843, Feb 2008.
- [144] F. R. Kinder, R. W. Versace, K. W. Bair, J. M. Bontempo, D. Cesarz, S. Chen, P. Crews, A. M. Czuchta, C. T. Jagoe, Y. Mou, R. Nemzek, P. E. Phillips, L. D. Tran, R. M. Wang, S. Weltchek, and S. Zabludoff, "Synthesis and antitumor activity of ester-modified analogues of bengamide b.," *J Med Chem*, vol. 44, pp. 3692–3699, Oct 2001.
- [145] F. R. Kinder, S. Wattanasin, R. W. Versace, K. W. Bair, J. Bontempo, M. A. Green, Y. J. Lu, H. R. Marepalli, P. E. Phillips, D. Roche, L. D. Tran, R. Wang, L. Waykole, D. D. Xu, and S. Zabludoff, "Total syntheses of bengamides b and e.," *J Org Chem*, vol. 66, pp. 2118–2122, Mar 2001.
- [146] H. Towbin, K. W. Bair, J. A. DeCaprio, M. J. Eck, S. Kim, F. R. Kinder, A. Morollo, D. R. Mueller, P. Schindler, H. K. Song, J. van Oostrum, R. W. Versace, H. Voshol, J. Wood, S. Zabludoff, and P. E. Phillips, "Proteomics-based target identification: bengamides as a new class of methionine aminopeptidase inhibitors.," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 52964–52971, Dec 2003.
- [147] X. Hu, J. Zhu, S. Srivathsan, and D. Pei, "Peptidyl hydroxamic acids as methionine aminopeptidase inhibitors.," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 14, pp. 77–79, Jan 2004.
- [148] Q.-L. Luo, J.-Y. Li, Z.-Y. Liu, L.-L. Chen, J. Li, Z. Qian, Q. Shen, Y. Li, G. H. Lushington,

Q.-Z. Ye, and F.-J. Nan, "Discovery and structural modification of inhibitors of methionine aminopeptidases from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*," *J Med Chem*, vol. 46, pp. 2631–2640, Jun 2003.

[149] Q.-L. Luo, J.-Y. Li, Z.-Y. Liu, L.-L. Chen, J. Li, Q.-Z. Ye, and F.-J. Nan, "Inhibitors of type I metaps containing pyridine-2-carboxylic acid thiazol-2-ylamide. part 1: SAR studies on the determination of the key scaffold," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 15, pp. 635–638, Feb 2005.

[150] X. Hu, A. Addlagatta, J. Lu, B. W. Matthews, and J. O. Liu, "Elucidation of the function of type I human methionine aminopeptidase during cell cycle progression," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, pp. 18148–18153, Nov 2006.

[151] X. Chen, C. R. Chong, L. Shi, T. Yoshimoto, D. J. Sullivan, and J. O. Liu, "Inhibitors of *Plasmodium falciparum* methionine aminopeptidase 1b possess antimalarial activity," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, pp. 14548–14553, Sep 2006.

[152] C. C. Musonda, G. A. Whitlock, M. J. Witty, R. Brun, and M. Kaiser, "Synthesis and evaluation of 2-pyridyl pyrimidines with in vitro antiplasmodial and antileishmanial activity," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 19, pp. 401–405, Jan 2009.

[153] M. K. Haldar, M. D. Scott, N. Sule, D. K. Srivastava, and S. Mallik, "Synthesis of barbiturate-based methionine aminopeptidase-1 inhibitors," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 18, pp. 2373–2376, Apr 2008.

[154] X. Zhang, S. Chen, Z. Hu, L. Zhang, and H. Wang, "Expression and characterization of two functional methionine aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis* H37rv," *Curr Microbiol*, vol. 59, pp. 520–525, Nov 2009.

[155] J.-P. Lu and Q.-Z. Ye, "Expression and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase type 1a," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 20, pp. 2776–2779, May 2010.

[156] J. Wang, P. Lou, and J. Henkin, "Selective inhibition of endothelial cell proliferation by fumagillin is not due to differential expression of methionine aminopeptidases," *J Cell Biochem*, vol. 77, pp. 465–473, Apr 2000.

[157] B. Datta and R. Datta, "Induction of apoptosis due to lowering the level of eukaryotic initiation factor 2-associated protein, p67, from mammalian cells by antisense approach," *Exp Cell Res*, vol. 246, pp. 376–383, Feb 1999.

[158] A. Catalano, M. Romano, I. Robuffo, L. Strizzi, and A. Procopio, "Methionine aminopeptidase-2 regulates human mesothelioma cell survival: role of bcl-2 expression and telomerase activity," *Am J Pathol*, vol. 159, pp. 721–731, Aug 2001.

[159] S. G. Bernier, N. Taghizadeh, C. D. Thompson, W. F. Westlin, and G. Hannig, "Methionine aminopeptidases type I and type II are essential to control cell proliferation," *J Cell Biochem*, vol. 95, pp. 1191–1203, Aug 2005.

- [160] J.-R. J. Yeh, R. Ju, C. M. Brdlik, W. Zhang, Y. Zhang, M. E. Matyskiela, J. D. Shotwell, and C. M. Crews, "Targeted gene disruption of methionine aminopeptidase 2 results in an embryonic gastrulation defect and endothelial cell growth arrest.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, pp. 10379–10384, Jul 2006.
- [161] J. Abe, W. Zhou, N. Takuwa, J. Taguchi, K. Kurokawa, M. Kumada, and Y. Takuwa, "A fumagillin derivative angiogenesis inhibitor, agm-1470, inhibits activation of cyclin-dependent kinases and phosphorylation of retinoblastoma gene product but not protein tyrosyl phosphorylation or protooncogene expression in vascular endothelial cells.," *Cancer Res*, vol. 54, pp. 3407–3412, Jul 1994.
- [162] J. R. Yeh, R. Mohan, and C. M. Crews, "The antiangiogenic agent tnp-470 requires p53 and p21cip/waf for endothelial cell growth arrest.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, pp. 12782–12787, Nov 2000.
- [163] Y. Zhang, E. C. Griffith, J. Sage, T. Jacks, and J. O. Liu, "Cell cycle inhibition by the anti-angiogenic agent tnp-470 is mediated by p53 and p21waf1/cip1.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, pp. 6427–6432, Jun 2000.
- [164] S. Sebastian, A. Azzariti, N. Silvestris, L. Porcelli, A. Russo, and A. Paradiso, "p53 as the main traffic controller of the cell signaling network.," *Front Biosci*, vol. 15, pp. 1172–1190, 2010.
- [165] M. Yamaoka, T. Yamamoto, S. Ikeyama, K. Sudo, and T. Fujita, "Angiogenesis inhibitor tnp-470 (agm-1470) potently inhibits the tumor growth of hormone-independent human breast and prostate carcinoma cell lines.," *Cancer Res*, vol. 53, pp. 5233–5236, Nov 1993.
- [166] J. M. Gulbis, Z. Kelman, J. Hurwitz, M. O'Donnell, and J. Kuriyan, "Structure of the c-terminal region of p21(waf1/cip1) complexed with human pcna.," *Cell*, vol. 87, pp. 297–306, Oct 1996.
- [167] G. Hannig, D. D. Lazarus, S. G. Bernier, R. M. Karp, J. Lorusso, D. Qiu, M. T. Labenski, J. D. Wakefield, C. D. Thompson, and W. F. Westlin, "Inhibition of melanoma tumor growth by a pharmacological inhibitor of metap-2, ppi-2458.," *Int J Oncol*, vol. 28, pp. 955–963, Apr 2006.
- [168] H. Koyama, Y. Nishizawa, M. Hosoi, S. Fukumoto, K. Kogawa, A. Shioi, and H. Morii, "The fumagillin analogue tnp-470 inhibits dna synthesis of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-i. possible involvement of cyclin-dependent kinase 2.," *Circ Res*, vol. 79, pp. 757–764, Oct 1996.
- [169] A. Hori, S. Ikeyama, and K. Sudo, "Suppression of cyclin d1 mrna expression by the angiogenesis inhibitor tnp-470 (agm-1470) in vascular endothelial cells.," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 204, pp. 1067–1073, Nov 1994.
- [170] Y. Q. Wang, K. Ikeda, T. Ikebe, K. Hirakawa, M. Sowa, K. Nakatani, N. Kawada, and K. Kaneda, "Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic

analogue of fumagillin tnp-470 in rats.," *Hepatology*, vol. 32, pp. 980–989, Nov 2000.

[171] T. Kalebic, M. Tsokos, and L. J. Helman, "Suppression of rhabdomyosarcoma growth by fumagillin analog tnp-470.," *Int J Cancer*, vol. 68, pp. 596–599, Nov 1996.

[172] E. Tashiro, A. Tsuchiya, and M. Imoto, "Functions of cyclin d1 as an oncogene and regulation of cyclin d1 expression.," *Cancer Sci*, vol. 98, pp. 629–635, May 2007.

[173] N. Antoine, R. Greimers, C. D. Roanne, M. Kusaka, E. Heinen, L. J. Simar, and V. Castronovo, "Agm-1470, a potent angiogenesis inhibitor, prevents the entry of normal but not transformed endothelial cells into the g1 phase of the cell cycle.," *Cancer Res*, vol. 54, pp. 2073–2076, Apr 1994.

[174] W.-H. Lien, C.-K. Chen, L.-Y. Lai, Y.-H. Chen, M.-P. Wu, and L.-W. Wu, "Participation of cyclin d1 deregulation in tnp-470-mediated cytostatic effect: involvement of senescence.," *Biochem Pharmacol*, vol. 68, pp. 729–738, Aug 2004.

[175] S. Parangi, M. O'Reilly, G. Christofori, L. Holmgren, J. Grosfeld, J. Folkman, and D. Hanahan, "Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, pp. 2002–2007, Mar 1996.

[176] T. Yoshida, Y. Kaneko, A. Tsukamoto, K. Han, M. Ichinose, and S. Kimura, "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative tnp470: possible involvement of nitric oxide synthase.," *Cancer Res*, vol. 58, pp. 3751–3756, Aug 1998.

[177] N. Zamzami, C. Brenner, I. Marzo, S. A. Susin, and G. Kroemer, "Subcellular and submitochondrial mode of action of bcl-2-like oncoproteins.," *Oncogene*, vol. 16, pp. 2265–2282, Apr 1998.

[178] D. K. Morrison and R. J. Davis, "Regulation of map kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals.," *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 19, pp. 91–118, 2003.

[179] B. Datta, A. Majumdar, R. Datta, and R. Balusu, "Treatment of cells with the angiogenic inhibitor fumagillin results in increased stability of eukaryotic initiation factor 2-associated glycoprotein, p67, and reduced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases.," *Biochemistry*, vol. 43, pp. 14821–14831, Nov 2004.

[180] D. Kass, R. S. Bridges, A. Borczuk, and S. Greenberg, "Methionine aminopeptidase-2 as a selective target of myofibroblasts in pulmonary fibrosis.," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 37, pp. 193–201, Aug 2007.

[181] M. Kaya, T. Wada, S. Nagoya, S. Kawaguchi, T. Yamashita, N. Yamamoto, M. Yoshimoto, F. Okada, and S. Ishii, "Tnp-470 suppresses the tumorigenicity of ht1080 fibrosarcoma tumor through the inhibition of vegf secretion from the tumor cells.," *Sarcoma*, vol. 5, no. 4, pp. 197–202, 2001.

[182] Y. Zhang, J. R. Yeh, A. Mara, R. Ju, J. F. Hines, P. Cirone, H. L. Griesbach, I. Schneider, D. C. Slusarski, S. A. Holley, and C. M. Crews, "A chemical and genetic approach to the mode of

action of fumagillin.," *Chem Biol*, vol. 13, pp. 1001–1009, Sep 2006.

[183] C. M. Mazzanti, A. Tandle, D. Lorang, N. Costouros, D. Roberts, G. Bevilacqua, and S. K. Libutti, "Early genetic mechanisms underlying the inhibitory effects of endostatin and fumagillin on human endothelial cells.," *Genome Res*, vol. 14, pp. 1585–1593, Aug 2004.

[184] S. E. Warder, L. A. Tucker, S. M. McLoughlin, T. J. Strelitzer, J. L. Meuth, Q. Zhang, G. S. Sheppard, P. L. Richardson, R. Lesniewski, S. K. Davidsen, R. L. Bell, J. C. Rogers, and J. Wang, "Discovery, identification, and characterization of candidate pharmacodynamic markers of methionine aminopeptidase-2 inhibition.," *J Proteome Res*, vol. 7, pp. 4807–4820, Nov 2008.

[185] S. Y. Gerdes, M. D. Scholle, J. W. Campbell, G. Balázsi, E. Ravasz, M. D. Daugherty, A. L. Somera, N. C. Kyrpides, I. Anderson, M. S. Gelfand, A. Bhattacharya, V. Kapatral, M. D'Souza, M. V. Baev, Y. Grechkin, F. Mseeh, M. Y. Fonstein, R. Overbeek, A.-L. Barabási, Z. N. Oltvai, and A. L. Osterman, "Experimental determination and system level analysis of essential genes in escherichia coli mg1655.," *J Bacteriol*, vol. 185, pp. 5673–5684, Oct 2003.

[186] C. A. Hutchison, S. N. Peterson, S. R. Gill, R. T. Cline, O. White, C. M. Fraser, H. O. Smith, and J. C. Venter, "Global transposon mutagenesis and a minimal mycoplasma genome.," *Science*, vol. 286, pp. 2165–2169, Dec 1999.

[187] K. Kobayashi, S. D. Ehrlich, A. Albertini, G. Amati, K. K. Andersen, M. Arnaud, K. Asai, S. Ashikaga, S. Aymerich, P. Bessieres, F. Boland, S. C. Brignell, S. Bron, K. Bunai, J. Chapuis, L. C. Christiansen, A. Danchin, M. Débarbouille, E. Dervyn, E. Deuerling, K. Devine, S. K. Devine, O. Dreesen, J. Errington, S. Fillinger, S. J. Foster, Y. Fujita, A. Galizzi, R. Gardan, C. Eschevins, T. Fukushima, K. Haga, C. R. Harwood, M. Hecker, D. Hosoya, M. F. Hullo, H. Kakeshita, D. Karamata, Y. Kasahara, F. Kawamura, K. Koga, P. Koski, R. Kuwana, D. Imamura, M. Ishimaru, S. Ishikawa, I. Ishio, D. L. Coq, A. Masson, C. Mauël, R. Meima, R. P. Mellado, A. Moir, S. Moriya, E. Nagakawa, H. Nanamiya, S. Nakai, P. Nygaard, M. Ogura, T. Ohanan, M. O'Reilly, M. O'Rourke, Z. Pragai, H. M. Pooley, G. Rapoport, J. P. Rawlins, L. A. Rivas, C. Rivolta, A. Sadaie, Y. Sadaie, M. Sarvas, T. Sato, H. H. Saxild, E. Scanlan, W. Schumann, J. F. M. L. Seegers, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Séror, M. Simon, P. Stragier, R. Studer, H. Takamatsu, T. Tanaka, M. Takeuchi, H. B. Thomaidis, V. Vagner, J. M. van Dijl, K. Watabe, A. Wipat, H. Yamamoto, M. Yamamoto, Y. Yamamoto, K. Yamane, K. Yata, K. Yoshida, H. Yoshikawa, U. Zuber, and N. Ogasawara, "Essential bacillus subtilis genes.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 4678–4683, Apr 2003.

[188] M. D. Katinka, S. Duprat, E. Cornillot, G. Méténier, F. Thomarat, G. Prensier, V. Barbe, E. Peyretailade, P. Brottier, P. Wincker, F. Delbac, H. E. Alaoui, P. Peyret, W. Saurin, M. Gouy, J. Weissenbach, and C. P. Vivarès, "Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite encephalitozoon cuniculi.," *Nature*, vol. 414, pp. 450–453, Nov 2001.

[189] S. Y. Chang, E. C. McGary, and S. Chang, "Methionine aminopeptidase gene of escherichia

coli is essential for cell growth.," *J Bacteriol*, vol. 171, pp. 4071–4072, Jul 1989.

[190] T. Meinnel and S. Blanquet, "Characterization of the thermus thermophilus locus encoding peptide deformylase and methionyl-trna(fmet) formyltransferase.," *J Bacteriol*, vol. 176, pp. 7387–7390, Dec 1994.

[191] C. G. Miller, A. M. Kukral, J. L. Miller, and N. R. Movva, "pepm is an essential gene in salmonella typhimurium.," *J Bacteriol*, vol. 171, pp. 5215–5217, Sep 1989.

[192] R. J. Duronio, D. A. Towler, R. O. Heuckeroth, and J. I. Gordon, "Disruption of the yeast n-myristoyl transferase gene causes recessive lethality.," *Science*, vol. 243, pp. 796–800, Feb 1989.

[193] M. Ntwasa, S. Aapies, D. A. Schiffmann, and N. J. Gay, "Drosophila embryos lacking n-myristoyltransferase have multiple developmental defects.," *Exp Cell Res*, vol. 262, pp. 134–144, Jan 2001.

[194] M. Pierre, J. A. Traverso, B. Boisson, S. Domenichini, D. Bouchez, C. Giglione, and T. Meinnel, "N-myristoylation regulates the snrk1 pathway in arabidopsis.," *Plant Cell*, vol. 19, pp. 2804–2821, Sep 2007.

[195] B. Boisson, C. Giglione, and T. Meinnel, "Unexpected protein families including cell defense components feature in the n-myristoylome of a higher eukaryote.," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 43418–43429, Oct 2003.

[196] B. Dummitt, W. S. Micka, and Y.-H. Chang, "Yeast glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (gfa1) requires methionine aminopeptidase activity for proper function.," *J Biol Chem*, vol. 280, pp. 14356–14360, Apr 2005.

[197] D. L. Newton, L. Boque, A. Wlodawer, C. Y. Huang, and S. M. Rybak, "Single amino acid substitutions at the n-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties.," *Biochemistry*, vol. 37, pp. 5173–5183, Apr 1998.

[198] A. E. Proudfoot, C. A. Power, A. J. Hoogewerf, M. O. Montjovent, F. Borlat, R. E. Offord, and T. N. Wells, "Extension of recombinant human rantes by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist.," *J Biol Chem*, vol. 271, pp. 2599–2603, Feb 1996.

[199] K. C. Olson, J. Fenno, N. Lin, R. N. Harkins, C. Snider, W. H. Kohr, M. J. Ross, D. Fodge, G. Prender, and N. Stebbing, "Purified human growth hormone from e. coli is biologically active.," *Nature*, vol. 293, pp. 408–411, Oct 1981.

[200] B. Schlott, M. Hartmann, K. H. Gührs, E. Birch-Hirschfeld, A. Gase, S. Vettermann, D. Collen, and H. R. Lijnen, "Functional properties of recombinant staphylokinase variants obtained by site-specific mutagenesis of methionine-26.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1204, pp. 235–242, Feb 1994.

[201] T. Kanno, H. Endo, K. Takeuchi, Y. Morishita, M. Fukayama, and S. Mori, "High expression of methionine aminopeptidase type 2 in germinal center b cells and their neoplastic counterparts.," *Lab*

Invest, vol. 82, pp. 893–901, Jul 2002.

[202] P. Selvakumar, A. Lakshmikuttyamma, R. Kanthan, S. C. Kanthan, J. R. Dimmock, and R. K. Sharma, “High expression of methionine aminopeptidase 2 in human colorectal adenocarcinomas.,” *Clin Cancer Res*, vol. 10, pp. 2771–2775, Apr 2004.

[203] T. Cutforth and U. Gaul, “A methionine aminopeptidase and putative regulator of translation initiation is required for cell growth and patterning in drosophila.,” *Mech Dev*, vol. 82, pp. 23–28, Apr 1999.

[204] M. D. Cleary, U. Singh, I. J. Blader, J. L. Brewer, and J. C. Boothroyd, “Toxoplasma gondii asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression.,” *Eukaryot Cell*, vol. 1, pp. 329–340, Jun 2002.

[205] L. Florens, M. P. Washburn, J. D. Raine, R. M. Anthony, M. Grainger, J. D. Haynes, J. K. Moch, N. Muster, J. B. Sacci, D. L. Tabb, A. A. Witney, D. Wolters, Y. Wu, M. J. Gardner, A. A. Holder, R. E. Sinden, J. R. Yates, and D. J. Carucci, “A proteomic view of the plasmodium falciparum life cycle.,” *Nature*, vol. 419, pp. 520–526, Oct 2002.

[206] G. Taroncher-Oldenburg and D. M. Anderson, “Identification and characterization of three differentially expressed genes, encoding s-adenosylhomocysteine hydrolase, methionine aminopeptidase, and a histone-like protein, in the toxic dinoflagellate alexandrium fundyense.,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 66, pp. 2105–2112, May 2000.

[207] M. Drath, K. Baier, and K. Forchhammer, “An alternative methionine aminopeptidase, map-a, is required for nitrogen starvation and high-light acclimation in the cyanobacterium synechocystis sp. pcc 6803.,” *Microbiology*, vol. 155, pp. 1427–1439, May 2009.

[208] a. Hee-Jeong Jeonga, Jeong Sheop Shin¹ and S. H. Ok, “Barley dna-binding methionine aminopeptidase, which changes the localization from the nucleus to the cytoplasm by low temperature, is involved in freezing tolerance,” *Plant Science*, vol. 180, pp. 53–60, 2011.

[209] J. Moskovitz, B. S. Berlett, J. M. Poston, and E. R. Stadtman, “The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, pp. 9585–9589, Sep 1997.

[210] P. A. Outinen, S. K. Sood, S. I. Pfeifer, S. Pamidi, T. J. Podor, J. Li, J. I. Weitz, and R. C. Austin, “Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells.,” *Blood*, vol. 94, pp. 959–967, Aug 1999.

[211] A. Rouillon, R. Barbey, E. E. Patton, M. Tyers, and D. Thomas, “Feedback-regulated degradation of the transcriptional activator met4 is triggered by the scf(met30) complex.,” *EMBO J*, vol. 19, pp. 282–294, Jan 2000.

[212] G. A. Marzluf, “Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi.,” *Microbiol Mol Biol*

Rev, vol. 61, pp. 17–32, Mar 1997.

[213] G. A. Marzluf, “Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast.,” *Annu Rev Microbiol*, vol. 51, pp. 73–96, 1997.

[214] D. Thomas and Y. Surdin-Kerjan, “Metabolism of sulfur amino acids in *saccharomyces cerevisiae*.,” *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 61, pp. 503–532, Dec 1997.

[215] T. Leustek, M. N. Martin, J.-A. Bick, and J. P. Davies, “Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies.,” *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, vol. 51, pp. 141–165, Jun 2000.

[216] S. Chen, J. A. Vetro, and Y.-H. Chang, “The specificity in vivo of two distinct methionine aminopeptidases in *saccharomyces cerevisiae*.,” *Arch Biochem Biophys*, vol. 398, pp. 87–93, Feb 2002.

[217] A. M. Rincón and T. Benítez, “Improved organoleptic and nutritive properties of bakery products supplemented with amino acid overproducing *saccharomyces cerevisiae* yeasts.,” *J Agric Food Chem*, vol. 49, pp. 1861–1866, Apr 2001.

[218] B. Shen, C. Li, and M. C. Tarczynski, “High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the *arabidopsis* s-adenosyl-l-methionine synthetase 3 gene.,” *Plant J*, vol. 29, pp. 371–380, Feb 2002.

[219] S. Ravanel, B. Gakière, D. Job, and R. Douce, “The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, pp. 7805–7812, Jun 1998.

[220] A. Ciechanover, “Intracellular protein degradation from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and on to human diseases and drug targeting: Nobel lecture, december 8, 2004.,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1116, pp. 1–28, Nov 2007.

[221] A. L. Schwartz and A. Ciechanover, “Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology.,” *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 49, pp. 73–96, 2009.

[222] A. G. Eldridge and T. O’Brien, “Therapeutic strategies within the ubiquitin proteasome system.,” *Cell Death Differ*, vol. 17, pp. 4–13, Jan 2010.

[223] K. I. Nakayama and K. Nakayama, “Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer.,” *Nat Rev Cancer*, vol. 6, pp. 369–381, May 2006.

[224] A. Ciechanover, R. Gropper, and A. L. Schwartz, “The ubiquitin-activating enzyme is required for lysosomal degradation of cellular proteins under stress.,” *Biomed Biochim Acta*, vol. 50, no. 4-6, pp. 321–332, 1991.

[225] A. Ciechanover, H. Heller, S. Elias, A. L. Haas, and A. Hershko, “Atp-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 77, pp. 1365–1368, Mar 1980.

- [226] A. Ciechanover and A. L. Schwartz, "The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins.," *FASEB J*, vol. 8, pp. 182–191, Feb 1994.
- [227] D. Finley, "Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome.," *Annu Rev Biochem*, vol. 78, pp. 477–513, 2009.
- [228] T. Ravid and M. Hochstrasser, "Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system.," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 9, pp. 679–690, Sep 2008.
- [229] A. Ciechanover, K. Breitschopf, O. A. Hatoum, and E. Bengal, "Degradation of myod by the ubiquitin pathway: regulation by specific dna-binding and identification of a novel site for ubiquitination.," *Mol Biol Rep*, vol. 26, pp. 59–64, Apr 1999.
- [230] A. Varshavsky, "The n-end rule: functions, mysteries, uses.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, pp. 12142–12149, Oct 1996.
- [231] D. A. Dougan, K. N. Truscott, and K. Zeth, "The bacterial n-end rule pathway: expect the unexpected.," *Mol Microbiol*, vol. 76, pp. 545–558, May 2010.
- [232] E. Graciet, F. Mesiti, and F. Wellmer, "Structure and evolutionary conservation of the plant n-end rule pathway.," *Plant J*, vol. 61, pp. 741–751, Mar 2010.
- [233] V. J. Schuenemann, S. M. Kralik, R. Albrecht, S. K. Spall, K. N. Truscott, D. A. Dougan, and K. Zeth, "Structural basis of n-end rule substrate recognition in escherichia coli by the clpap adaptor protein clps.," *EMBO Rep*, vol. 10, pp. 508–514, May 2009.
- [234] G. Román-Hernández, R. A. Grant, R. T. Sauer, and T. A. Baker, "Molecular basis of substrate selection by the n-end rule adaptor protein clps.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, pp. 8888–8893, Jun 2009.
- [235] A. Bachmair, D. Finley, and A. Varshavsky, "In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue.," *Science*, vol. 234, pp. 179–186, Oct 1986.
- [236] P. Lee, E. Beem, and M. S. Segal, "Marker for real-time analysis of caspase activity in intact cells.," *Biotechniques*, vol. 33, pp. 1284–7, 1289–91, Dec 2002.
- [237] C. K. Worley, R. Ling, and J. Callis, "Engineering in vivo instability of firefly luciferase and escherichia coli beta-glucuronidase in higher plants using recognition elements from the ubiquitin pathway.," *Plant Mol Biol*, vol. 37, pp. 337–347, May 1998.
- [238] P. H. Hirel, M. J. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, and S. Blanquet, "Extent of n-terminal methionine excision from escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 86, pp. 8247–8251, Nov 1989.
- [239] S. V. Sawant, K. Kiran, P. K. Singh, and R. Tuli, "Sequence architecture downstream of the initiator codon enhances gene expression and protein stability in plants.," *Plant Physiol*, vol. 126, pp. 1630–1636, Aug 2001.

- [240] C. Giglione, O. Vallon, and T. Meinel, "Control of protein life-span by n-terminal methionine excision.," *EMBO J*, vol. 22, pp. 13–23, Jan 2003.
- [241] M. Nishizawa, K. Okazaki, N. Furuno, N. Watanabe, and N. Sagata, "The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of mos during the meiotic cell cycle in xenopus oocytes.," *EMBO J*, vol. 11, pp. 2433–2446, Jul 1992.
- [242] G. Nusspaumer, M. Remacha, and J. P. Ballesta, "Phosphorylation and n-terminal region of yeast ribosomal protein p1 mediate its degradation, which is prevented by protein p2.," *EMBO J*, vol. 19, pp. 6075–6084, Nov 2000.
- [243] E. M. Aro, I. Virgin, and B. Andersson, "Photoinhibition of photosystem ii. inactivation, protein damage and turnover.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1143, pp. 113–134, Jul 1993.
- [244] A. V. Vener, A. Harms, M. R. Sussman, and R. D. Vierstra, "Mass spectrometric resolution of reversible protein phosphorylation in photosynthetic membranes of arabidopsis thaliana.," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 6959–6966, Mar 2001.
- [245] C. Andronis, O. Kruse, Z. Deák, I. Vass, B. A. Diner, and P. J. Nixon, "Mutation of residue threonine-2 of the d2 polypeptide and its effect on photosystem ii function in chlamydomonas reinhardtii.," *Plant Physiol*, vol. 117, pp. 515–524, Jun 1998.
- [246] Fleischmann and Rochaix, "Characterization of mutants with alterations of the phosphorylation site in the d2 photosystem ii polypeptide of chlamydomonas reinhardtii.," *Plant Physiol*, vol. 119, pp. 1557–1566, Apr 1999.
- [247] D. Biran, E. Gur, L. Gollan, and E. Z. Ron, "Control of methionine biosynthesis in escherichia coli by proteolysis.," *Mol Microbiol*, vol. 37, pp. 1436–1443, Sep 2000.
- [248] G. G. Johnson, W. A. Kronert, S. I. Bernstein, V. M. Chapman, and K. D. Smith, "Altered turnover of allelic variants of hypoxanthine phosphoribosyltransferase is associated with n-terminal amino acid sequence variation.," *J Biol Chem*, vol. 263, pp. 9079–9082, Jul 1988.
- [249] C.-S. Hwang, A. Shemorry, and A. Varshavsky, "N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals.," *Science*, vol. 327, pp. 973–977, Feb 2010.
- [250] M. D. Petroski and R. J. Deshaies, "Context of multiubiquitin chain attachment influences the rate of sic1 degradation.," *Mol Cell*, vol. 11, pp. 1435–1444, Jun 2003.
- [251] J. Bloom, V. Amador, F. Bartolini, G. DeMartino, and M. Pagano, "Proteasome-mediated degradation of p21 via n-terminal ubiquitinylation.," *Cell*, vol. 115, pp. 71–82, Oct 2003.
- [252] S. Aviel, G. Winberg, M. Massucci, and A. Ciechanover, "Degradation of the epstein-barr virus latent membrane protein 1 (lmp1) by the ubiquitin-proteasome pathway. targeting via ubiquitination of the n-terminal residue.," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 23491–23499, Aug 2000.
- [253] M. Ikeda, A. Ikeda, and R. Longnecker, "Lysine-independent ubiquitination of epstein-barr virus lmp2a.," *Virology*, vol. 300, pp. 153–159, Aug 2002.

- [254] E. Reinstein, M. Scheffner, M. Oren, A. Ciechanover, and A. Schwartz, "Degradation of the e7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the n-terminal residue.," *Oncogene*, vol. 19, pp. 5944–5950, Nov 2000.
- [255] I. Fajerman, A. L. Schwartz, and A. Ciechanover, "Degradation of the id2 developmental regulator: targeting via n-terminal ubiquitination.," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 314, pp. 505–512, Feb 2004.
- [256] R. Ben-Saadon, I. Fajerman, T. Ziv, U. Hellman, A. L. Schwartz, and A. Ciechanover, "The tumor suppressor protein p16(ink4a) and the human papillomavirus oncoprotein-58 e7 are naturally occurring lysine-less proteins that are degraded by the ubiquitin system. direct evidence for ubiquitination at the n-terminal residue.," *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 41414–41421, Oct 2004.
- [257] M.-L. Kuo, W. den Besten, D. Bertwistle, M. F. Roussel, and C. J. Sherr, "N-terminal polyubiquitination and degradation of the arf tumor suppressor.," *Genes Dev*, vol. 18, pp. 1862–1874, Aug 2004.
- [258] M.-L. Kuo, W. den Besten, and C. J. Sherr, "N-terminal polyubiquitination of the arf tumor suppressor, a natural lysine-less protein.," *Cell Cycle*, vol. 3, pp. 1367–1369, Nov 2004.
- [259] Z. Adam and A. K. Clarke, "Cutting edge of chloroplast proteolysis.," *Trends Plant Sci*, vol. 7, pp. 451–456, Oct 2002.
- [260] K. Haussühl, B. Andersson, and I. Adamska, "A chloroplast degp2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged d1 protein in plant photosystem ii.," *EMBO J*, vol. 20, pp. 713–722, Feb 2001.
- [261] M. Lindahl, C. Spetea, T. Hundal, A. B. Oppenheim, Z. Adam, and B. Andersson, "The thylakoid ftsh protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem ii d1 protein.," *Plant Cell*, vol. 12, pp. 419–431, Mar 2000.
- [262] J. M. Flynn, S. B. Neher, Y. I. Kim, R. T. Sauer, and T. A. Baker, "Proteomic discovery of cellular substrates of the clpx protease reveals five classes of clpx-recognition signals.," *Mol Cell*, vol. 11, pp. 671–683, Mar 2003.
- [263] A. Martinez, J. A. Traverso, B. Valot, M. Ferro, C. Espagne, G. Ephritikhine, M. Zivy, C. Giglione, and T. Meinnel, "Extent of n-terminal modifications in cytosolic proteins from eukaryotes.," *Proteomics*, vol. 8, pp. 2809–2831, Jul 2008.
- [264] T. Meinnel, P. Peynot, and C. Giglione, "Processed n-termini of mature proteins in higher eukaryotes and their major contribution to dynamic proteomics.," *Biochimie*, vol. 87, pp. 701–712, Aug 2005.
- [265] B. Polevoda and F. Sherman, "N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for n-terminal acetylation of eukaryotic proteins.," *J Mol Biol*, vol. 325, pp. 595–622, Jan 2003.
- [266] S. Spange, T. Wagner, T. Heinzl, and O. H. Krämer, "Acetylation of non-histone proteins

- modulates cellular signalling at multiple levels.,” *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 41, pp. 185–198, Jan 2009.
- [267] T. Arnesen, P. V. Damme, B. Polevoda, K. Helsens, R. Evjenth, N. Colaert, J. E. Varhaug, J. Vandekerckhove, J. R. Lillehaug, F. Sherman, and K. Gevaert, “Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of n-terminal acetyltransferases from yeast and humans.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, pp. 8157–8162, May 2009.
- [268] S. Goetze, E. Qeli, C. Mosimann, A. Staes, B. Gerrits, B. Roschitzki, S. Mohanty, E. M. Niederer, E. Laczko, E. Timmerman, V. Lange, E. Hafen, R. Aebersold, J. Vandekerckhove, K. Basler, C. H. Ahrens, K. Gevaert, and E. Brunner, “Identification and functional characterization of n-terminally acetylated proteins in drosophila melanogaster.,” *PLoS Biol*, vol. 7, p. e1000236, Nov 2009.
- [269] Y. Gordiyenko, S. Deroo, M. Zhou, H. Videler, and C. V. Robinson, “Acetylation of 112 increases interactions in the escherichia coli ribosomal stalk complex.,” *J Mol Biol*, vol. 380, pp. 404–414, Jul 2008.
- [270] M. Aivaliotis, K. Gevaert, M. Falb, A. Tebbe, K. Konstantinidis, B. Bisle, C. Klein, L. Martens, A. Staes, E. Timmerman, J. V. Damme, F. Siedler, F. Pfeiffer, J. Vandekerckhove, and D. Oesterhelt, “Large-scale identification of n-terminal peptides in the halophilic archaea halobacterium salinarum and natronomonas pharaonis.,” *J Proteome Res*, vol. 6, pp. 2195–2204, Jun 2007.
- [271] M. Falb, M. Aivaliotis, C. Garcia-Rizo, B. Bisle, A. Tebbe, C. Klein, K. Konstantinidis, F. Siedler, F. Pfeiffer, and D. Oesterhelt, “Archaeal n-terminal protein maturation commonly involves n-terminal acetylation: a large-scale proteomics survey.,” *J Mol Biol*, vol. 362, pp. 915–924, Oct 2006.
- [272] P. A. Kirkland, M. A. Humbard, C. J. Daniels, and J. A. Maupin-Furlow, “Shotgun proteomics of the haloarchaeon haloferax volcanii.,” *J Proteome Res*, vol. 7, pp. 5033–5039, Nov 2008.
- [273] H. P. Driessen, W. W. de Jong, G. I. Tesser, and H. Bloemendal, “The mechanism of n-terminal acetylation of proteins.,” *CRC Crit Rev Biochem*, vol. 18, no. 4, pp. 281–325, 1985.
- [274] A. Mogk and B. Bukau, “Cell biology. when the beginning marks the end.,” *Science*, vol. 327, pp. 966–967, Feb 2010.
- [275] F. Frottin, A. Martinez, P. Peynot, S. Mitra, R. C. Holz, C. Giglione, and T. Meinel, “The proteomics of n-terminal methionine cleavage.,” *Mol Cell Proteomics*, vol. 5, pp. 2336–2349, Dec 2006.
- [276] B. Datta, “Maps and poep of the roads from prokaryotic to eukaryotic kingdoms.,” *Biochimie*, vol. 82, pp. 95–107, Feb 2000.
- [277] E. C. Griffith, Z. Su, S. Niwayama, C. A. Ramsay, Y. H. Chang, and J. O. Liu, “Molecular recognition of angiogenesis inhibitors fumagillin and ovalicin by methionine aminopeptidase 2.,” *Proc*

Natl Acad Sci U S A, vol. 95, pp. 15183–15188, Dec 1998.

[278] R. L. Levine, J. A. Williams, E. R. Stadtman, and E. Shacter, “Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins.,” *Methods Enzymol*, vol. 233, pp. 346–357, 1994.

[279] E. Shacter, “Protein oxidative damage.,” *Methods Enzymol*, vol. 319, pp. 428–436, 2000.

[280] R. L. Levine, N. Wehr, J. A. Williams, E. R. Stadtman, and E. Shacter, “Determination of carbonyl groups in oxidized proteins.,” *Methods Mol Biol*, vol. 99, pp. 15–24, 2000.

[281] E. Johansson, O. Olsson, and T. Nyström, “Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of arabidopsis thaliana.,” *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 22204–22208, May 2004.

[282] C. Job, L. Rajjou, Y. Lovigny, M. Belghazi, and D. Job, “Patterns of protein oxidation in arabidopsis seeds and during germination.,” *Plant Physiol*, vol. 138, pp. 790–802, Jun 2005.

[283] M. B. Toledano, C. Kumar, N. L. Moan, D. Spector, and F. Tacnet, “The system biology of thiol redox system in escherichia coli and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and dna synthesis.,” *FEBS Lett*, vol. 581, pp. 3598–3607, Jul 2007.

[284] F. Bourgis, S. Roje, M. L. Nuccio, D. B. Fisher, M. C. Tarczynski, C. Li, C. Herschbach, H. Rennenberg, M. J. Pimenta, T. L. Shen, D. A. Gage, and A. D. Hanson, “S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase.,” *Plant Cell*, vol. 11, pp. 1485–1498, Aug 1999.

[285] M. Wirtz and M. Droux, “Synthesis of the sulfur amino acids: cysteine and methionine.,” *Photosynth Res*, vol. 86, pp. 345–362, Dec 2005.

[286] A. Goyer, E. Collakova, Y. Shachar-Hill, and A. D. Hanson, “Functional characterization of a methionine gamma-lyase in arabidopsis and its implication in an alternative to the reverse trans-sulfuration pathway.,” *Plant Cell Physiol*, vol. 48, pp. 232–242, Feb 2007.

[287] F. Rébeillé, S. Jabrin, R. Bligny, K. Loizeau, B. Gambonnet, V. V. Wilder, R. Douce, and S. Ravanel, “Methionine catabolism in arabidopsis cells is initiated by a gamma-cleavage process and leads to s-methylcysteine and isoleucine syntheses.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, pp. 15687–15692, Oct 2006.

[288] L. Marty, W. Siala, M. Schwarzländer, M. D. Fricker, M. Wirtz, L. J. Sweetlove, Y. Meyer, A. J. Meyer, J.-P. Reichheld, and R. Hell, “The nadph-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in arabidopsis.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, pp. 9109–9114, Jun 2009.

[289] T. Allers, S. Barak, S. Liddell, K. Wardell, and M. Mevarech, “Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of his-tagged proteins in haloferax volcanii.,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 76, pp. 1759–1769, Mar 2010.

[290] J. Soppa, “From genomes to function: haloarchaea as model organisms.,” *Microbiology*, vol. 152, pp. 585–590, Mar 2006.

- [291] T. H. Tahirov, H. Oki, T. Tsukihara, K. Ogasahara, Y. Izu, S. Tsunasawa, I. Kato, and K. Yutani, "Crystallization and preliminary x-ray analysis of methionine aminopeptidase from the hyperthermophilic bacterium *pyrococcus furiosus*." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 53, pp. 798–801, Nov 1997.
- [292] G. L. Newton and B. Javor, "gamma-glutamylcysteine and thiosulfate are the major low-molecular-weight thiols in halobacteria." *J Bacteriol*, vol. 161, pp. 438–441, Jan 1985.
- [293] A. R. Sundquist and R. C. Fahey, "The function of gamma-glutamylcysteine and bis-gamma-glutamylcystine reductase in halobacterium halobium." *J Biol Chem*, vol. 264, pp. 719–725, Jan 1989.
- [294] L. Malki, M. Yanku, I. Borovok, G. Cohen, M. Mevarech, and Y. Aharonowitz, "Identification and characterization of gsha, a gene encoding the glutamate-cysteine ligase in the halophilic archaeon *haloferax volcanii*." *J Bacteriol*, vol. 191, pp. 5196–5204, Aug 2009.
- [295] C. M. Apfel, S. Evers, C. Hubschwerlen, W. Pirson, M. G. Page, and W. Keck, "Peptide deformylase as an antibacterial drug target: assays for detection of its inhibition in *escherichia coli* cell homogenates and intact cells." *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 45, pp. 1053–1057, Apr 2001.
- [296] Y. Yamamoto, R. Aminaka, M. Yoshioka, M. Khatoon, K. Komayama, D. Takenaka, A. Yamashita, N. Nijo, K. Inagawa, N. Morita, T. Sasaki, and Y. Yamamoto, "Quality control of photosystem ii: impact of light and heat stresses." *Photosynth Res*, vol. 98, no. 1-3, pp. 589–608, 2008.
- [297] Z. Adam, A. Rudella, and K. J. van Wijk, "Recent advances in the study of clp, ftsh and other proteases located in chloroplasts." *Curr Opin Plant Biol*, vol. 9, pp. 234–240, Jun 2006.
- [298] S. Bailey, E. Thompson, P. J. Nixon, P. Horton, C. W. Mullineaux, C. Robinson, and N. H. Mann, "A critical role for the var2 ftsh homologue of *arabidopsis thaliana* in the photosystem ii repair cycle in vivo." *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 2006–2011, Jan 2002.
- [299] M. Lindahl, S. Tabak, L. Cseke, E. Pichersky, B. Andersson, and Z. Adam, "Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial ftsh protease in chloroplasts of higher plants." *J Biol Chem*, vol. 271, pp. 29329–29334, Nov 1996.
- [300] P. Silva, E. Thompson, S. Bailey, O. Kruse, C. W. Mullineaux, C. Robinson, N. H. Mann, and P. J. Nixon, "Ftsh is involved in the early stages of repair of photosystem ii in *synechocystis* sp pcc 6803." *Plant Cell*, vol. 15, pp. 2152–2164, Sep 2003.
- [301] M. Yoshioka, S. Uchida, H. Mori, K. Komayama, S. Ohira, N. Morita, T. Nakanishi, and Y. Yamamoto, "Quality control of photosystem ii. cleavage of reaction center d1 protein in spinach thylakoids by ftsh protease under moderate heat stress." *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 21660–21669, Aug 2006.
- [302] K. Ito and Y. Akiyama, "Cellular functions, mechanism of action, and regulation of ftsh protease." *Annu Rev Microbiol*, vol. 59, pp. 211–231, 2005.

- [303] W. Sakamoto, A. Zaltsman, Z. Adam, and Y. Takahashi, "Coordinated regulation and complex formation of yellow variegated1 and yellow variegated2, chloroplastic ftsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem ii in arabidopsis thylakoid membranes.," *Plant Cell*, vol. 15, pp. 2843–2855, Dec 2003.
- [304] G. Sinvany-Villalobo, O. Davydov, G. Ben-Ari, A. Zaltsman, A. Raskind, and Z. Adam, "Expression in multigene families. analysis of chloroplast and mitochondrial proteases.," *Plant Physiol*, vol. 135, pp. 1336–1345, Jul 2004.
- [305] A. Zaltsman, N. Ori, and Z. Adam, "Two types of ftsH protease subunits are required for chloroplast biogenesis and photosystem ii repair in arabidopsis.," *Plant Cell*, vol. 17, pp. 2782–2790, Oct 2005.
- [306] F. Yu, X. Liu, M. Alsheikh, S. Park, and S. Rodermel, "Mutations in suppressor of variegation1, a factor required for normal chloroplast translation, suppress var2-mediated leaf variegation in arabidopsis.," *Plant Cell*, vol. 20, pp. 1786–1804, Jul 2008.
- [307] Y. Kato, E. Miura, K. Ido, K. Ifuku, and W. Sakamoto, "The variegated mutants lacking chloroplastic ftsHs are defective in d1 degradation and accumulate reactive oxygen species.," *Plant Physiol*, vol. 151, pp. 1790–1801, Dec 2009.
- [308] B. Franzetti, G. Schoehn, J.-F. Hernandez, M. Jaquinod, R. W. H. Ruigrok, and G. Zaccari, "Tetrahedral aminopeptidase: a novel large protease complex from archaea.," *EMBO J*, vol. 21, pp. 2132–2138, May 2002.
- [309] W. V. Ng, S. P. Kennedy, G. G. Mahairas, B. Berquist, M. Pan, H. D. Shukla, S. R. Lasky, N. S. Baliga, V. Thorsson, J. Sbrogna, S. Swartzell, D. Weir, J. Hall, T. A. Dahl, R. Welti, Y. A. Goo, B. Leithauser, K. Keller, R. Cruz, M. J. Danson, D. W. Hough, D. G. Maddocks, P. E. Jablonski, M. P. Krebs, C. M. Angevine, H. Dale, T. A. Isenbarger, R. F. Peck, M. Pohlschroder, J. L. Spudich, K. W. Jung, M. Alam, T. Freitas, S. Hou, C. J. Daniels, P. P. Dennis, A. D. Omer, H. Ebhardt, T. M. Lowe, P. Liang, M. Riley, L. Hood, and S. DasSarma, "Genome sequence of halobacterium species nrc-1.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, pp. 12176–12181, Oct 2000.
- [310] S. Russo and U. Baumann, "Crystal structure of a dodecameric tetrahedral-shaped aminopeptidase.," *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 51275–51281, Dec 2004.
- [311] S. Ando, K. Ishikawa, H. Ishida, Y. Kawarabayasi, H. Kikuchi, and Y. Kosugi, "Thermostable aminopeptidase from pyrococcus horikoshii.," *FEBS Lett*, vol. 447, pp. 25–28, Mar 1999.
- [312] G. Schoehn, F. M. D. Vellieux, M. A. Durá, V. Receveur-Bréchet, C. M. S. Fabry, R. W. H. Ruigrok, C. Ebel, A. Roussel, and B. Franzetti, "An archaeal peptidase assembles into two different quaternary structures: A tetrahedron and a giant octahedron.," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 36327–36337, Nov 2006.
- [313] M. A. Durá, V. Receveur-Brechot, J.-P. Andrieu, C. Ebel, G. Schoehn, A. Roussel, and

B. Franzetti, "Characterization of a tet-like aminopeptidase complex from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus horikoshii*," *Biochemistry*, vol. 44, pp. 3477–3486, Mar 2005.

[314] L. Borissenko and M. Groll, "Crystal structure of tet protease reveals complementary protein degradation pathways in prokaryotes.," *J Mol Biol*, vol. 346, pp. 1207–1219, Mar 2005.

[315] M. A. Durá, E. Rosenbaum, A. Larabi, F. Gabel, F. M. D. Vellieux, and B. Franzetti, "The structural and biochemical characterizations of a novel tet peptidase complex from *pyrococcus horikoshii* reveal an integrated peptide degradation system in hyperthermophilic archaea.," *Mol Microbiol*, vol. 72, pp. 26–40, Apr 2009.

[316] A. L. Hartman, C. Norais, J. H. Badger, S. Delmas, S. Haldenby, R. Madupu, J. Robinson, H. Khouri, Q. Ren, T. M. Lowe, J. Maupin-Furlow, M. Pohlschroder, C. Daniels, F. Pfeiffer, T. Allers, and J. A. Eisen, "The complete genome sequence of *haloferax volcanii* ds2, a model archaeon.," *PLoS One*, vol. 5, no. 3, p. e9605, 2010.

[317] L. Placidi, E. Cretton-Scott, G. de Sousa, R. Rahmani, M. Placidi, and J. P. Sommadossi, "Disposition and metabolism of the angiogenic moderator *o*-(chloroacetyl-carbamoyl) fumagillol (tnp-470; agm-1470) in human hepatocytes and tissue microsomes.," *Cancer Res*, vol. 55, pp. 3036–3042, Jul 1995.

[318] L. Placidi, E. C. Scott, G. de Sousa, R. Rahmani, M. Placidi, and J. P. Sommadossi, "Interspecies variability of tnp-470 metabolism, using primary monkey, rat, and dog cultured hepatocytes.," *Drug Metab Dispos*, vol. 25, pp. 94–99, Jan 1997.

[319] U. Cavallaro, S. Liebner, and E. Dejana, "Endothelial cadherins and tumor angiogenesis.," *Exp Cell Res*, vol. 312, pp. 659–667, Mar 2006.

[320] K. W. Walker, E. Yi, and R. A. Bradshaw, "Yeast (*saccharomyces cerevisiae*) methionine aminopeptidase i: rapid purification and improved activity assay.," *Biotechnol Appl Biochem*, vol. 29 (Pt 2), pp. 157–163, Apr 1999.

[321] V. Ramesh and U. L. RajBhandary, "Importance of the anticodon sequence in the aminoacylation of trnas by methionyl-trna synthetase and by valyl-trna synthetase in an archaeobacterium.," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 3660–3665, Feb 2001.

[322] A. J. Forbes, S. M. Patrie, G. K. Taylor, Y.-B. Kim, L. Jiang, and N. L. Kelleher, "Targeted analysis and discovery of posttranslational modifications in proteins from methanogenic archaea by top-down ms.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 2678–2683, Mar 2004.

[323] D. T. Mackay, C. H. Botting, G. L. Taylor, and M. F. White, "An acetylase with relaxed specificity catalyses protein n-terminal acetylation in *sulfolobus solfataricus*.," *Mol Microbiol*, vol. 64, pp. 1540–1548, Jun 2007.

[324] W. Zhu, C. I. Reich, G. J. Olsen, C. S. Giometti, and J. R. Yates, "Shotgun proteomics of *methanococcus jannaschii* and insights into methanogenesis.," *J Proteome Res*, vol. 3, no. 3, pp. 538–

548, 2004.

- [325] Q. Xiao, F. Zhang, B. A. Nacev, J. O. Liu, and D. Pei, "Protein n-terminal processing: substrate specificity of escherichia coli and human methionine aminopeptidases.," *Biochemistry*, vol. 49, pp. 5588–5599, Jul 2010.
- [326] C. H. Foyer and G. Noctor, "Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications.," *Antioxid Redox Signal*, vol. 11, pp. 861–905, Apr 2009.
- [327] G. Noctor and C. H. Foyer, "Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control.," *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, vol. 49, pp. 249–279, Jun 1998.
- [328] A. Fait, R. Angelovici, H. Less, I. Ohad, E. Urbanczyk-Wochniak, A. R. Fernie, and G. Galili, "Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches.," *Plant Physiol*, vol. 142, pp. 839–854, Nov 2006.
- [329] K. Sipos, H. Lange, Z. Fekete, P. Ullmann, R. Lill, and G. Kispal, "Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione.," *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 26944–26949, Jul 2002.
- [330] G. Kispal, P. Csere, B. Guiard, and R. Lill, "The abc transporter atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis.," *FEBS Lett*, vol. 418, pp. 346–350, Dec 1997.
- [331] Y. Feng, N. Zhong, N. Rouhier, T. Hase, M. Kusunoki, J.-P. Jacquot, C. Jin, and B. Xia, "Structural insight into poplar glutaredoxin c1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site.," *Biochemistry*, vol. 45, pp. 7998–8008, Jul 2006.
- [332] C. Johansson, K. L. Kavanagh, O. Gileadi, and U. Oppermann, "Reversible sequestration of active site cysteines in a 2fe-2s-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria.," *J Biol Chem*, vol. 282, pp. 3077–3082, Feb 2007.
- [333] C. H. Lillig, C. Berndt, O. Vergnolle, M. E. Lönn, C. Hudemann, E. Bill, and A. Holmgren, "Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, pp. 8168–8173, Jun 2005.
- [334] N. Rouhier, H. Unno, S. Bandyopadhyay, L. Masip, S.-K. Kim, M. Hirasawa, J. M. Gualberto, V. Lattard, M. Kusunoki, D. B. Knaff, G. Georgiou, T. Hase, M. K. Johnson, and J.-P. Jacquot, "Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2fe-2s] cluster in poplar glutaredoxin c1.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 7379–7384, May 2007.
- [335] A. Mogk, R. Schmidt, and B. Bukau, "The n-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies.," *Trends Cell Biol*, vol. 17, pp. 165–172, Apr 2007.
- [336] A. Ciechanover and R. Ben-Saadon, "N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in.," *Trends Cell Biol*, vol. 14, pp. 103–106, Mar 2004.
- [337] B. Polevoda, J. Norbeck, H. Takakura, A. Blomberg, and F. Sherman, "Identification and specificities of n-terminal acetyltransferases from saccharomyces cerevisiae.," *EMBO J*, vol. 18, pp. 6155–6168, Nov 1999.

- [338] P. Pesaresi, N. A. Gardner, S. Masiero, A. Dietzmann, L. Eichacker, R. Wickner, F. Salamini, and D. Leister, "Cytoplasmic n-terminal protein acetylation is required for efficient photosynthesis in arabidopsis.," *Plant Cell*, vol. 15, pp. 1817–1832, Aug 2003.
- [339] P. F. Huesgen, H. Schuhmann, and I. Adamska, "Deg/htra proteases as components of a network for photosystem ii quality control in chloroplasts and cyanobacteria.," *Res Microbiol*, vol. 160, pp. 726–732, Nov 2009.
- [340] W. Sakamoto, "Protein degradation machineries in plastids.," *Annu Rev Plant Biol*, vol. 57, pp. 599–621, 2006.
- [341] H. Jiang, J. Lin, Z. Z. Su, M. Herlyn, R. S. Kerbel, B. E. Weissman, D. R. Welch, and P. B. Fisher, "The melanoma differentiation-associated gene mda-6, which encodes the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, is differentially expressed during growth, differentiation and progression in human melanoma cells.," *Oncogene*, vol. 10, pp. 1855–1864, May 1995.
- [342] A. Noda, Y. Ning, S. F. Venable, O. M. Pereira-Smith, and J. R. Smith, "Cloning of senescent cell-derived inhibitors of dna synthesis using an expression screen.," *Exp Cell Res*, vol. 211, pp. 90–98, Mar 1994.
- [343] Q. M. Chen, J. Liu, and J. B. Merrett, "Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in h2o2 response of normal human fibroblasts.," *Biochem J*, vol. 347, pp. 543–551, Apr 2000.
- [344] R. V. Sionov and Y. Haupt, "The cellular response to p53: the decision between life and death.," *Oncogene*, vol. 18, pp. 6145–6157, Nov 1999.
- [345] T. Russo, N. Zambrano, F. Esposito, R. Ammendola, F. Cimino, M. Fiscella, J. Jackman, P. M. O'Connor, C. W. Anderson, and E. Appella, "A p53-independent pathway for activation of waf1/cip1 expression following oxidative stress.," *J Biol Chem*, vol. 270, pp. 29386–29391, Dec 1995.
- [346] J. Markovic, N. J. Mora, A. M. Broseta, A. Gimeno, N. de-la Concepción, J. Viña, and F. V. Pallardó, "The depletion of nuclear glutathione impairs cell proliferation in 3t3 fibroblasts.," *PLoS One*, vol. 4, no. 7, p. e6413, 2009.
- [347] S. Corroyer, B. Maitre, V. Cazals, and A. Clement, "Altered regulation of g1 cyclins in oxidant-induced growth arrest of lung alveolar epithelial cells. accumulation of inactive cyclin e-dck2 complexes.," *J Biol Chem*, vol. 271, pp. 25117–25125, Oct 1996.
- [348] C. E. Helt, R. C. Rancourt, R. J. Staversky, and M. A. O'Reilly, "p53-dependent induction of p21(cip1/waf1/sdi1) protects against oxygen-induced toxicity.," *Toxicol Sci*, vol. 63, pp. 214–222, Oct 2001.
- [349] C. E. Helt, R. J. Staversky, Y.-J. Lee, R. A. Bambara, P. C. Keng, and M. A. O'Reilly, "The cdk and pcna domains on p21cip1 both function to inhibit g1/s progression during hyperoxia.," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 286, pp. L506–L513, Mar 2004.

- [350] R. C. Rancourt, P. C. Keng, C. E. Helt, and M. A. O'Reilly, "The role of p21(cip1/waf1) in growth of epithelial cells exposed to hyperoxia.," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 280, pp. L617–L626, Apr 2001.
- [351] J. S. Shenberger and P. S. Dixon, "Oxygen induces s-phase growth arrest and increases p53 and p21(waf1/cip1) expression in human bronchial smooth-muscle cells.," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 21, pp. 395–402, Sep 1999.
- [352] P. Hainaut and J. Milner, "Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific dna binding in vitro.," *Cancer Res*, vol. 53, pp. 4469–4473, Oct 1993.
- [353] L. Jayaraman, K. G. Murthy, C. Zhu, T. Curran, S. Xanthoudakis, and C. Prives, "Identification of redox/repair protein ref-1 as a potent activator of p53.," *Genes Dev*, vol. 11, pp. 558–570, Mar 1997.
- [354] C. Gaiddon, N. C. Moorthy, and C. Prives, "Ref-1 regulates the transactivation and proapoptotic functions of p53 in vivo.," *EMBO J*, vol. 18, pp. 5609–5621, Oct 1999.
- [355] T. Nakamura, H. Nakamura, T. Hoshino, S. Ueda, H. Wada, and J. Yodoi, "Redox regulation of lung inflammation by thioredoxin.," *Antioxid Redox Signal*, vol. 7, no. 1-2, pp. 60–71, 2005.
- [356] M. Ueno, H. Masutani, R. J. Arai, A. Yamauchi, K. Hirota, T. Sakai, T. Inamoto, Y. Yamaoka, J. Yodoi, and T. Nikaido, "Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation.," *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 35809–35815, Dec 1999.
- [357] A. Moustakas and D. Kardassis, "Regulation of the human p21/waf1/cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between sp1 and smad family members.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, pp. 6733–6738, Jun 1998.
- [358] K. Pardali, A. Kurisaki, A. Morén, P. ten Dijke, D. Kardassis, and A. Moustakas, "Role of smad proteins and transcription factor sp1 in p21(waf1/cip1) regulation by transforming growth factor-beta.," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 29244–29256, Sep 2000.
- [359] Y. W. Chung, D. won Jeong, J. Y. Won, E.-J. Choi, Y. H. Choi, and I. Y. Kim, "H₂O₂-induced ap-1 activation and its effect on p21(waf1/cip1)-mediated g₂/m arrest in a p53-deficient human lung cancer cell.," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 293, pp. 1248–1253, May 2002.
- [360] J. Blenis, "Signal transduction via the map kinases: proceed at your own risk.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, pp. 5889–5892, Jul 1993.
- [361] K. Z. Guyton, Y. Liu, M. Gorospe, Q. Xu, and N. J. Holbrook, "Activation of mitogen-activated protein kinase by h₂O₂. role in cell survival following oxidant injury.," *J Biol Chem*, vol. 271, pp. 4138–4142, Feb 1996.
- [362] J. Hines, R. Ju, G. E. Dutschman, Y.-C. Cheng, and C. M. Crews, "Reversal of tnp-470-induced endothelial cell growth arrest by guanine and guanine nucleosides.," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 334, pp. 729–738, Sep 2010.

- [363] B. E. Turk, E. C. Griffith, S. Wolf, K. Biemann, Y. H. Chang, and J. O. Liu, "Selective inhibition of amino-terminal methionine processing by tnp-470 and ovalicin in endothelial cells.," *Chem Biol*, vol. 6, pp. 823–833, Nov 1999.
- [364] L. Yin, Y. Xiang, D.-Y. Zhu, N. Yan, R.-H. Huang, Y. Zhang, and D.-C. Wang, "Crystal structure of human sh3bgr1 protein: the first structure of the human sh3bgr family representing a novel class of thioredoxin fold proteins.," *Proteins*, vol. 61, pp. 213–216, Oct 2005.
- [365] L. D. Veylder, T. Beeckman, G. T. Beemster, L. Krols, F. Terras, I. Landrieu, E. van der Schueren, S. Maes, M. Naudts, and D. Inzé, "Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of arabidopsis.," *Plant Cell*, vol. 13, pp. 1653–1668, Jul 2001.
- [366] H. Lui, H. Wang, C. DeLong, L. C. Fowke, W. L. Crosby, and P. R. Fobert, "The arabidopsis cdc2a-interacting protein ick2 is structurally related to ick1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro.," *Plant J*, vol. 21, pp. 379–385, Feb 2000.
- [367] A. Schnittger, C. Weinl, D. Bouyer, U. Schöbinger, and M. Hülskamp, "Misexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor ick1/krp1 in single-celled arabidopsis trichomes reduces endoreduplication and cell size and induces cell death.," *Plant Cell*, vol. 15, pp. 303–315, Feb 2003.
- [368] H. Wang, L. C. Fowke, and W. L. Crosby, "A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene.," *Nature*, vol. 386, pp. 451–452, Apr 1997.
- [369] Y. Zhou, H. Wang, S. Gilmer, S. Whitwill, and L. C. Fowke, "Effects of co-expressing the plant cdk inhibitor ick1 and d-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in arabidopsis thaliana.," *Planta*, vol. 216, pp. 604–613, Feb 2003.
- [370] H. Wang, Q. Qi, P. Schorr, A. J. Cutler, W. L. Crosby, and L. C. Fowke, "Ick1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from arabidopsis thaliana interacts with both cdc2a and cycd3, and its expression is induced by abscisic acid.," *Plant J*, vol. 15, pp. 501–510, Aug 1998.
- [371] N. Dyson, "The regulation of e2f by prb-family proteins.," *Genes Dev*, vol. 12, pp. 2245–2262, Aug 1998.
- [372] E. Ramírez-Parra, Q. Xie, M. B. Boniotti, and C. Gutierrez, "The cloning of plant e2f, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal g(1)/s regulators.," *Nucleic Acids Res*, vol. 27, pp. 3527–3533, Sep 1999.
- [373] M. Sekine, M. Ito, K. Uemukai, Y. Maeda, H. Nakagami, and A. Shinmyo, "Isolation and characterization of the e2f-like gene in plants.," *FEBS Lett*, vol. 460, pp. 117–122, Oct 1999.
- [374] M. Dahl, I. Meskiene, L. Bögre, D. T. Ha, I. Swoboda, R. Hubmann, H. Hirt, and E. Heberle-Bors, "The d-type alfalfa cyclin gene cycms4 complements g1 cyclin-deficient yeast and is induced in the g1 phase of the cell cycle.," *Plant Cell*, vol. 7, pp. 1847–1857, Nov 1995.
- [375] R. Huntley, S. Healy, D. Freeman, P. Lavender, S. de Jager, J. Greenwood, J. Makker, E. Walker, M. Jackman, Q. Xie, A. J. Bannister, T. Kouzarides, C. Gutiérrez, J. H. Doonan, and J. A.

Murray, “The maize retinoblastoma protein homologue zmr-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with g1/s regulators and plant cyclin d (cyclin d) proteins.” *Plant Mol Biol*, vol. 37, pp. 155–169, May 1998.

[376] H. Nakagami, K. Kawamura, K. Sugisaka, M. Sekine, and A. Shinmyo, “Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin d/cyclin-dependent kinase complex is activated at the g1/s-phase transition in tobacco.” *Plant Cell*, vol. 14, pp. 1847–1857, Aug 2002.

[377] R. Soni, J. P. Carmichael, Z. H. Shah, and J. A. Murray, “A family of cyclin d homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif.” *Plant Cell*, vol. 7, pp. 85–103, Jan 1995.

[378] M. B. Boniotti and C. Gutierrez, “A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in arabidopsis, a cdka/cyclin d complex.” *Plant J*, vol. 28, pp. 341–350, Nov 2001.

[379] P. D. Vivancos, T. Wolff, J. Markovic, F. V. Pallardó, and C. H. Foyer, “A nuclear glutathione cycle within the cell cycle.” *Biochem J*, vol. 431, pp. 169–178, Sep 2010.

[380] T. Vernoux, R. C. Wilson, K. A. Seeley, J. P. Reichheld, S. Muroy, S. Brown, S. C. Maughan, C. S. Cobbett, M. V. Montagu, D. Inzé, M. J. May, and Z. R. Sung, “The root meristemless1/cadmium sensitive2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development.” *Plant Cell*, vol. 12, pp. 97–110, Jan 2000.

[381] M. Garzón, K. Eifler, A. Faust, H. Scheel, K. Hofmann, C. Koncz, A. Yephremov, and A. Bachmair, “Prt6/at5g02310 encodes an arabidopsis ubiquitin ligase of the n-end rule pathway with arginine specificity and is not the cer3 locus.” *FEBS Lett*, vol. 581, pp. 3189–3196, Jul 2007.

[382] S. Stary, X. jun Yin, T. Potuschak, P. Schlögelhofer, V. Nizhynska, and A. Bachmair, “Prt1 of arabidopsis is a ubiquitin protein ligase of the plant n-end rule pathway with specificity for aromatic amino-terminal residues.” *Plant Physiol*, vol. 133, pp. 1360–1366, Nov 2003.

[383] T. Potuschak, S. Stary, P. Schlögelhofer, F. Becker, V. Nejjinskaia, and A. Bachmair, “Prt1 of arabidopsis thaliana encodes a component of the plant n-end rule pathway.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, pp. 7904–7908, Jul 1998.

[384] M. J. Pearce, J. Mintseris, J. Ferreyra, S. P. Gygi, and K. H. Darwin, “Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of mycobacterium tuberculosis.” *Science*, vol. 322, pp. 1104–1107, Nov 2008.

[385] M. A. Humbard, H. V. Miranda, J.-M. Lim, D. J. Krause, J. R. Pritz, G. Zhou, S. Chen, L. Wells, and J. A. Maupin-Furrow, “Ubiquitin-like small archaeal modifier proteins (samps) in haloferax volcanii.” *Nature*, vol. 463, pp. 54–60, Jan 2010.

[386] S. D. Veljovic-Jovanovic, C. Pignocchi, G. Noctor, and C. H. Foyer, “Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of arabidopsis is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the

antioxidant system.," *Plant Physiol*, vol. 127, pp. 426–435, Oct 2001.

[387] J. L. Donahue, C. M. Okpodu, C. L. Cramer, E. A. Grabau, and R. G. Alscher, "Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves (relationships to resistance).," *Plant Physiol*, vol. 113, pp. 249–257, Jan 1997.

[388] C. Dutilleul, M. Garmier, G. Noctor, C. Mathieu, P. Chétrit, C. H. Foyer, and R. de Paepe, "Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation.," *Plant Cell*, vol. 15, pp. 1212–1226, May 2003.

[389] G. Queval and G. Noctor, "A plate reader method for the measurement of nad, nadp, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during arabidopsis rosette development.," *Anal Biochem*, vol. 363, pp. 58–69, Apr 2007.

[390] C. M. D. T. C. L.-T. Graham Noctor, Gaelle Bergot and J.-L. Prioul, "A comparative study of amino acid measurement in leaf extracts by gas chromatography-time of flight-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection," *Metabolomics*, vol. 3, p. 161, 2007.