



HAL
open science

Identification et caractérisation de nouveaux acteurs de deux voies de trafic intracellulaire : le recyclage et l'autophagie dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Amandine Bugnicourt

► To cite this version:

Amandine Bugnicourt. Identification et caractérisation de nouveaux acteurs de deux voies de trafic intracellulaire : le recyclage et l'autophagie dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Biologie cellulaire. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2007. Français. NNT : . tel-00276753

HAL Id: tel-00276753

<https://theses.hal.science/tel-00276753>

Submitted on 2 May 2008

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.

UFR de Biochimie
Université Paris 7 - Denis Diderot
Tour 42 - 3^e étage
2, Place Jussieu, 75251 Paris cedex 05

Laboratoire trafic des protéines dans la levure
Institut Jacques Monod
Tour 43, 5^eme étage, aile 43-44
2, Place Jussieu 75251, Paris cedex 05

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VII - DENIS DIDEROT
Ecole doctorale B2M – Biochimie et Biologie Moléculaire
Spécialité MICROBIOLOGIE

Présentée par
Amandine BUGNICOURT

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS VII

**Identification et caractérisation de nouveaux acteurs de deux
voies de trafic intracellulaire : le recyclage et l'autophagie dans
la levure *Saccharomyces cerevisiae***

Soutenue le 25 juin 2007

Devant le jury composé de :

Pr. Philippe Silar
Dr. Sylvie Friant
Dr. Franck Perez
Dr. Patrice Codogno
Dr. Rosine Haguenaer Tsapis
Dr. Jean-Marc Galan

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Directrice de thèse
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier très sincèrement les membres du Jury.

En premier lieu, je remercie Sylvie Friant et Franck Perez qui ont pris le temps de lire et d'évaluer ce manuscrit ainsi que Philippe Silar qui a accepté de présider ce jury. Mes remerciements vont également vers Patrice Codoquo.

Puis, je voudrais naturellement remercier Rosine Haugenauer-Tsapis pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour le partage de son expertise scientifique, pour m'avoir permis de partir en congrès, mais aussi pour sa gentillesse, sa confiance, ses encouragements et pour le temps consacré à mon travail malgré son emploi du temps très chargé.

Je suis très reconnaissante envers Jean-Marc Galan pour m'avoir encadrée lors de ce projet, pour la confiance et l'indépendance qu'il m'a accordées. Je le remercie aussi pour son enthousiasme et son ouverture d'esprit dans la science et les sujets qui gravitent autour.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire de Rosine, permanents et étudiants pour leurs conseils techniques et scientifiques, leur soutien et leur présence. Merci à Danièle sur qui on peut toujours compter ; merci aux « drôles de dames » : Nicole, Naima, Marine. Merci à ceux et celles qui m'ont précédée : Sébastien (bon courage avec Ups66p), Zoï, mes co-paillasses : Delphine et Joëlle (dite la ptite Jojo ou la rafteuse) ainsi qu'à celles qui vont me suivre dans cette voie : l'adorable Marta, Vanessa, Valérie sans oublier bien sûr, Marie-Odile, Christianne et Isabelle.

Je remercie particulièrement les personnes ayant réalisé des expériences en lien avec ce projet : Seau Ly et Kostiana pendant leur stage de M1 ; Fulvio et Muriel, sans qui nous n'aurions pas pu réaliser les superbes clichés de microscopie électronique mais également pour leur accueil en Hollande et leur expertise scientifique concernant l'autophagie.

Je remercie sincèrement Sophie Lèpanse pour toutes les expériences préliminaires de microscopie électronique qu'elle a réalisées.

Je dis merci à Marc Shorman, Céline Lafourcade et Matthias Peter pour m'avoir permis de réaliser un crible dans leur laboratoire à Zurich.

Merci à Anne Peyroche et Franck Perez pour leurs conseils précieux en tant que tuteurs pendant ces années de thèse.

Un grand merci à toutes les personnes qui nous permettent de travailler, je devrais ici citer de nombreuses personnes et j'ai une pensée particulière pour Katy, Rogère et Véra.

Bien-sûr, je remercie L'ARC pour m'avoir permis de terminer ce travail dans de bonnes conditions financières.

Un grand merci à toutes les personnes du 5ème étage, couloir 43-44 et de l'institut avec une pensée tendre pour les expatriées, Jenny et Brigitte et une pensée très reconnaissante pour tous les membres du laboratoire de Jean-Michel Camadro, en commençant par Jean-Michel, le génie de la biochimie mais également mes amies et compagnes de repas Sylvie, Fafa, Audrey, Fiona... Je ne manquerai pas de citer également le laboratoire de Catherine Dargemont dans son intégralité, Catherine, Batool, Carole, Aurélie, Adeline, et bien-sûr mon amie Maria. Merci également au laboratoire de Jean Cartaud, à Annie ainsi qu'à Benoit avec qui nous avons partagé nos moments de galère à essayer de savoir comment rédiger une thèse dans les règles de l'art.

Merci à Bill Costerton, Phil Stewart, Corinne Dorel et Philippe Lejeune pour m'avoir fait découvrir la recherche et encouragée dans cette voie.

*Comme je m'éloigne progressivement du cadre du laboratoire, je remercie Doc'up, son bureau, son CA, l'équipe forums et l'équipe du très court-métrage de vulgarisation scientifique pour avoir cru en moi et pour ses projets si ambitieux. -Doc'up vaincra-
Je remercie également la maison des écoles doctorales, Paule Biaudet et son équipe pour leur travail en lequel je crois profondément.*

A mes amis, Julie, Thomas, Claire, JS, Solenne, Marie, Laurent, Steph, François, Karine, Pfl, Eva, Audrey, Alex, Flo, Laure, Marcellin, Chrystelle, Delphine, Jérôme, Agnès, Cédric, Sylvain, Arnaud, Maria, Sylvie, Matthieu, Caroline, Antony, Manuel, Danielle et Gérard.

J'espère n'oublier personne.

Enfin, mes remerciements les plus aimants vont vers ceux qui n'ont pas besoin de mots pour savoir à quel point leur amour et leur soutien aura été mon plus grand atout pendant cette thèse, avant et après... A Elodie, mes parents et Vincent.

TABLE des MATIERES

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE des ILLUSTRATIONS.....	6
TABLE des ABREVIATIONS.....	8
RÉSUMÉ.....	9
SUMMARY.....	9

Introduction.....

I. Préambule : la levure comme modèle pour étudier le trafic.....	10
II. Les voies de trafic chez les eucaryotes.....	12
II.A. Familles de protéines impliquées.....	13
II.A.1. SNARES.....	14
II.A.2. RABS GTPases.....	15
II.A.3. Complexes d'attachement ou « tethering ».....	15
a. Exocyste.....	16
b. VFT/GARP.....	16
c. Vps Class C/HOPS.....	17
II.A.4. Manteaux et adaptateurs.....	17
II.A.5. Nexines.....	19
II.A.6. L'ubiquitine.....	19
a. Les enzymes d'ubiquitination et déubiquitination.....	20
b. Rôles cellulaires et types de chaînes.....	21
II.A.7. Le rôle des lipides.....	22
II.B. Sécrétion.....	24
II.B.1. Transport du RE à l'appareil de Golgi.....	24
II.B.2. Transport de l'appareil de Golgi à la PM.....	25
II.B.3. Tri des protéines vers la vacuole.....	25
a. Voie VPS.....	26
b. Voie AP3.....	28
II.C. Endocytose.....	29
II.C.1. L'internalisation.....	30
a. Rôle de l'actine.....	31
b. Rôle de la clathrine.....	32
c. Rôle des protéines à domaine EH.....	32
d. Autres protéines.....	34
e. Rôle de l'ubiquitine.....	34
f. Différents modes d'internalisation chez les eucaryotes supérieurs.....	35
II.C.2. L'entrée dans les MVBs.....	38
a. Tri des cargos et ubiquitine.....	39
b. Les complexes ESCRTS.....	40
II.C.3. La fusion avec le lysosome/vacuole.....	43

III.	Le recyclage endocytique	46
III.A.	Rôles et régulation du recyclage	46
III.A.1.	Rôle économique	46
III.A.2.	Signalisation	48
III.A.3.	Transcytose et polarisation cellulaire	49
III.A.4.	La présentation antigénique	50
III.B.	Cargos modèles, machinerie et routes chez les Eucaryotes supérieurs	51
III.B.1.	Les organites du recyclage	52
III.B.2.	Les routes de recyclage :	54
III.B.3.	La machinerie	55
III.C.	Cargos modèles, machinerie et routes chez la levure	57
III.C.1.	Routes et cargos	58
a.	Recyclage de Ste3p et Ste6p	58
b.	Recyclage de Chs1p et Chs3p	59
c.	Recyclage de Snc1p	60
III.C.2.	La machinerie	62
a.	Machinerie commune aux cargos cyclant entre endosome précoce, Golgi et membrane plasmique	63
b.	Machineries spécifiques des cargos	64
III.D.	Les signaux de tri	66
III.D.1.	Rôle de la géométrie et des lipides	66
III.D.2.	Rôle des nexines	67
III.E.	Recyclage dans les mutants ESCRTs	69
IV.	L'autophagie	71
IV.A.	Les étapes	71
IV.A.1.	Signalisation	73
IV.A.2.	Nucléation de la vésicule et PAS	73
IV.A.3.	Elongation de la membrane	74
IV.A.4.	Fermeture de la vésicule et recyclage de la machinerie	75
IV.A.5.	Fusion à la vacuole	75
IV.A.6.	Dégradation du corps d'autophagie	76
IV.B.	La machinerie	77
IV.B.1.	Le complexe Atg1p	80
IV.B.2.	Atg11p : protéine centrale de la machinerie	80
IV.B.3.	Atg8p et les systèmes de conjugaison	81
IV.B.4.	Le complexe PI3-kinase	82
IV.B.5.	Les protéines membranaires	83
IV.B.6.	Machinerie chez les eucaryotes supérieurs	84
IV.C.	Les différents types d'autophagie et cargos associés	85
IV.C.1.	Méthodes de mesure de l'Autophagie non sélective	85
IV.C.2.	Autophagie sélective : CVT	85
IV.C.3.	Pexophagie	86
IV.C.4.	Mitophagie	87
IV.C.5.	Autres formes d'autophagie	88
IV.D.	Rôle en situations physiologiques et pathologiques	89
IV.D.1.	Différentiation induite par la carence, développement, mort cellulaire, dégénérescence et longévité	89
IV.D.2.	Dégradation de pathogènes	92
IV.D.3.	Croissance cellulaire et tumorigénèse	94

Résultats et Discussions95

I.	Le recyclage chez la levure, identification d'une nouvelle route et de nouveaux acteurs :	96
I.A.	Introduction.....	96
I.B.	Matériels et méthodes.....	98
I.C.	Résultats.....	108
I.C.1.	Une nouvelle voie de recyclage :	108
I.C.2.	Identification de la machinerie impliquée dans le recyclage de Fur4p	123
a.	Crible génétique	123
b.	Approche gènes candidats :	127
c.	Recyclage depuis l'endosome précoce	136
I.D.	Discussion.....	139
II.	L'autophagie chez la levure, identification de deux nouveaux acteurs :	153
II.A.	Introduction.....	153
II.B.	Matériel et méthodes	155
II.C.	Résultats.....	162
II.C.1.	Caractérisation de la fonction de Irs4p et Tax4p dans l'autophagie	162
II.C.2.	Propriétés inattendues de Irs4p et Tax4p.....	180
II.D.	Discussion.....	183

Conclusions et perspectives193

Bibliographie.....201

Annexes.....220

ARTICLE 1.....	221
ARTICLE 2.....	234

TABLE des ILLUSTRATIONS

Figure 1: Compartiments cellulaires et différentes voies de trafic chez la levure.	13
Figure 2 : Etapes du bourgeonnement et de la fusion des vésicules.	14
Tableau 1 : Les syntaxines de levure.	15
Figure 3 : Les complexes d'attachement ou de « tethering ».	16
Figure 4 : Répartition et rôle des manteaux dans la cellule.	18
Figure 5 : L'ubiquitination.	21
Figure 6 : Localisation des Phosphoinositides dans la cellule.	23
Figure 7 : Trafic de la CPY médiée par son récepteur Vps10p.	27
Tableau 2 : classification des mutants VPS en fonction de la morphologie vacuolaire.	27
Figure 8 : La machinerie d'internalisation chez la levure.	31
Figure 9 : Protéines à domaine EH.	33
Figure 10 : Les voies d'endocytose chez les eucaryotes supérieurs.	37
Figure 11 : Etude en microscopie électronique des compartiments endosomaux tardifs.	38
Figure 12 : Les complexes ESCRTs.	42
Figure 13 : Fusion à la vacuole.	45
Figure 14 : Rôle économique du recyclage	48
Figure 15 : Transcytose dans les cellules épithéliales	50
Figure 16 : Les voies de recyclage chez les eucaryotes supérieurs.	51
Tableau 3 : caractéristiques des endosomes chez les mammifères	53
Figure 17 : les endosomes, mosaïque de domaines RAB.	53
Figure 18 : Routes et machinerie de recyclage chez la levure.	58
Tableau 4 : La machinerie de recyclage chez la levure.	62
Figure 19 : Fusion de la vésicule au TGN	64
Figure 20 : Tri basé sur la géométrie de l'endosome de tri.	67
Figure 21 : Transport retrograde des endosomes au TGN.	68
Figure 22 : Structures d'autophagie en microscopie électronique.	72
Figure 23 : Les étapes de l'autophagie et de la voie CVT chez la levure	72
Figure 24 : Le PAS	74
Figure 25 : Machinerie et étapes de la voie CVT et de la voie d'Autophagie.	78
Tableau 5 : Machinerie de l'autophagie et des processus similaires.	79
Figure 26 : Les interactions de Atg11p avec les autres Atg au PAS.	81
Figure 27 : Les systèmes de conjugaison ubiquitin-like impliqués dans l'autophagie	82
Figure 28 : Modèle pour le transport de Atg9p entre mitochondrie et PAS.	83
Figure 29 : Autophagie et différenciation induite par le stress / développement.	91
Figure 30 : Rôle de l'autophagie pendant la dégradation des bactéries	93
Tableau 6 : Souches de levures	100
Tableau 7 : Plasmides	101
Figure 31 : Fur4p, cargo modèle	103
Figure 32 : Méthode d'obtention de la collection des doubles mutants	107
Figure 33: Les mutants ESCRTs sont hypersensibles au 5-FU	110
Figure 34: La sécrétion de Fur4p n'est pas modifiée dans les mutants ESCRTs	111
Figure 35 : Fur4p est accumulée à la membrane plasmique des mutants ESCRTs	112
Figure 36 : Fonctionnalité de la voie TOR.	113
Figure 37: Fur4p est recyclée vers la membrane plasmique dans les mutants ESCRTs.	115
Figure 38: Le recyclage de Fur4p nécessite des fusions vésiculaires	116
Figure 39 : La dé-ubiquitination de Fur4p n'est pas requise pour son recyclage	117

Figure 40: Fur4p et Snc1p suivent des routes de recyclage différentes	119
Figure 41 : Multiple défauts de recyclage dans les mutants Vps de classe C.....	122
Figure 42 : Crible 5-FU	124
Figure 43 : Etude de Ydr290w et Ump1p.....	126
Figure 44 : Etude du rôle des RABs, Ypt10p et Ypt11p	128
Figure 45 : Etude du rôle des Ggas, Gga1p et Gga2p	129
Figure 46 : Etude du rôle des nexines	130
Figure 47 : Etude du rôle des protéines à domaine EH, Irs4p et Tax4p.....	131
Figure 48 : Etude du rôle de l'exocyste.....	132
Figure 49 : Etude du rôle de la machinerie de recyclage de Chs3p	134
Figure 50 : Etude du rôle de la machinerie de recyclage de Gap1p.....	135
Figure 51 : Etude du recyclage depuis l'endosome précoce et du rôle du VFT	137
Figure 52 : Etude du rôle de Sec14p et de l'exocyste dans le recyclage depuis l'endosome précoce	138
Figure 53: Modèle	144
Figure 54 : Les voies de recyclage dans le levure, modèle global et comparaison des cargos	152
Tableau 8 : Souches de levure.....	156
Tableau 9 : Plasmides	158
Figure 55 : Irs4p et Tax4p n'interviennent pas au cours de l'endocytose, de la voie <i>vps</i> et du recyclage.	166
Figure 56: Irs4p et Tax4p localisent dans des structures cytoplasmiques peu nombreuses. ..	167
Figure 57 : Nature des structures marquées par Irs4p et Tax4p.....	168
Figure 58: Irs4p est une phosphoprotéine phosphorylée en présence de Rapamycine.	169
Figure 59: Les cellules <i>irs4Δtax4Δ</i> sont hypersensibles aux conditions induisant l'autophagie.	171
Figure 60 : L'autophagie non sélective est retardée en l'absence de Irs4p et Tax4p.....	173
Figure 61: Etude de la présence de corps d'autophagie dans les vacuoles par microscopie électronique	175
Figure 62 : Irs4p et Tax4p sont nécessaires pour une pexophagie efficace mais pas pour la voie CVT.....	177
Figure 63 : Irs4p et Tax4p localisent partiellement au PAS et interagissent avec Atg11p	179
Figure 64 : Tubules formés par GFP-Irs4p et GFP-Tax4p dans les mutants d'autophagie....	181
Figure 65 : Caractéristiques des tubules formés par Irs4p et Tax4p et comparaison avec Sup35p.	182

TABLE des ABREVIATIONS

AP	<u>a</u> daptor <u>p</u> rotein	Hrs	<u>h</u> epathocyte growth factor-regulated <u>s</u> ubstrate
Apel	<u>a</u> minopeptidase <u>1</u>	LAMP-2A	lysosomal <u>a</u> ssociated <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein type <u>2A</u>
Arf	<u>A</u> DP <u>r</u> ibosylation <u>f</u> actor	LatA	<u>l</u> atrunculine <u>A</u>
Arp	<u>a</u> ctin <u>r</u> elated <u>p</u> rotein	LDL	low- <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein
ATG	<u>a</u> utophagy <u>r</u> elated <u>g</u> enes	LDLR	low- <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein <u>r</u> eceptor
CA	<u>C</u> arbon <u>a</u> ddition/ ajout de carbone	LDV	low <u>d</u> ensity <u>v</u> esicle
CCV	<u>C</u> lathrin <u>c</u> oated <u>v</u> esicles	LE	late <u>e</u> ndosome/ endosome tardif
CHO	<u>C</u> hinese <u>h</u> amster <u>o</u> vary	MDCK	<u>M</u> adin- <u>D</u> arby <u>c</u> anine <u>k</u> idney
CMA	<u>c</u> haperon <u>m</u> ediated <u>a</u> utophagy	MHC	<u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex
CME	<u>c</u> lathrin <u>m</u> ediated <u>e</u> ndocytosis	MVB	<u>m</u> ultivesicular <u>b</u> ody
COP	<u>c</u> oatmer <u>p</u> rotein	NP	<u>n</u> on <u>p</u> résenté
CPM	<u>C</u> oups <u>p</u> ar <u>m</u> inute	NS	<u>n</u> itrogen <u>s</u> tarvation
CPY	<u>c</u> arboxypeptidase <u>Y</u>	ORF	Open reading Frame
CS/ CC	<u>C</u> arbon <u>s</u> tarvation / carence carbonée	PAS	<u>p</u> reautophagosomal <u>s</u> tructure
CVT	<u>c</u> ytoplasm to <u>v</u> acuole <u>t</u> argeting	PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
DO	<u>D</u> ensité <u>o</u> ptique	PE	phosphatidyl <u>e</u> thanolamine
E1	<u>e</u> nzyme d'activation de l'ubiquitine	PGE	<u>p</u> ost- <u>G</u> olgi <u>e</u> ndosome
E2	<u>e</u> nzyme de conjugaison à l'ubiquitine	PGK	3- <u>P</u> hospho <u>G</u> lycerate <u>K</u> inase
E3	ligase d'ubiquitine	PH	<u>P</u> leckstrin <u>h</u> omology
ECL	<u>E</u> lectro <u>C</u> himio <u>L</u> uminescence	Pho8p	alkalin phosphatase
EE	<u>e</u> arly <u>e</u> ndosome/ endosome précoce	PI	phosphoinositides
EEA1	<u>e</u> arly <u>e</u> ndosome <u>a</u> ntigen <u>1</u>	PI(3)P	phosphatidyl inositol-3-phosphate
EGF	<u>e</u> pidermal growth <u>f</u> actor	PI(4,5)P2	<u>P</u> hosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
EGFR	<u>e</u> pidermal growth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor	PM	<u>p</u> lasma <u>m</u> embrane/ membrane plasmique
EH	<u>E</u> PS15 <u>h</u> omology domain	PMN	piecemeal <u>m</u> icroautophagy of the <u>n</u> ucleus
EM	<u>e</u> lectronic <u>m</u> icroscopy	PMSF	<u>p</u> henylmethylsulphonyl fluoride
ENTH	<u>e</u> psin <u>N</u> -terminal <u>h</u> omology	PX	<u>P</u> hox <u>h</u> omology
Eps15	<u>E</u> GF receptor pathway <u>s</u> ubstrat <u>15</u>	RAB	<u>R</u> A genes from Rat <u>B</u> rain
ER / RE	<u>e</u> ndoplasmic <u>r</u> eticulum/ <u>r</u> éticulum <u>e</u> ndoplasmique	RFP	<u>r</u> ed <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
ERAD	<u>E</u> R-associated <u>d</u> egradation	Rme-1	<u>r</u> eceptor-mediated <u>e</u> ndocytosis <u>1</u>
ERC	<u>e</u> arly <u>r</u> ecycling <u>c</u> ompartement	SD	Milieu minimum
ESCRT	<u>e</u> ndosomal protein <u>s</u> orting <u>c</u> omplex <u>r</u> equired for <u>t</u> ransport	SD-N	Milieu minimum carencé en azote
Fig.	<u>f</u> igure	SDS PAGE	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> olyacrylamide <u>G</u> el
5-FU	<u>5</u> - <u>F</u> luoro <u>U</u> racile	SGA	Synthetic genetic array
GAP	<u>G</u> TPase <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein	SNARE	<u>s</u> oluble <u>N</u> -ethylmaleimide-sensitive fusion protein <u>a</u> ttachment protein <u>r</u> eceptor
GARP	<u>G</u> olgi-associated <u>r</u> etrograde <u>p</u> rotein	TCA	<u>t</u> richloro <u>a</u> cetic acid
GDP	guanosine <u>d</u> i phosphate	Tf	transferrin
GEF	guanidin <u>e</u> xange <u>f</u> actor	TfR	transferrin <u>r</u> eceptor
GFP	green <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein	TGN	<u>t</u> rans- <u>G</u> olgi <u>n</u> etwork
GGA	<u>G</u> olgi-localizing, <u>g</u> -adaplin ear domain homology, <u>A</u> RF-binding proteins	TMD	trans <u>m</u> embrane <u>d</u> omain
GHR	growth <u>h</u> ormone <u>r</u> eceptor	TOR	<u>T</u> arget of <u>R</u> apamycin
GPI	glycosyl <u>p</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol	TRAPP	<u>t</u> ransport <u>p</u> rotein <u>p</u> article
GPI-AP	<u>G</u> PI- <u>a</u> nchored <u>p</u> rotein	Ts	temperature <u>s</u> ensitive
GST	Glutathion-S-Transferase	Ubl	<u>U</u> biqutin <u>l</u> ike
GTP	guanosine <u>t</u> ri phosphate	UIM	<u>u</u> biqutin <u>i</u> nteracting <u>m</u> otif
Gyp	<u>G</u> TPase for <u>Y</u> pt	UPR	<u>u</u> nfolded <u>p</u> rotein <u>r</u> esponse
HDV	<u>h</u> igh <u>d</u> ensity <u>v</u> esicle	VFT	<u>V</u> ps <u>F</u> ifty <u>T</u> hree
HECT	<u>h</u> omologue to <u>E</u> 6- <u>A</u> P <u>C</u> -terminal	VPS	<u>V</u> acuolar <u>P</u> rotein <u>S</u> orting
HOPS	<u>H</u> omotypic <u>V</u> acuole <u>F</u> usion and <u>P</u> rotein <u>S</u> orting	YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
		Ypt	<u>Y</u> east <u>p</u> rotein <u>t</u> ransport

RÉSUMÉ

Au cours de l'endocytose, les cargos de membrane plasmique (PM) sont internalisés puis dirigés vers l'endosome précoce (EE), les corps multivésiculaires (MVBs), puis le lysosome/vacuole pour dégradation. Le ciblage des protéines vers les zones invaginées des MVBs requiert l'action des complexes ESCRTs. Chez la levure comme chez les mammifères, les mutants déficients pour ces complexes présentent un compartiment endosomal anormal (CI E) et une accumulation à la PM de diverses protéines. Nous avons montré que chez *S. cerevisiae* la stabilisation de la perméase à uracile (Fur4p) à la PM dans les mutants ESCRTs résulte de son recyclage vers la PM après internalisation. Fur4p ne traverse pas les compartiments Golgiens lors de son recyclage depuis le compartiment CI E. Cette voie de recyclage est distincte de celle empruntée par la v-SNARE Snc1p. Fur4p est également capable de recycler depuis l'EE et suit alors la même voie de recyclage que Snc1p. Ceci suggère une complexité inattendue des voies de recyclage chez la levure.

Nous nous sommes aussi intéressés à Irs4p et Tax4p, 2 protéines à domaine EH, un domaine trouvé jusqu'alors dans des protéines impliquées dans l'endocytose ou le recyclage. Irs4p et Tax4p ne sont pas impliquées dans ces processus mais interviennent de façon redondante au cours de l'autophagie, un transport catabolique vésiculaire de fractions de cytoplasme ou d'organelles vers le lysosome/vacuole. Irs4p et Tax4p interagissent physiquement avec la machinerie d'autophagie et sont partiellement localisées à la structure Pré-autophagosomale, d'où émanent les vésicules d'autophagie. Ces résultats étendent donc la panoplie des fonctions des protéines à domaine EH.

SUMMARY

During endocytosis, plasma membrane (PM) cargoes are internalized and targeted to the early endosomes (EE) and the multivesicular bodies (MVBs) before reaching the lysosome/vacuole where they are degraded. Sorting of proteins to invaginated regions of the MVBs is a process conserved from yeast to mammals and dependent on the ESCRTs complexes. Deficiencies in the ESCRT machinery lead to the formation of an abnormal endosomal compartment (CI E) and to the accumulation of various cargoes at the PM. We show that in *S. cerevisiae* the stabilization of the uracil permease (Fur4p) at the PM in ESCRTs mutants is due to an enhanced recycling of the endocytosed protein. Fur4p does not pass through the Golgi apparatus on its road from the CI E compartment to the PM. We thus show a new recycling pathway, different from the one described for the v-SNARE Snc1p. Fur4p can also recycle from the EE and, in this case, follows the same road as Snc1p, suggesting a previously non-expected complexity of recycling pathways in yeast.

We also studied 2 EH domain proteins Irs4p and Tax4p, a domain typically found in proteins involved in endocytosis and recycling. Irs4p and Tax4p are not necessary for those processes but display a redundant function in autophagy, a catabolic transport of fractions of cytoplasm or organelles to the lysosome/vacuole. Irs4p and Tax4p interact physically with the autophagic machinery and are partially localized to the Pre-Autophagosomal Structure, the yeast perivacuolar site where autophagosomes are formed. These results show the involvement of a new class of proteins in autophagy and extend the known functions of the EH domain proteins to a new trafficking pathway.

Introduction

I. Préambule : la levure comme modèle pour étudier le trafic

Une cellule eucaryote est caractérisée par la présence de compartiments (noyau, RE, Golgi, endosomes, membrane plasmique...) entre lesquels les lipides et les protéines (ou cargos) transitent afin d'assurer les grandes fonctions vitales, l'intégrité cellulaire et les relations avec l'environnement. Ces flux complexes sont finement régulés et ont fait l'objet de très nombreuses études depuis plusieurs décennies.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme unicellulaire eucaryote présentant une organisation compartimentée comparable à celle des eucaryotes supérieurs. Cet organisme est un modèle précieux pour l'étude du fonctionnement d'une cellule eucaryote et notamment en ce qui concerne le trafic intracellulaire des protéines. En effet, il présente de nombreux avantages, tant par la facilité de sa manipulation que par la multiplicité des approches (génétique, génomique, biochimique, cellulaire) qu'il permet. La levure a permis des avancées majeures dans la compréhension de l'exocytose avec la découverte des mutants *SEC*. Plus récemment, elle a également permis de mieux comprendre l'endocytose puisqu'y ont été démontrés le rôle prépondérant du cytosquelette d'actine dans les étapes précoces de l'endocytose ou encore l'implication de l'ubiquitine dans l'internalisation des protéines et leur ciblage dans les zones d'invagination des endosomes tardifs. Les acteurs et les mécanismes moléculaires du trafic mis en évidence chez la levure se sont révélés conservés dans tout le règne eucaryote.

Au cours de ma thèse, j'ai identifié et caractérisé de nouveaux acteurs de deux voies de trafic intracellulaire : le recyclage entre endosomes et membrane plasmique et l'autophagie, en utilisant la levure comme modèle. Si des travaux utilisant la levure ont permis des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes d'endocytose en revanche les voies de recyclage (i.e. retour à la membrane plasmique après endocytose) sont très mal connues dans cet organisme. Le pari que comme pour l'endocytose, la levure *S.cerevisiae* pouvait nous aider à comprendre la mécanique des voies de recyclage est à l'origine de mon projet de thèse. Le début de mon travail porte sur l'étude des voies de recyclage des protéines endocytées. Au cours de ma recherche de nouveaux acteurs du recyclage, j'ai identifié deux nouvelles protéines impliquées dans l'autophagie et commencé à caractériser leur fonction.

II. Les voies de trafic chez les eucaryotes

Le trafic le long des voies d'exocytose et d'endocytose est pour la cellule un processus essentiel qui lui permet de communiquer avec son environnement. Les cargos ou protéines en transit voyagent entre des organelles ayant des fonctions et morphologies différentes. Les compartiments cellulaires chez la levure et les différentes voies de trafic entre ceux-ci sont représentés sur la figure 1. Ainsi, les protéines néosynthétisées sont transloquées dans le réticulum endoplasmique (RE) puis transitent à travers les citernes de l'appareil de Golgi et le Trans-Golgi (TGN) avant de rejoindre la membrane plasmique (voie d'exocytose) ou la vacuole (voie VPS ou AP3). Les protéines de membrane plasmique peuvent être internalisées et voyager vers les endosomes précoces (EE) puis tardifs (MVBs) avant d'être dégradées dans le compartiment lytique : lysosome (eucaryotes supérieurs) ou vacuole (levure). Les cargos internalisés peuvent aussi être recyclés vers la membrane plasmique à partir des endosomes précoces ou tardifs, après passage éventuel par l'appareil de Golgi et parfois par l'endosome de recyclage (uniquement pour les eucaryotes supérieurs, non représenté sur la figure 1). Enfin, dans certaines conditions, la voie d'autophagie permet la dégradation de fractions de cytoplasme ou d'organelles après formation *de novo* d'un autophagosome qui fusionne avec la vacuole.

Avant de décrire davantage les événements liés au trafic, il est nécessaire de préciser que deux modèles conceptuellement différents s'opposent : le transport vésiculaire entre organelles stables et la maturation des organelles. Chez la levure, la plupart des descriptions sont basées sur un modèle de trafic vésiculaire entre organites établis, sauf pour l'appareil de Golgi. Chez les eucaryotes supérieurs, il est bien établi que certains organelles sont maturés progressivement le long des voies de trafic. On sait par exemple que l'endosome précoce est maturé en endosome tardif en quelques minutes (Stoorvogel et al. 1991; Dunn and Maxfield 1992). Les citernes de l'appareil de Golgi semblent également maturées du *cis* au *trans*-Golgi chez la levure et les eucaryotes supérieurs (Pelham 2001; Losev et al. 2006; Matsuura-Tokita et al. 2006).

Ainsi, les protéines néo-synthétisées peuvent être dirigées vers la membrane plasmique ou le lysosome. De même, les protéines de membrane plasmique peuvent être endocytées et ciblées pour dégradation dans le lysosome ou peuvent être recyclées vers la surface cellulaire. Cette multiplicité de destins pour une protéine implique une régulation fine et un tri à chaque étape. Au cours de ce manuscrit nous nous focaliserons sur l'exemple des transporteurs de membrane plasmique, plus de 125 présents chez *S. cerevisiae*. Leurs propriétés permettent une adaptation rapide de la cellule aux variations des conditions du milieu grâce aux voies d'exocytose, d'endocytose et de recyclage. Des données obtenues chez les eucaryotes supérieurs seront également exposées et les différences seront discutées.

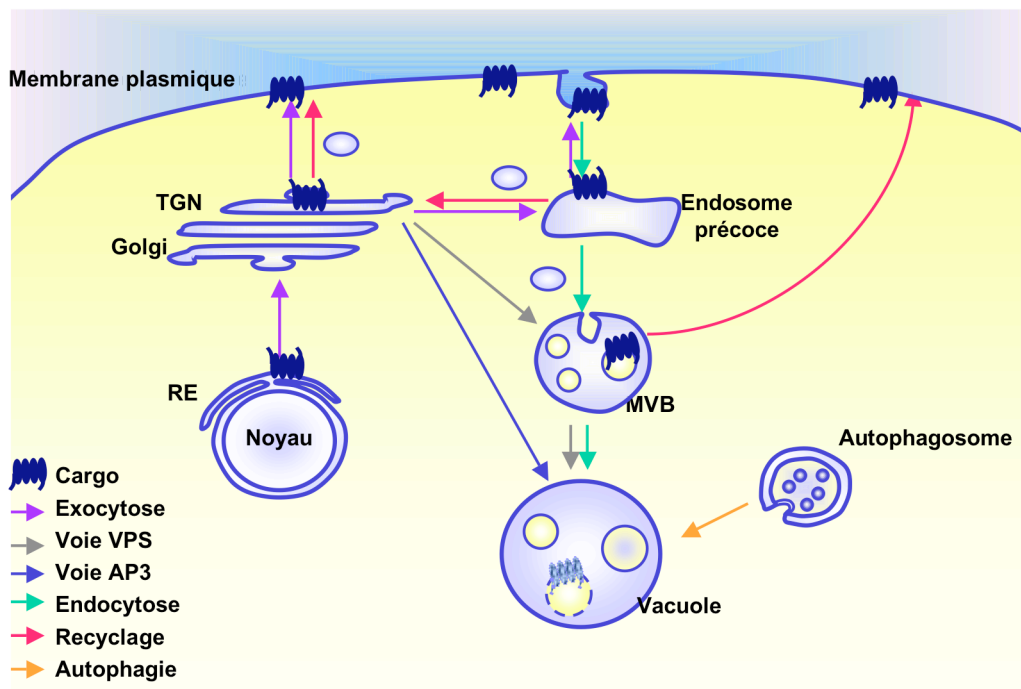


Figure 1: Compartiments cellulaires et différentes voies de trafic chez la levure.

Chaque voie décrite dans le texte est représentée par une couleur différente.

RE : réticulum endoplasmique, MVB : corps multivésiculaire.

Dans une première partie, nous présenterons les différentes classes de protéines impliquées dans le trafic vésiculaire. Puis, nous détaillerons les voies de trafic. Les voies de recyclage et d'autophagie feront l'objet d'une partie indépendante, respectivement III et IV de l'introduction.

II.A. Familles de protéines impliquées

Voilà près de 40 ans, des études en microscopie électronique ont permis de suggérer que le trafic entre organelles était de nature vésiculaire. Ainsi, des vésicules de 60-100nm entourées d'une enveloppe dense aux électrons ont été observées en cours de bourgeonnement ou à proximité de la membrane plasmique et du TGN (*trans*-Golgi network) par Kanaseki et al (Kanaseki and Kadota 1969).

Depuis, la communication entre organelles a été largement étudiée. Elle fait intervenir le bourgeonnement d'une vésicule du compartiment donneur puis son ciblage et sa fusion avec le compartiment accepteur ((Bonifacino and Glick 2004), figure 2). Plusieurs familles de protéines semblent impliquées systématiquement à toutes les étapes de fusion, quelle que soit la nature des membranes donneuses et acceptrices, à l'exception peut-être de la voie d'autophagie (voir chapitre IV). Par exemple, les SNAREs (soluble N-ethylmaleimide sensitive facteur attachment protein reccepteur) et les RABs (Rat Brain) sont des familles de protéines conservées dans tout le règne eucaryote. Pour chaque étape de trafic, la spécificité de la fusion des vésicules avec leur organelle cible serait assurée par une combinaison unique de protéines SNAREs et RABs souvent associées à un complexe de tethering et des protéines accessoires.

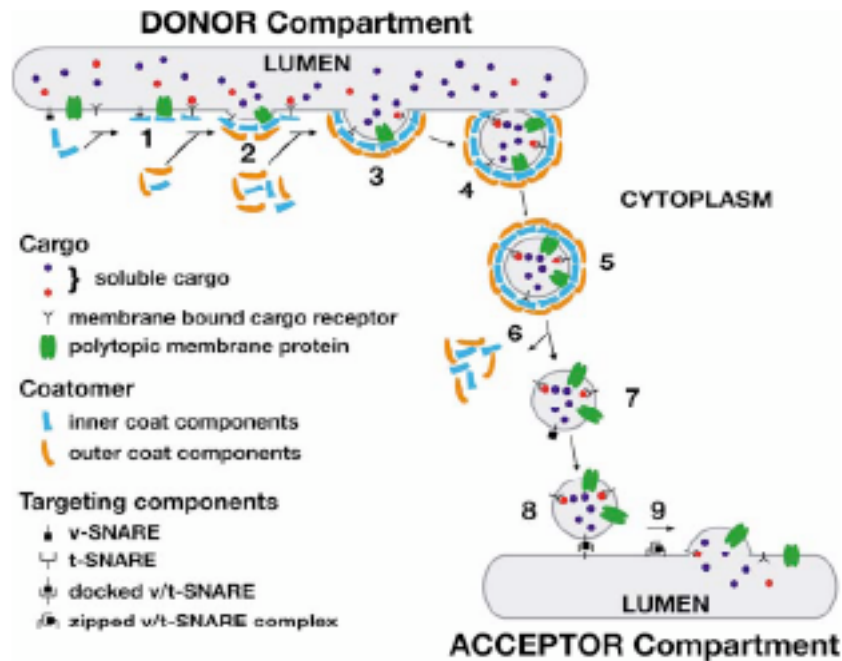


Figure 2 : Etapes du bourgeonnement et de la fusion des vésicules.

Les cargos (membranaires en vert ; « Y » récepteurs symbolisés ; solubles en rouge) du compartiment donneur destinés à un compartiment accepteur interagissent avec les protéines de manteau (bleu) aboutissant à la formation des complexes de pré-bourgeonnement (étape 1). La v-SNARE et le complexe de pré-bourgeonnement permettent la nucléation de la vésicule (étape 2). L'assemblage des protéines externes de manteau (jaune) pourrait fournir la force pour déformer la membrane (étape 3). Une vésicule est formée (étape 4) puis libérée (étape 5). Le manteau est recyclé (étape 6). Les v-SNAREs interagissent avec les t-SNAREs du compartiment accepteur (étape 7) pour permettre la fusion puis sont recyclées. Les complexes d'attachement ne sont pas représentés sur ce schéma mais aident les SNAREs (étape 8). Les cargos membranaires et les récepteurs vont se retrouver à la membrane du compartiment accepteur et les protéines solubles sont déchargées dans le compartiment accepteur (étape 9). Adapté de (Nyman et al. 2004).

II.A.1. SNARES

La fusion membranaire à chaque étape du trafic se fait grâce à l'action de protéines intégrales de membrane dites SNAREs (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor). Un complexe de SNAREs est présent sur la vésicule (v-SNAREs) et l'organite accepteur (t-SNAREs) afin de permettre leur rapprochement, leur arrimage et finalement leur fusion. Une nouvelle nomenclature désigne la SNARE présente sur la membrane donneuse comme R-SNARE et les trois SNAREs de la membrane cible comme Q-SNAREs.

De nombreuses t-SNAREs font partie de la famille conservée des syntaxines qui interviennent à chaque étape de fusion. Cette famille compte 8 représentants dans la levure, identifiés sur la base

d'homologie de séquence (Weimbs et al. 1997; Holthuis et al. 1998b) (tableau 1). Les syntaxines interagissent notamment avec Sec18p (ATPase) et Sec17p, deux protéines solubles de la famille NSF / SNAP à différents niveaux cellulaires.

syntaxines	organelle
Ufe1p	ER
Vam3p	vacuole
Pep12p	Endosomes
Sso1p	Membrane plasmique
Sso2p	Membrane plasmique
Sed5p	Golgi
Tlg1p	TGN/endosomes
Tlg2p	TGN/endosomes

Tableau 1 : Les syntaxines de levure.

Adapté de (Holthuis et al. 1998b).

II.A.2. RABS GTPases

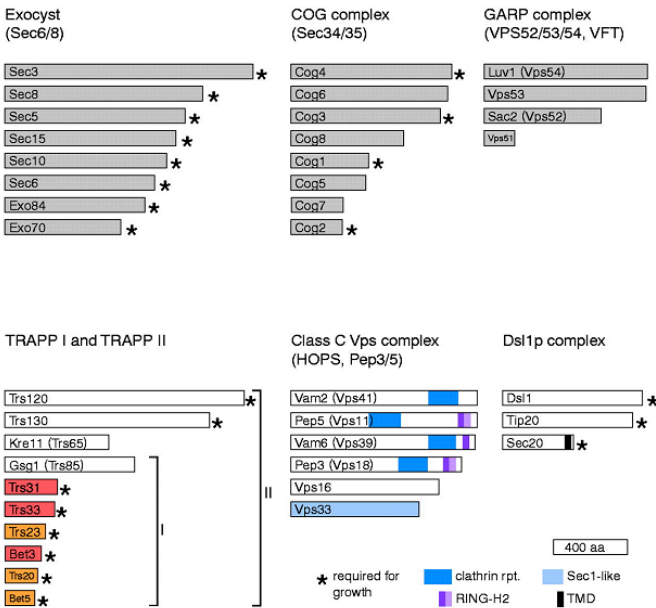
Les RABS chez les mammifères, ou Ypts chez la levure, sont des GTPases de la famille Ras qui cyclent en permanence entre une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. A ce titre, elles sont des interrupteurs moléculaires régulés par des GEFs (GTPase Exchange Factors) et des GAPs (GTPase Activating Proteins). La levure compte 11 Ypts, réparties entre les organites de manière spécifique. Elles agissent de concert avec les SNAREs.

II.A.3. Complexes d'attachement ou « tethering »

Des études plus récentes ont permis de montrer l'existence d'une 3ème classe de protéines impliquées dans la spécificité de fusion : les complexes de tethering (Whyte and Munro 2002). Ces gros complexes multiprotéiques ont une structure quaternaire commune et agissent en amont des SNAREs et des RABS afin d'initier l'arrimage / l'attachement de la vésicule et de la membrane cible. La plupart sont conservés à l'intérieur du règne eucaryote.

Au nombre de sept, ils peuvent être divisés en deux groupes (figure 3A) et agissent spécifiquement à une étape du trafic (figure 3B). Les complexes TRAPP I et II (transport protein particle) permettent la fusion des vésicules issues du réticulum à l'appareil de Golgi (Sacher et al. 1998). Le complexe Dsl1 semble impliqué dans l'attachement des vésicules de recyclage issues de l'appareil de Golgi vers le RE. Il a été proposé que le complexe COG permettrait le recyclage des vésicules entre citernes de l'appareil de Golgi mais également à partir de compartiments endosomaux. Ces 3 complexes ne seront pas davantage détaillés dans ce manuscrit.

A.



B.

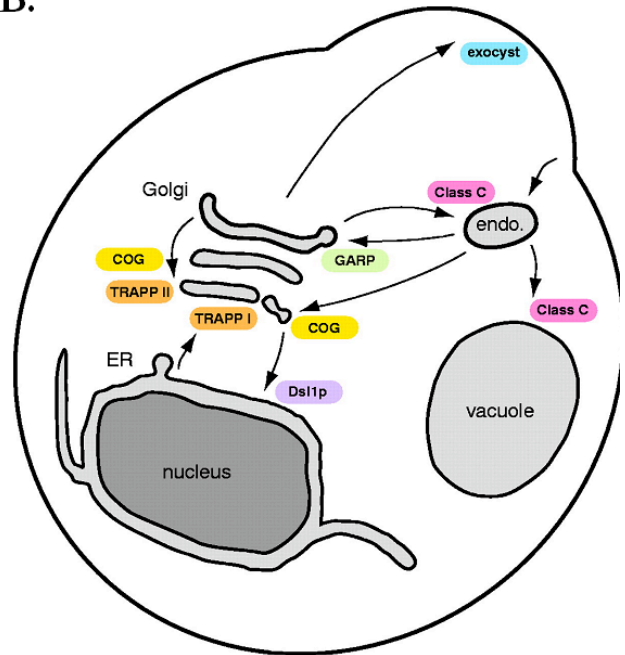


Figure 3 : Les complexes d'attachement ou de « tethering ».

A. protéines constituant les complexes d'attachement ou de « tethering ».

B. Localisation cellulaire des complexes d'attachement ou de « tethering ».

Adapté de (Whyte and Munro 2002).

a. Exocyste

L'exocyste est sans doute le complexe d'attachement le mieux caractérisé. La mutation des gènes codant ses huit sous-unités (Sec3, 5, 6, 8, 10, 15p, Exo70, 84p) conduit à l'accumulation de vésicules destinées à la membrane plasmique (TerBush et al. 1996). Le complexe se localise aux sites de l'exocytose polarisée chez la levure et permet la fusion des vésicules à la membrane plasmique. Il sera détaillé dans la section relative à l'exocytose.

b. VFT/GARP

Le complexe GARP (Golgi-associated retrograde protein) ou VFT (Vps Fifty Three) est composé de 4 protéines (Vps51p, Vps52p, Vps53p et Vps54p) (Conibear et al. 2003). Il permet la fusion des vésicules issues des compartiments endosomaux avec le TGN. A ce titre, il intervient dans le recyclage de différents cargos (voir chapitre III C).

c. *Vps Class C/HOPS*

Les composants du complexe Vps de classe C ou HOPS ont été identifiés par les cribles d'identification de mutants *vps* basés sur la morphologie vacuolaire (vacuoles très fragmentées) et la sécrétion de CPY (voir partie II B.3.a). Il est composé de 6 protéines (Vps41p, Vam6p, Vps11p, Vps16p, Vps18p, et Vps33p). Ce complexe intervient dans la fusion homotypique des vacuoles, la fusion des MVBs et autophagosomes à la vacuole, mais également dans le trafic vers le MVB. En effet, la double délétion de deux SNAREs intervenant spécifiquement aux étapes de trafic entre Golgi/endosome précoce et tardif (*PEP12*) et entre endosome tardif et vacuole (*VAM3*) a des phénotypes similaires à la perte de fonction d'un composant du HOPS (Vps33p), ceci a permis de montrer le double rôle de ce complexe dans le trafic (Subramanian et al. 2004). Au niveau endosomal, le HOPS interagit avec plusieurs Vps comme Vps8p, Vps9p, Vps21p, Pep12p (Horazdovsky et al. 1996; Bowers and Stevens 2005). Le rôle du complexe HOPS pour la fusion à la vacuole fera l'objet d'une description détaillée au chapitre III C.3. ainsi que dans la publication 1.

II.A.4. Manteaux et adaptateurs

Kanaseki fut le 1^{er} en 1969 à décrire ce qu'il appelait « la vésicule dans un panier » par microscopie électronique (Kanaseki and Kadota 1969). Ce panier/enveloppe/manteau n'est autre que la clathrine, purifiée et caractérisée biochimiquement par Pearse en 1975 (Pearse 1975). La clathrine est composée de trois chaînes légères et trois chaînes lourdes (triskèle) qui s'auto-assemblent pour former une cage sphérique à ouvertures hexagonales autour de la vésicule (figure 10 C) (Kirchhausen and Harrison 1981).

La clathrine intervient à différentes étapes de trafic, au niveau de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique sous forme d'un manteau courbé et au niveau des endosomes tardifs sous forme de manteau plat (pour revue, voir (Kirchhausen 2000)).

Plus récemment, d'autres types de manteaux ont été identifiés et sont requis pour la formation des vésicules aux différentes étapes de trafic et la sélection des protéines qui vont y être transportées. La figure 4 montre les différentes protéines de manteau qui s'assemblent aux vésicules naissantes (Bonifacino and Lippincott-Schwartz 2003).

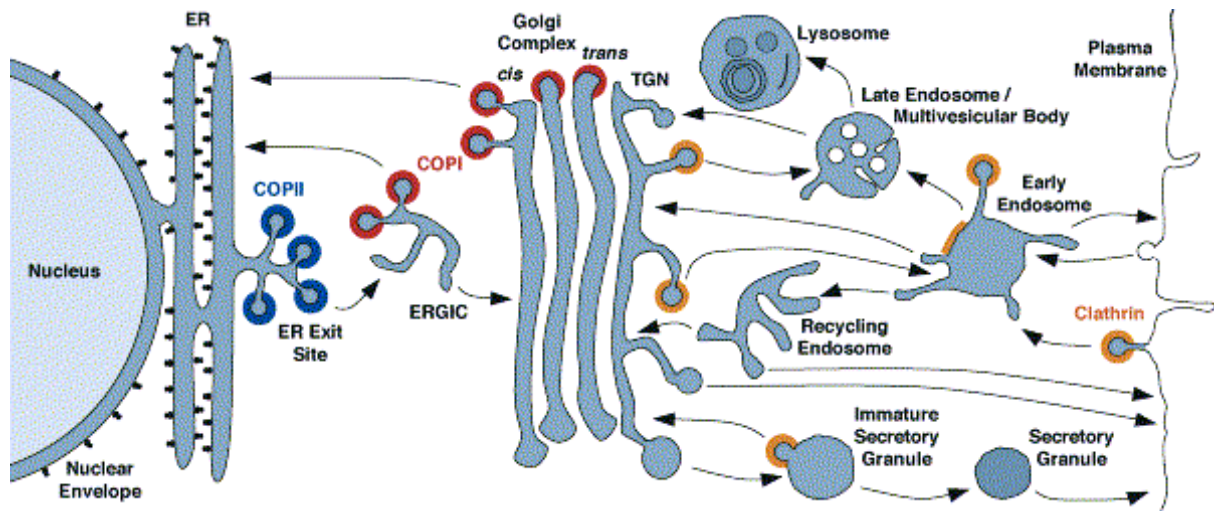


Figure 4 : Répartition et rôle des manteaux dans la cellule.

Adapté de (Bonifacino and Glick 2004).

Les manteaux COP (coat protein complex) interviennent dans le transport rétrograde (COPI) et antérograde (COPII) entre RE et Golgi chez la levure et seront rediscutés au chapitre II B.1.. Dans les cellules de mammifère, il existe environ 10 manteaux COPs intervenant chacun dans une étape particulière de transport.

Jusqu'à cette année, on pensait qu'aucun manteau n'intervenait au cours de la dernière étape vers la membrane plasmique. Ceci a été remis en question par une étude dans la levure montrant que le transport de la chitine synthase, Chs3p, du TGN à la membrane plasmique fait intervenir un nouveau type de manteau nommé exomère et formé de Chs5p, Chs6p, Bch1p, Bud7p et Bch2p. Ces protéines forment un très large complexe qui s'associe à Chs3p et aux membranes du TGN grâce à l'interaction de Chs5p avec Sec7p (nucleotide exchange facteur de Arf1p). Des études *in vitro* indiquent qu'il s'agirait d'un nouveau type de manteau (Wang et al. 2006). Il est probable que d'autres manteaux soient découverts avec une spécificité différente en terme de cargos à cette même étape. De plus, il est à noter que les protéines Chs n'existent pas hors du règne des levures et champignons.

Outre les protéines de manteau, l'enveloppe des vésicules contient des protéines adaptatrices (AP) formées de deux petites sous-unités ($\mu 2$ et $\sigma 2$) et de deux grandes sous-unités ($\alpha 2$ et $\beta 2$) (figure 10). Celles-ci permettent à la fois le recrutement de la clathrine et la sélection des protéines à segment transmembranaire à incorporer dans les vésicules en reconnaissant des signaux spécifiques dans les domaines cytoplasmiques (Bonifacino and Glick 2004). Elles sont également responsables de la liaison aux facteurs accessoires qui régulent l'assemblage et le désassemblage du manteau, la formation ou le ciblage de ces vésicules, ainsi que l'interaction avec le cytosquelette qui permet leur mobilité.

AP-1, AP-2 et AP-3 ont été trouvés dans les vésicules enveloppées émanant de la membrane plasmique et du TGN (Kirchhausen 2000). Hrs qui interagit aussi avec la clathrine au niveau de

l'endosome tardif fait également partie de cette classe de protéines. Une autre classe d'adaptateurs, les GGAs (Golgi localized, γ-ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding protein) se distingue par son statut monomérique. Les GGAs présentent un domaine GAE (γ adaptin ear) d'homologie au domaine « ear » de la sous-unité γ de l'adaptateur AP-1 qui lie la clathrine, un domaine VHS (Vps27, Hrs, STAM) qui lie les séquences de type DxxLL et un domaine GAT de liaison à la GTPase Arf et à l'ubiquitine. Elles reconnaissent les protéines ubiquitinées qui doivent être transportées au niveau du TGN (Shiba et al. 2004) (voir II B.3.a.).

II.A.5. Nexines

Comme mentionné en introduction de ce chapitre, les cargos peuvent avoir différents destins et leur tri correct est primordial pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Les nexines de tri ou «sorting nexins» (SNX) contiennent un domaine PHOX (PX) de liaison au phosphatidyinositol 3-phosphate (PI(3)P, lipide endosomal) et participent au tri des cargos avec lesquels elles interagissent (Haft et al. 1998; Teasdale et al. 2001; van Dam and Stoorvogel 2002; Worby and Dixon 2002). Cette famille est conservée de la levure (11 nexines, dont plusieurs de fonction inconnue) à l'homme (17 nexines) (Pelham 2002) (Bonifacino and Rojas 2006). La 1^{ère} nexine identifiée, SNX1, interagit avec le récepteur à l'EGF. La plupart des nexines interagissent également avec d'autres composants de la machinerie de trafic.

Vps5p et Vps17p, les deux nexines du rétromère, localisées au niveau de l'endosome tardif, permettent aux protéines résidentes de l'appareil de Golgi, comme le récepteur Vps10p, d'y être reconduite. Le recyclage de ce récepteur lui permet de prendre en charge son ligand, la CPY, plusieurs fois de suite (pour plus de détails, voir le chapitre voie VPS). Deux autres nexines, Grd19p et Mvp1p, sont localisées aux endosomes tardifs et permettent le retour de Kex2p vers l'appareil de Golgi, mais pas celui de Vps10p, ce qui montre la spécificité des nexines en terme de cargo. De plus, les nexines Snx4p, Snx41p et Snx42p permettent à Snx1p de recycler entre endosome précoce et Golgi (Hettema et al. 2003) (voir chapitre III C.3.).

II.A.6. L'ubiquitine

L'ubiquitine est un polypeptide de 76 acides aminés conservé chez les eucaryotes. Sa fixation covalente sur un substrat est surtout connue comme signal de dégradation médiée par le protéasome (revue (Roos-Mattjus and Sistonen 2004)). L'ubiquitine joue aussi un rôle prépondérant à deux niveaux de la voie d'endocytose, comme expliqué aux chapitres II C.1.e. et II C.2.a.

a. *Les enzymes d'ubiquitination et déubiquitination*

La fixation de l'ubiquitine par une liaison thioester à une lysine de la protéine substrat fait intervenir une cascade de trois réactions enzymatiques (Hershko et al. 1983) (figure 5). Dans une première étape ATP-dépendante, une liaison thioester est formée entre l'extrémité carboxy-terminale de l'ubiquitine et un résidu cystéine de l'enzyme d'activation (E1). Chez la levure, Uba1p est la seule E1. Ensuite l'ubiquitine est transférée sur la cystéine du site actif de l'enzyme de conjugaison E2. Il en existe 11 chez la levure, elles sont nommées Ubc pour ubiquitin conjugating enzymes (Ubc1-8, 10, 11, 13), elles se lient à l'ubiquitine *via* un résidu cystéine et aux enzymes E3 ou ligase d'ubiquitine. Généralement, les E2 sont capables d'interagir avec plusieurs E3 et sont ainsi impliquées dans la modification d'un grand nombre de substrats. La spécificité de la réaction semble assurée par les E3, qui reconnaissent spécifiquement la protéine cible (54 chez *S.cerevisiae* et près de 1000 chez l'homme). L'E3 va permettre le transfert de l'ubiquitine sur le groupe amine d'une lysine du substrat, formant ainsi une liaison covalente. Il existe majoritairement deux types d'E3. Dans le cas des E3 à RING finger, l'E3 rapproche l'enzyme E2 et le substrat facilitant ainsi le transfert direct de l'ubiquitine de l'E2 sur la protéine cible. Dans le cas des E3 à domaine HECT (homologue to E6AP C-terminus), l'ubiquitine activée est transférée de l'E2 à l'E3 qui joue un rôle catalytique afin de fixer l'ubiquitine sur le substrat. Par réactions successives, des chaînes de polyubiquitines peuvent être formées.

L'une des ubiquitine ligases à domaine HECT les plus étudiées chez la levure est Rsp5p qui appartient à la famille Nedd4. Sa fonction est essentielle à la vie cellulaire. De plus, Rsp5p intervient dans l'ubiquitination des protéines de membrane plasmique, comme la perméase générale aux acides aminés Gap1p et l'uracile perméase, Fur4p ; l'ubiquitine joue le rôle de signal d'internalisation entraînant ainsi leur endocytose (Galan et al. 1996; Galan and Haguenauer-Tsapis 1997a; Springael et al. 1999; Haguenauer-Tsapis and André 2004) (voir chapitre II C.1.e.).

L'ubiquitination est un processus réversible et les enzymes responsables de la déubiquitination sont appelées enzymes de déubiquitination (DUB). La déubiquitination permet de recycler l'ubiquitine attachée aux protéines qui vont être dégradées par le protéasome ainsi que par la vacuole/lysosome afin de maintenir le niveau d'ubiquitine constant. La protéine Doa4p/Ubp4p est la DUB responsable de la déubiquitination des protéines au niveau des endosomes tardifs (Dupré and Haguenauer-Tsapis 2001) (voir chapitre II C.2.b.).

En plus des enzymes de modification par l'ubiquitine, de nombreuses protéines sont capables d'interagir avec cette protéine globulaire. Le rôle de ces protéines seraient de réguler l'ubiquitination ou de prendre en charge les cargos ubiquitinés. Par exemple, à la membrane plasmique, les protéines Ent1/2p et Ede1p lient la machinerie d'internalisation et l'ubiquitine fixée sur le cargo, elles pourraient donc permettre d'insérer les cargos marqués pour l'internalisation dans les vésicules en formation (Pelham 2002; Dupré et al. 2004) (voir chapitre II C.1.e.). Huit domaines de reconnaissance et de liaison à l'ubiquitine ont été décrits chez les protéines de levure : les domaines UBA, UIM, GAT, CUE, UEV, PAZ, VHS et NZF (Hicke et al. 2005).

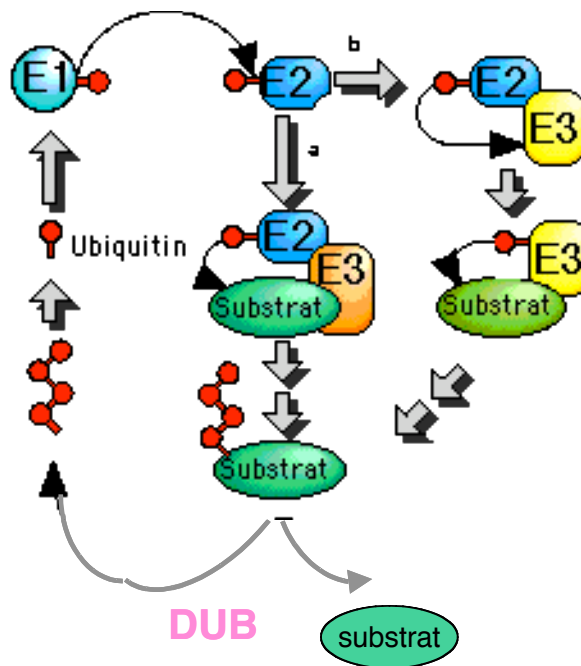


Figure 5 : L'ubiquitination.

Dans une première étape ATP-dépendante, une liaison thioester est formée entre l'extrémité carboxy-terminale de l'ubiquitine et un résidu cystéine de l'enzyme d'activation (E1). L'ubiquitine activée est ensuite transférée sur une cystéine d'une des nombreuses enzymes de conjugaison (E2). La dernière étape consiste en la fixation covalente de l'ubiquitine sur un résidu lysine de la protéine substrat. Cette réaction est catalysée par l'enzyme E2, avec l'aide d'une ubiquitine ligase (E3 RING, en orange) qui permet la reconnaissance spécifique de la cible à ubiquitiner. Dans certains cas, l'ubiquitine est transférée de l'enzyme E2 sur l'enzyme E3 (E3 HECT, en jaune), qui ubiquitine alors la protéine substrat. Le processus est réversible grâce à l'action d'une enzyme de déubiquitination (DUB) et l'ubiquitine est alors recyclée pour d'autres cycles d'ubiquitination. D'après W. Hilt.

b. Rôles cellulaires et types de chaînes

Il existe plusieurs types de modifications par l'ubiquitine : soit la fixation d'une seule ubiquitine (monoubiquitination), soit par des chaînes de plusieurs ubiquitines (polyubiquitination) soit par la fixation d'une seule ubiquitine mais simultanément sur plusieurs lysines du substrat (multimonoubiquitination).

De plus, la polyubiquitination peut également être divisée en plusieurs sous classes. En effet, les ubiquitines peuvent être liées entre elles *via* différentes lysines, majoritairement les lysines K29, K63 et K48 (Peng et al. 2003). Dans de nombreux cas, les E2s semblent avoir un rôle décisif dans le choix du type de chaînes ; par exemple Ubc13p/Mms2p semblent médier la modification des substrats par des chaînes K63.

La monoubiquitination intervient dans de nombreux processus cellulaires comme la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, la réplication, la régulation de l'activité des protéines,

l'internalisation de transporteurs et de récepteurs de membrane plasmique, l'entrée dans les corps multivésiculaires (MVBs) (Polo et al. 2002).

Les chaînes de type K48 longues (au moins 4 ubiquitines) sont un signal de ciblage vers le protéasome 26S (Ciechanover et al. 1978). Le protéasome est un complexe multiprotéasique cytoplasmique et nucléaire de dégradation des protéines à courte durée de vie. Il est composé d'une chambre cylindrique et d'unités régulatrices. Certains liens ont été mis en évidence entre protéasome et dégradation endocytaire (Strous and Govers 1999) (Kleijnen et al. 2007), il en sera question au paragraphe I.C.2. des résultats.

La fonction cellulaire des chaînes de type K29 est moins caractérisée. Un premier exemple de rôle des chaînes de type K29 dans l'endocytose vient d'être démontré (Chastagner et al. 2006).

La 1^{ère} fonction mise en évidence pour les chaînes K63 est la réparation de l'ADN (Spence et al. 1995). Puis, de courtes chaînes d'ubiquitine liées entre elles par la lysine K63 ont été étudiées pour leur rôle dans l'étape d'internalisation de l'endocytose de deux transporteurs de membrane plasmique chez la levure, l'uracile perméase, Fur4p et la perméase générale aux acides aminés Gap1p (Galan and Haguenaer-Tsapis 1997a; Springael et al. 1999) (voir chapitre II.C.1.e.). Plus récemment, il a été montré que ce type de chaîne constitue également un signal d'internalisation pour les récepteurs et transporteurs ou d'activation de protéines kinases dans des voies de signalisation dans les cellules de mammifères.

II.A.7. Le rôle des lipides

Il s'agit là d'un très vaste sujet, ainsi différentes classes de lipides : phosphoinositides, sphingolipides, stérols, rafts ont un rôle dans le trafic (D'Hondt et al. 2000). Nous discuterons ici uniquement le rôle des PI (phosphoinositides). Les phosphatidylinositols sont des phospholipides membranaires qui peuvent être phosphorylés pour produire des messagers secondaires lipidiques distincts appelés phosphoinositides. La répartition des PI dans la cellule n'est pas uniforme et l'identité des compartiments ainsi que le tri efficace des protéines semblent maintenus par la présence de PI spécifiques. La localisation des différents types de PI dans la cellule dépend de l'activité de kinases et de phosphatases (Figure 4) (De Matteis et al. 2002).

Le PI4-phosphate est requis pour la fonction de l'appareil de Golgi. A la membrane plasmique, le PI4P et le PI(4,5)P₂ sont les PI majoritaires. La voie d'endocytose (endosomes et vacuole) est marquée par les PI3-phosphates : PI3P et PI(3,5)P₂ (D'Hondt et al. 2000; De Matteis et al. 2002; Pelham 2002).

Dans la levure, il y a trois PI 5'-phosphatases de la famille conservée des synaptojanines : Inp51p, Inp52, Inp53p. Ces phosphatases sont requises pour le trafic et la dynamique du cytosquelette à différents niveaux cellulaires (figure 6).

De plus, il a été montré que de nombreux interactants des PI sont impliqués dans le transport vésiculaire. Parmi ces protéines, on peut citer celles ayant un domaine PX (Phox homology) de liaison au PI3-phosphate endosomal. Il existe également des protéines liant les PI au niveau de la membrane plasmique (Simonsen et al. 2001). Ces interactions protéine-lipide semblent être à l'origine de la courbure des puits recouverts de clathrine. Par exemple, l'epsine, qui lie Eps15 et AP-2, possède un domaine ENTH (epsin N-terminal homology) d'interaction avec le PI(4,5)P₂. Ce domaine semble capable de s'insérer dans les membranes et de générer des courbures et des tubules (Ford et al. 2002). Au niveau endosomal, la PI-3-kinase Vps34p régule le transport entre l'appareil de Golgi et la vacuole et intervient aussi dans la formation de l'autophagosome (voir IV D.5.) (Simonsen et al. 2001). Sur l'endosome tardif, le PI3-phosphate est transformé en PI3,5-bisphosphate sous l'action de la kinase Fab1p qui se lie au PI3P *via* son domaine FYVE. Dans des souches déficientes pour Fab1p, l'entrée de certains cargos au niveau du MVB est bloquée et la vacuole est anormalement élargie (Odorizzi et al. 1998).

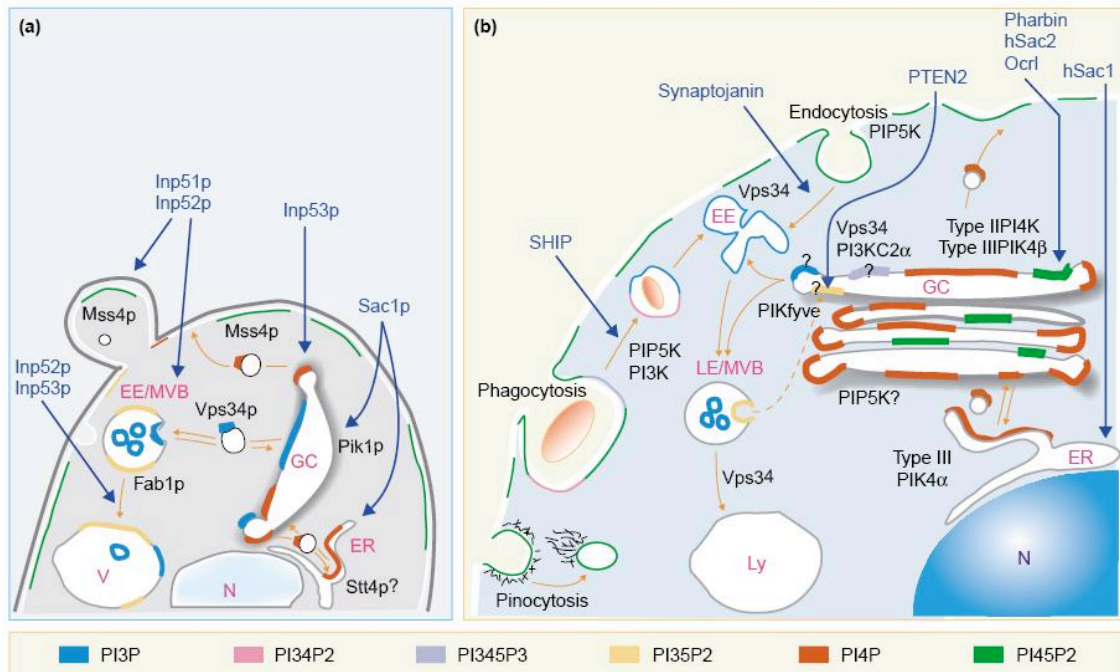


Figure 6 : Localisation des Phosphoinositides dans la cellule.

(a) chez la levure

(b) dans les cellules de mammifères

les PI et les kinases et phosphatases médiant la conversion entre les phosphoinositides au niveau des différents organelles sont indiqués. EE, endosomes précoces; LE, endosomes tardifs; Ly, lysosomes; MVB, corps multivésiculaire; N, noyau; V, vacuole; GC, compartiment Golgien. Le PI4P est principalement présent au niveau de l'appareil de Golgi. Le PI(4,5)P₂ est surtout localisé à la membrane plasmique; alors que les PI3-phosphates sont localisés dans les endosomes. Adapté de (De Matteis et al. 2002).

II.B. La sécrétion

Les protéines impliquées dans la voie de sécrétion ou d'exocytose sont, pour la plupart, essentielles à la viabilité cellulaire. La voie de sécrétion a été d'abord décrite grâce à un crible génétique chez la levure basé sur la sécrétion de deux protéines solubles (l'invertase et la phosphatase acide). Cette étude réalisée par Schekman et ses collaborateurs a permis l'isolement de 23 mutants dits *sec*, thermosensibles, ayant des défauts de transport à différentes étapes de la voie de sécrétion (Novick et al. 1980; Novick et al. 1981).

Les protéines néo-synthétisées transitent du RE à l'appareil de Golgi. Au niveau de l'appareil de Golgi, une étape de tri s'effectue pour séparer les protéines destinées à la membrane plasmique de celles qui iront à la vacuole par les voies VPS ou ALP. Chacune de ces étapes fait l'objet d'un paragraphe ci-après et est représentée sur la figure 1.

II.B.1. Transport du RE à l'appareil de Golgi

La première étape de cette voie est l'entrée dans le RE (réticulum endoplasmique). Alors que les protéines solubles sont adressées au lumen du RE et y sont transloquées grâce à leur peptide signal qui y sera clivé; les protéines membranaires sont insérées dans la membrane du RE grâce à une région hydrophobe. A ce niveau, un contrôle qualité a lieu : les protéines correctement repliées se dirigent vers l'appareil de Golgi. Au contraire, les protéines mal repliées sont rétro-transloquées du RE vers le cytoplasme, ubiquitinées et éliminées par la voie ERAD (ER associated degradation), un système de dégradation ubiquitine/protéasome-dépendant (Meusser et al. 2005; Schmitz et al. 2005).

Après modification éventuelle (ajout d'une ancre GPI, glycosylation, ...), les protéines sont empaquetées dans des vésicules de transport destinées à l'appareil de Golgi. Le manteau COPII (coat protein complex II), s'associe à la membrane du RE pour permettre la déformation de la membrane, le bourgeonnement de la vésicule et sa fission (Matsuoka et al. 1998). Deux types de vésicules à manteau COPII de densités différentes existent chez *S.cerevisiae* : elles se distinguent par la nature des protéines qu'elles transportent. Les vésicules les moins denses contiennent la protéine à ancre GPI, Gas1p, requise pour l'assemblage de la paroi, alors que les plus denses contiennent des protéines comme la perméase générale aux acides aminés, Gap1p ou la phosphatase alcaline (ALP) (Muniz et al. 2001).

Les protéines vont alors circuler au sein des citernes du *cis*-Golgi vers le *trans*-Golgi (TGN), y être maturées ou modifiées. Certaines protéines, résidentes de l'appareil de Golgi y sont retenues grâce à des signaux de rétention. Les autres arrivent aux dernières citernes et sont alors triées et empaquetées dans des vésicules différentes en fonction de leur destination finale : membrane plasmique ou endosomes (voie VPS) ou vacuole (voie AP3).

Outre ce transport antérograde, il existe un transport rétrograde de l'appareil de Golgi au RE qui permet le retour des protéines résidant dans le RE. Il met en jeu le manteau COPI qui est également impliqué dans le transport antérograde intra-Golgi (Bonifacino and Lippincott-Schwartz 2003).

II.B.2. Transport de l'appareil de Golgi à la PM

Les protéines destinées à la membrane plasmique sont empaquetées dans des vésicules de sécrétion au niveau du TGN. Comme mentionné plus haut, l'exocyste (Sec3, 5, 6, 8, 10, 15p, Exo70, 84p) permet la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique.

Chez la levure et les eucaryotes supérieurs, plusieurs études ont suggéré l'existence de deux voies de sécrétion vers la membrane plasmique : une directe depuis le TGN et une passant par un compartiment intermédiaire de nature endosomale (Harsay and Schekman 2002). Les deux voies nécessitent l'exocyste pour la fusion à la membrane plasmique ; cependant les deux populations de vésicules ont pu être séparées sur gradient car elles présentent des densités différentes.

Les vésicules légères, qui vont directement du TGN à la PM, transportent l'ATPase de membrane plasmique, Pma1p. La genèse des vésicules légères ne nécessiterait aucun des manteaux protéiques principaux : ni la clathrine, ni les complexes adaptateurs (AP-1, 2, 3, GGAs) (Gu et al. 2001). Une publication récente suggère que le cargo Chs3p est empaqueté dans des vésicules recouvertes d'un nouveau type de manteau, l'exomère (Wang et al. 2006) (voir chapitre II A4). Mais, ce manteau n'interviendrait pas dans le trafic des autres cargos.

Au contraire, les vésicules lourdes qui transportent l'invertase semblent porter un manteau de clathrine. Leur trafic étant altéré dans des mutants *vps*, bloquant le trafic entre Golgi, endosome et vacuole (comme *vps1Δ*, *pep12Δ*, *vps4Δ*), les auteurs suggèrent qu'une branche de la voie d'exocytose chez la levure passerait par les endosomes (Harsay and Schekman 2002). La dynamine de levure Vps1p intervient pour la fission de ces vésicules émanant du TGN et destinées aux endosomes (Gurunathan et al. 2002).

II.B.3. Tri des protéines vers la vacuole

La vacuole reçoit des protéines de la voie d'endocytose (chapitre II) mais également des protéines qui y sont adressées par la voie de biosynthèse sous forme de vésicules issues du TGN et dont la fission dépend de Vps1p (Gurunathan et al. 2002). Certaines protéines sont destinées au lumen de la vacuole comme les protéases vacuolaires et les transporteurs et récepteurs de membrane plasmique à dégrader. D'autres protéines sont destinées à la membrane vacuolaire, comme la v-ATPase qui permet l'acidification de ce compartiment.

Deux voies de trafic vont du TGN à la vacuole chez la levure et les eucaryotes supérieurs (Figure 1). La voie VPS, empruntée par la CPY (carboxypeptidase Y), passe par les endosomes tardifs avant d'arriver à la vacuole (Cowles et al. 1997). La voie AP3, empruntée par l'ALP (alcaline phosphatase), est une voie directe (Piper et al. 1997).

a. Voie VPS

La voie VPS (vacuolar protein sorting) a été caractérisée grâce à différents cribles génétiques chez la levure. Au cours de ces études, environ 75 mutants *VPS*, requis pour le transport entre TGN, endosomes et vacuole ont été identifiés et regroupés en différentes classes, certains se nomment également *VAM* ou *PEP* (Raymond et al. 1992).

Parmi ces cribles, on peut citer ceux basés sur la sécrétion de CPY ou la morphologie vacuolaire. La carboxypeptidase Y, CPY, est une protéase vacuolaire soluble qui transite du RE à l'appareil de Golgi, puis aux endosomes tardifs et à la vacuole (figure 7). Au cours de son trajet, elle subit plusieurs modifications post-traductionnelles. En fonction du poids moléculaire de la CPY, on peut donc savoir où la protéine est bloquée dans les différents mutants considérés. Au niveau de l'appareil de Golgi, la CPY se lie à un récepteur trans-membranaire nommé Vps10p qui l'emmène à l'endosome tardif alors que Vps10p recycle vers l'appareil de Golgi (Deloche and Schekman 2002). Ce transport bidirectionnel requiert un signal contenu dans la partie cytosolique de la protéine Vps10p, similaire à celui qui est contenu dans le récepteur au mannose-6-phosphate des eucaryotes supérieurs. Le retour de l'endosome tardif à l'appareil de Golgi fait intervenir un complexe nommé rétromère constitué d'un sous-complexe de reconnaissance du cargo (Vps35p–Vps29p–Vps26p) et d'un sous complexe structural (Vps5p–Vps17p). Vps5p et Vps17p font partie de la famille des nexines de tri et se lient au PI3P *via* leur domaine PX (Phox homology) (Bowers and Stevens 2005).

Tous les mutants *VPS* ont été identifiés car ils secrètent la CPY au lieu de la maturer dans la vacuole (figure 7). Puis, ils ont été classés en fonction de leur morphologie vacuolaire (tableau 2, pour revue, voir (Bowers and Stevens 2005)), les mutants d'un même groupe présentent souvent un blocage à une même étape. Depuis, la fonction de la plupart des Vps a été découverte. Certaines restent cependant moins bien caractérisées comme Vps55p (Belgareh-Touze et al. 2002), une protéine à 4 segments transmembranaires localisée à l'endosome tardif ainsi que les Vps 61 à 75 identifiés lors de cribles récents (Bonangelino et al. 2002).

Parmi les gènes *VPS*, une classe nous a davantage intéressée au cours de ce travail : les gènes *VPS* de classe E qui codent pour les protéines permettant la formation des vésicules des corps multivésiculaires. Cette étape est commune à la voie VPS et à l'endocytose et sera détaillée au chapitre II C.2..

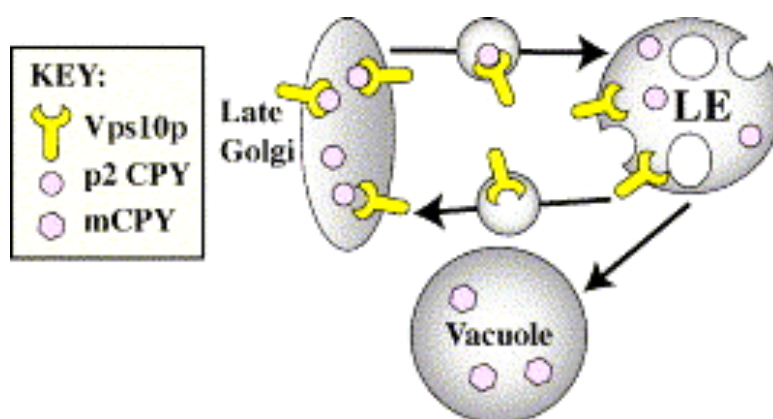


Figure 7 : Trafic de la CPY médiée par son récepteur Vps10p.

La forme p2 de la CPY se lie à Vps10p au niveau du TGN (late Golgi) et l'ensemble est transporté vers l'endosome tardif (LE). La CPY est dissociée de son récepteur qui recycle vers le TGN pour se lier à une autre molécule de CPY. Après fusion de l'endosome tardif avec la vacuole, la forme p2 de la CPY est maturée par les protéases vacuolaires pour obtenir sa forme mature (mCPY). Adapté de (Bowers and Stevens 2005).

Groupe	Morphologie vacuolaire
A	3-10 vacuoles (comme une souche sauvage) mais rassemblées
B	vacuoles fragmentées (>20)
C	Pas de vacuoles identifiables, hyperfragmentation
D	Large vacuole unique
E	Vacuoles plus larges que dans le sauvage avec un compartiment endosomal tardif aberrant collé (compartiment classe E)
F	Une large vacuole entourée de vacuoles très fragmentées.

Tableau 2 : classification des mutants VPS en fonction de la morphologie vacuolaire.

Adapté de (Bowers and Stevens 2005).

Outre les Vps, d'autres facteurs ont depuis été impliqués dans la voie VPS, comme la clathrine (Deloche and Schekman 2002) ou les adaptateurs Gga1p et 2p (Gu et al. 2001; Bonifacino and Lippincott-Schwartz 2003). Les protéines destinées à la vacuole sont ubiquitinées à la sortie de l'appareil de Golgi ou avant l'arrivée au MVB par l'ubiquitine ligase Rsp5p (Reggiori and Pelham 2002; Morvan et al. 2004); ce qui permet leur internalisation dans les vésicules internes des endosomes tardifs.

Certaines protéines empruntant la voie VPS n'ont qu'une seule destination possible : la vacuole. C'est le cas de la CPY ou d'enzymes vacuolaires synthétisées sous forme de précurseur contenant un domaine transmembranaire, comme la carboxypeptidase S (Cps1p) et la polyphosphate phosphatase (Phm5p) qui sont maturées à leur arrivée à la vacuole. Cependant, certains transporteurs de membrane plasmique de levure peuvent soit suivre la voie de sécrétion vers la membrane plasmique à partir de l'appareil de Golgi soit être ciblés à la vacuole pour dégradation en fonction des conditions de

croissance. C'est le cas par exemple de Gap1p (perméase générale à acides aminés) (Helliwell et al. 2001; Soetens et al. 2001); Tat2p (perméase à tryptophane) (Urbanowski and Piper 2001) ou Fur4p (perméase à uracile, (Blondel et al. 2004)).

Dès lors, se pose de manière aigüe, la question de savoir comment s'opère le tri des protéines entre ces deux voies. La réponse n'est encore que parcellaire. On sait par exemple que la polarité du segment transmembranaire est importante pour le ciblage des protéines vers la voie VPS à la sortie de l'appareil de Golgi (Rayner and Pelham 1997; Reggiori et al. 2000). Les motifs acides de type di-leucine semblent également importants dans le cas du Ci-MPR car ils médient l'interaction avec GGA2 (Dell'Angelica et al. 2000; Puertollano et al. 2001) et permettent le tri du TGN aux endosomes. De plus, l'ubiquitine pourrait être un signal de ciblage vers la vacuole par la voie VPS pour différentes protéines, comme Gap1p, en présence d'un excès de substrat (Helliwell et al. 2001 ; Umebayashi and Nakano 2003). Au contraire, en milieu carencé, Gap1p n'est pas ubiquitinée et est acheminée vers la membrane plasmique. Concernant Fur4p, on sait que ce tri vers la voie VPS est indépendant du niveau d'ubiquitination, de la partition dans les rafts mais pourrait dépendre d'un changement conformationnel dû à la fixation de l'uracile ((Blondel et al. 2004), Grimal et Morvan : communication personnelle).

b. Voie AP3

Cette voie, conservée de la levure aux mammifères, est directe entre l'appareil de Golgi et la vacuole (Figure 1), (pour revue, voir (Bowers and Stevens 2005)). Son existence a été suggérée par des études sur la phosphatase alcaline (ALP), une enzyme vacuolaire synthétisée sous forme d'un précurseur membranaire inactif et qui est maturé par les protéases une fois dans la vacuole (Piper et al. 1997). En effet, l'ALP ne s'accumule pas dans le compartiment de classe E dans des mutants *vps* de classe E et est normalement délivrée à la vacuole dans les mutants *vps* de classe D (requis pour la fusion des vésicules émanant de l'appareil de Golgi avec les endosomes) (Raymond et al. 1992). Ces différentes données ont permis de suggérer l'existence d'une voie de trafic entre Golgi et vacuole qui soit indépendante des endosomes. Plus tard, la machinerie spécifique de cette voie a été mise en évidence, le complexe adaptateur AP-3 (Apl6p (homologue sous-unité β), Apl5p (homologue sous-unité δ), Apm3p (homologue sous-unité μ), et Aps3p (homologue sous-unité σ)) est requis pour le ciblage à la vacuole de l'ALP et a donné son nom à la voie, la clathrine ne l'est pas. La t-SNARE vacuolaire Vam3p qui intervient dans toute fusion avec la vacuole, intervient également dans cette voie dont elle est cargo et acteur (Cowles et al. 1997). Enfin, Vps41p (Vps Classe B), qui interagit avec le complexe HOPS, s'associe à AP-3 pour permettre la formation de la vésicule. Un motif di-leucine semble essentiel au tri des cargos vers la voie AP-3 (Darsow et al. 1998).

II.C. L'endocytose

La voie d'endocytose permet aux cellules eucaryotes d'internaliser les protéines de membrane plasmique et les fluides extracellulaires et de les dégrader dans la vacuole/lysosome.

L'étude de cette voie de trafic et les données obtenues ont constitué une belle revanche pour les levuristes. En effet, il y a encore quelques années, on croyait que l'épaisse paroi entourant la levure empêchait toute endocytose. Et pourtant, la puissance de la génétique chez cet organisme a permis de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'endocytose, comme le rôle de l'actine ou de l'ubiquitine. Ces données seront détaillées ci-après, puis une rapide présentation des modes d'endocytose chez les eucaryotes supérieurs sera faite.

Les protéines de membrane plasmique de *S. cerevisiae* sont endocytées selon une voie bien caractérisée (figure 1). Elles traversent successivement les compartiments endosomaux précoces puis tardifs avant d'atteindre la vacuole/lysosome où elles sont dégradées. La chronologie des événements ainsi que les compartiments semblent globalement conservés de la levure aux eucaryotes supérieurs où la description des différents types endosomes date de 1988 (Schmid et al. 1988). Une étude en microscopie électronique après internalisation de nanoparticules d'or a permis à Prescianotto-Baschong et Riezman de mettre en évidence l'existence de deux types d'endosomes chez la levure (Prescianotto-Baschong and Riezman 1998). Ces compartiments ont des pH différents, contiennent des protéines spécifiques et sont morphologiquement différents. De manière schématique, les endosomes précoces sont des structures tubulo-vésiculaires petits et nombreux alors que les endosomes tardifs sont multivésiculaires, plus gros et proches de la vacuole (Hicke et al. 1997). La vacuole est un large compartiment mono ou polylobé riche en protéases.

Ici encore, ce sont des cribles génétiques chez la levure qui ont permis d'identifier les gènes *END* codant pour les protéines impliquées dans l'endocytose. Alors que Raths et al ont identifié des mutants d'endocytose en phase fluide en utilisant un colorant nommé Lucifer Yellow (Raths et al. 1993); Munn et al se sont basés sur l'acidification de la vacuole de levures mutantes cultivées en milieu acide et ont découvert 6 mutants *end* (Munn and Riezman 1994).

On distingue généralement plusieurs types d'endocytose : celle en phase fluide où les vésicules d'internalisation s'emplissent de milieu et qui peut être suivie en ajoutant des colorants dans le milieu (Lucifer yellow...) et celle médiée par un récepteur. Dans ce cas, le récepteur fixe son ligand et l'ensemble est endocyté. Parmi les cargos les plus utilisés pour suivre ce mode d'endocytose, on peut citer les récepteurs de phéromones, Ste2p et Ste3p respectivement récepteurs de l'alpha-facteur et de l'a-facteur. L'endocytose de transporteurs a également été étudiée, par exemple, celle de Ste6p transporteur de l'a-facteur ainsi que celle de différentes perméases comme Fur4p pour l'uracile (utilisée dans notre étude) ou Gap1p, perméase générale à acides aminés. De plus, le FM4-64, un colorant lipophile (qui se lie aux lipides) permet donc de suivre le flux des membranes pendant

l'endocytose et le recyclage. Il a été utilisé au cours de différents cribles chez la levure pour mettre en évidence des mutants de trafic.

II.C.1. L'internalisation

Les événements conduisant à la formation et au bourgeonnement des vésicules d'endocytose sont représentés sur la figure 8. Jusqu'à récemment, on pensait que ces vésicules se formaient aléatoirement à la membrane plasmique après regroupement stochastique de protéines et de lipides. Mais, une étude récente de Walther a permis de mettre en évidence l'existence de lieux préférentiels, nommés eisosomes (Walther et al. 2006). Les eisosomes sont de larges assemblages immobiles composés des protéines solubles Pil1p et Lsp1p et de la protéine membranaire Sur7p. Par microscopie à fluorescence, ils ont montré que ce sont les sites d'endocytose des protéines et des lipides. De plus, des interactions génétiques avec d'autres protéines de la machinerie d'endocytose ont été trouvées. Enfin, la délétion de *PIL1* conduit à un regroupement des eisosomes, l'endocytose ayant alors lieu au niveau de ces zones.

Les nombreuses études sur l'internalisation dans la levure et les cellules de mammifères ont démontré qu'il s'agissait d'un événement hautement régulé qui dépendait de différentes classes de protéines agissant séquentiellement. Ces différentes classes seront détaillées ci-après.

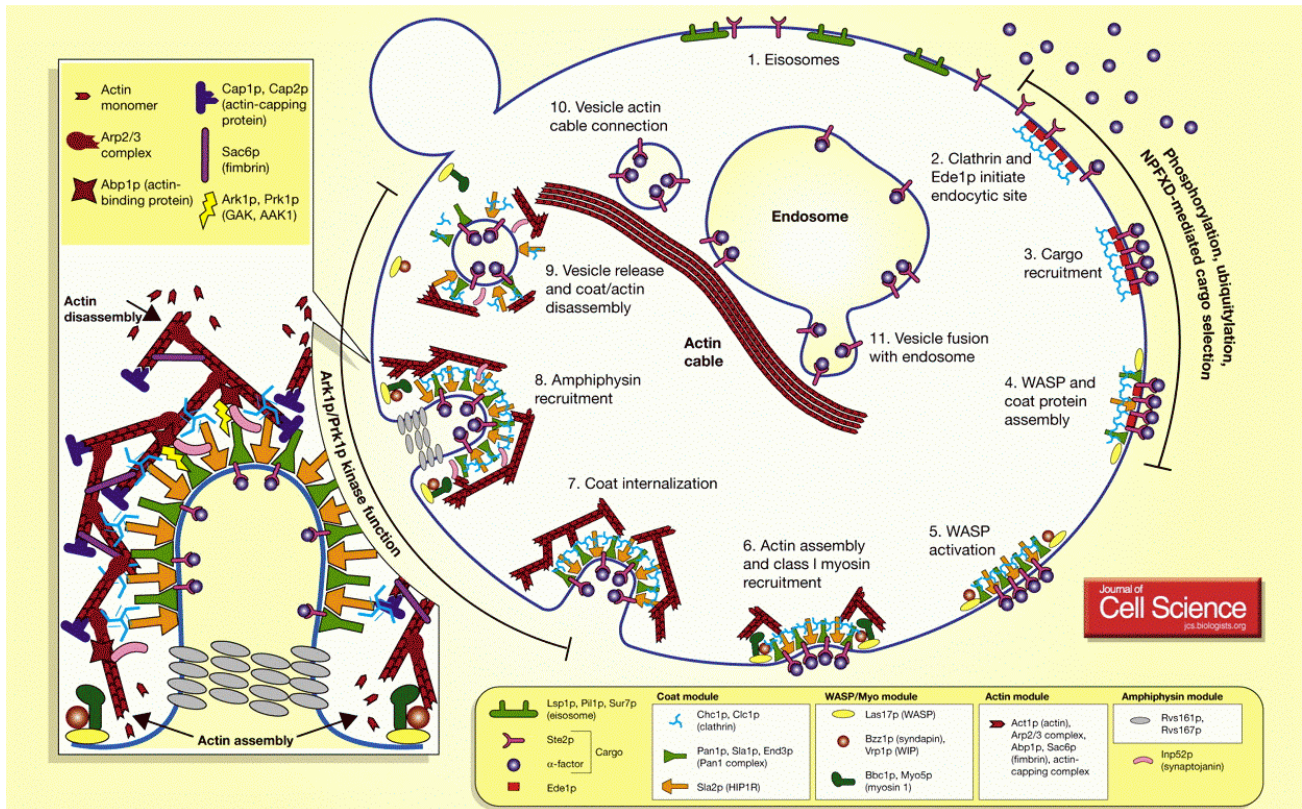


Figure 8 : La machinerie d'internalisation chez la levure.

1. Les eisosomes sont les sites préférentiels d'internalisation. 2. La clathrine, les protéines à domaine EH, les protéines Ent1p et 2p et Ede1p initient le processus. 3. Le récepteur est recruté après liaison de son ligand, Ste2p est donné comme exemple. 4. Les protéines de manteau Pan1p et Sla2p s'accablent et la machinerie Las17p/WASP active Arp2/3p qui active l'assemblage de l'actine. 5 et 6. L'actine et la myosine Myo5p sont recrutées progressivement. 7. La vésicule s'invagine. 8. Les amphiphysines Rvs161p et 167p permettent la libération de la vésicule. 9. Recyclage des protéines du manteau. 10. La vésicule se déplace sur les câbles d'actine. 11. Elle fusionne avec l'endosome précoce. Adapté de (Toret and Drubin 2006).

a. Rôle de l'actine

L'intégrité du cytosquelette d'actine est primordiale pour l'endocytose chez la levure (Toret and Drubin 2006) comme présenté sur la figure 8. Le rôle exact de l'actine dans l'endocytose chez la levure reste flou, sa polymérisation ou sa dépolymérisation, pourrait fournir la force requise pour la libération des vésicules de la membrane plasmique (D'Hondt et al. 2000). L'actine est directement requise pour l'étape d'internalisation (Kubler and Riezman 1993). Ainsi, la drogue latrunculine A qui empêche sa polymérisation bloque l'endocytose chez la levure et les cellules de mammifères. Des mutants pour le complexe Arp2/3p de nucléation de la polymérisation de l'actine présentent un défaut d'endocytose (Moreau et al. 1997b). De plus, parmi les protéines End, plusieurs lient l'actine (End6/Rvs161p, End5p) ou sont requises pour l'organisation du cytosquelette d'actine (End3p, End4/Sla2p, End9p) (Tang et al. 1997).

b. Rôle de la clathrine

Le rôle de la clathrine en tant que manteau a été décrit au chapitre XX (pour revue, voir (Kirchhausen 2000)). L'existence de puits recouverts de clathrine chez les eucaryotes supérieurs est connue depuis les années 70. L'endocytose dépendante de la clathrine et de AP2 est la voie majoritaire d'internalisation des protéines dans les cellules de mammifère (chapitre II C.1.f.). Chez la levure, l'existence d'une voie d'endocytose dépendante de la clathrine a longtemps été controversée (Baggett and Wendland 2001). Tout d'abord ; aucun puit recouvert de clathrine n'avait pu être observé au niveau de la membrane plasmique chez la levure. De plus, la délétion des gènes codant la chaîne lourde ou la chaîne légère de la clathrine n'inhibe l'internalisation des récepteurs de l' α et alpha-facteur que d'environ 50% (Tan et al. 1993). Cependant, des études récentes ont bien établi l'existence d'une voie d'internalisation dépendante de la clathrine (Newpher et al. 2006; Newpher and Lemmon 2006). Par contre, s'il y a bien des homologues des sous-unités d'AP2, ils n'interviennent pas dans l'endocytose chez la levure.

c. Rôle des protéines à domaine EH

Les protéines à domaine EH, domaine d'interaction protéine-protéine, ont un rôle central dans l'internalisation car elles interagissent avec de nombreuses protéines de la machinerie (Miliaras and Wendland 2004). Le domaine EH (EPS15 homology domain), long de 100 acides aminés, a été identifié dans Eps15 (Epidermal growth factor pathway substrate 15) où il est présent en trois copies (figure 9). Depuis, il a été identifié dans plus de 50 protéines chez la levure, le nématode, les plantes et les mammifères. La structure de plusieurs domaines EH a été déterminée par RMN : deux motifs hélice-boucle-hélice reliés par un feuillet β (Confalonieri and Di Fiore 2002). Les domaines EH interagissent avec des tripeptides NPF (de Beer et al. 2000). Le réseau d'interaction entre protéines à domaine EH et leurs interactants a été étudié (Santolini et al. 1999).

Il existe différents types de protéines à domaine EH, de manière schématique, on distingue les protéines contenant une répétition de domaines EH côté Nter et les protéines présentant un seul domaine EH en Cter. Les protéines de la 1^{ère} classe interviennent majoritairement dans l'internalisation, alors que les protéines de la 2^{ème} classe interviennent dans le recyclage chez les eucaryotes supérieurs et seront discutées dans la partie correspondante (chapitre III.B.3.). Eps15 joue un rôle majeur dans l'internalisation médiée par la clathrine : celui d'un adaptateur entre le cargo, AP-2 et l'epsine ((Benmerah et al. 1998), (Salcini et al. 1999), (Mukhopadhyay and Riezman 2007)). La perte de fonction de Eps15 inhibe l'endocytose des récepteurs liés à l'EGF et à la transferrine.

Le génome de *Saccharomyces cerevisiae* compte 5 protéines à domaine EH (figure 9). Trois d'entre elles, Ede1p, Pan1p et End3p ont une série de 2 à 3 domaines EH en Nter. Les deux autres; Irs4p et Tax4p ont un unique domaine EH en C-terminal.

End3p, Pan1p et Ede1p ont été identifiées au cours de cribles pour des défauts d'endocytose de l'alpha-facteur et du Lucifer yellow (Santolini et al. 1999; Gagny et al. 2000). End3p, Pan1p et Ede1p sont requises pour l'endocytose en phase fluide et pour l'internalisation d'un grand nombre de cargos (Ste2p, Ste3p, Ste6p, Fur4p...) et des lipides (FM4-64) mais également pour l'organisation correcte du cytosquelette d'actine (Benedetti et al. 1994). Elles se localisent au niveau des patches d'actine (Tang et al. 1997) et leur délétion conduit à l'accumulation d'invaginations à la membrane plasmique (Wendland et al. 1996). De plus, de nombreuses interactions ont été mises en évidence entre Pan1p et des protéines de la machinerie d'internalisation (End3p, Ent1p, Ent2p, yAP180A et yAP180B ...) ou des protéines du cytosquelette d'actine (Pan1p, Arp2p and 3p, Prk1p...) (Wendland and Emr 1998; Gagny et al. 2000), confirmant un rôle central de lien au sein de la machinerie d'endocytose.

Irs4p et Tax4p ont une fonction moins bien caractérisée. En 2004, le groupe de Hall a montré qu'elles régulaient négativement le niveau de Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2) à la membrane plasmique (Morales-Johansson et al. 2004). En effet, Tax4p et Irs4p se lient à la synaptojanine (PI(4,5)P2 5-phosphatase) Inp51p et l'active. Les deux protéines sont redondantes pour cette fonction et la double délétion de *IRS4* et *TAX4* est une phénotypie de la délétion de *INP51*. La découverte d'un rôle inattendu pour ces deux protéines dans l'autophagie est l'objet de la publication 2.

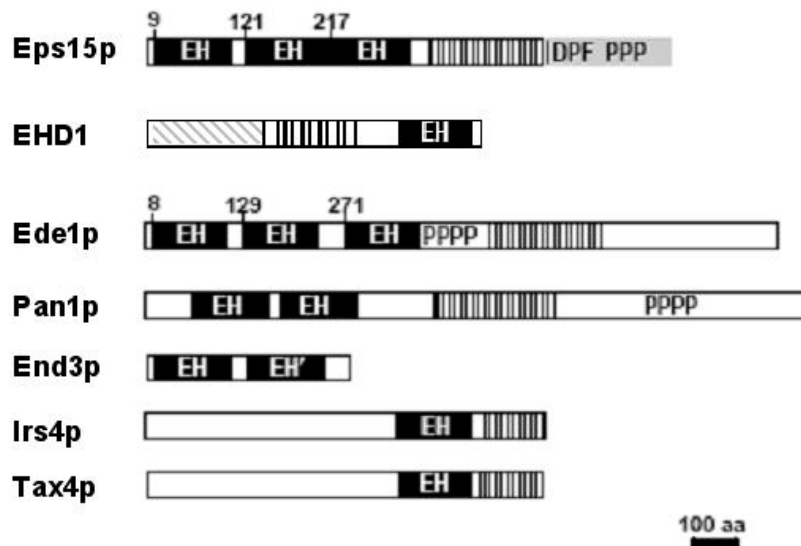


Figure 9 : Protéines à domaine EH.

Domaine EH: noir ; domaine coiled-coil : hachures verticales; domaine de liaison à AP2 : gris clair; domaines de liaison aux nucléotides : hachures grises en diagonales. PPP, domaine riche en proline. DPF (i.e. Asp, Pro, Phe), répétition DPF. Adapté de (Gagny et al. 2000).

d. Autres protéines

De nombreuses autres protéines interviennent dans l'endocytose mais ne feront pas l'objet d'une description détaillée dans ce manuscrit. Parmi elles, on peut citer l'epsine, l'endophiline et la dynamine qui ont la capacité à courber les membranes *in vitro*.

e. Rôle de l'ubiquitine

Voilà plus de dix ans, l'ubiquitine a été montrée comme étant un signal d'endocytose. L'endocytose dépendante de l'ubiquitine est maintenant considérée comme un processus général chez la levure mais également, de plus en plus, dans les cellules de mammifère. Kolling et Hollenberg ont été les premiers à observer que, dans des cellules déficientes pour l'internalisation, le transporteur de l' α -facteur Ste6p s'accumulait à la membrane plasmique sous forme de conjugués ubiquitinés (Kölling and Hollenberg 1994). Puis, les exemples similaires se sont multipliés chez la levure. Ainsi, le récepteur du facteur α , Ste2p est ubiquitiné en réponse à la fixation de son ligand. Cette ubiquitination conduit à l'internalisation du récepteur, puis à sa dégradation vacuolaire (Hicke and Riezman 1996).

Un crible pour identifier des protéines impliquées dans la dégradation de Gap1p en réponse à l'ajout d'ammonium (perméase générale aux acides aminés) a permis de mettre en évidence l'ubiquitine-ligase, Rsp5p (Hein et al. 1995) (chapitre II.A.6). Rsp5, qui est essentielle à la viabilité, intervient dans l'ubiquitination de tous les récepteurs et transporteurs de membrane plasmique dont l'endocytose dépend de l'ubiquitine (Hicke and Dunn 2003). En effet, l'ubiquitination de l'uracile perméase, et donc son endocytose, dépendent aussi de Rsp5p (Hein et al. 1995; Galan et al. 1996). Gap1p et Fur4p sont modifiées par des chaînes d'ubiquitines liées entre elles par la lysine K63 (Galan and Haguenaer-Tsapis 1997a; Springael et al. 2002) (chapitre II A.6). La mutation de deux lysines cibles sur Fur4p et sur Gap1p stabilise ces protéines à la membrane plasmique (Marchal et al. 2000; Soetens et al. 2001).

La fusion en phase d'une ubiquitine aux cargos Fur4p, Ste2p et Ste6p permet de contrebalancer au moins partiellement un défaut d'ubiquitination dans un mutant *rsp5*. En outre, la fusion d'une ubiquitine en phase avec une protéine stable à la membrane plasmique, Pma1p, provoque son internalisation. Ces différentes études suggèrent que l'ubiquitine est un signal d'internalisation.

On ignore encore comment l'ubiquitination déclenche l'endocytose, mais il est à noter que de nombreuses protéines de la machinerie d'internalisation elle-même, lient l'ubiquitine, comme Eps15 ou l'epsine par exemple *via* leur domaine UIM ou la protéine Ede1p *via* son domaine UBA; ce qui permettrait de réguler leur fonction (Polo et al. 2002).

Cependant, dans les cellules de mammifères, le rôle de l'ubiquitine dans l'internalisation semble beaucoup moins général ; pour revue, voir (Hicke and Dunn 2003; Dupre et al. 2004). Même si de nombreuses protéines ont été montrées ubiquitinées (canaux, transporteurs, récepteurs tyrosine kinase

comme l'EGFR, récepteurs couplés à des petites protéines G...), le rôle de cette ubiquitination comme signal d'internalisation ne semble pas être la règle. En effet, différents cas de figure se présentent : internalisation indépendante de l'ubiquitine ou dépendante de la monoubiquitination, de la multi-monoubiquitination ou de la polyubiquitination.

L'un des premiers exemples étudié fut le canal sodium épithélial (ENaC). Son ubiquitination semble requise pour son internalisation. Nedd4, un des homologues humains de Rsp5, est requis pour cette ubiquitination (Staub et al. 1997; Rotin et al. 2000).

Le groupe de Paolo Di Fiore a montré que l'ubiquitination de l'EGFR (après fixation de son ligand) par l'E3 Cbl lui permet d'interagir avec l'epsine et Eps15 qui est requise pour son internalisation *via* sa liaison à AP2 et la clathrine (Confalonieri and Di Fiore 2002; Sigismund et al. 2005). Cette étude semble indiquer que le rôle central de l'ubiquitine est le recrutement de la machinerie d'internalisation au niveau du cargo. Il a d'abord été décrit que l'EGFR serait modifié par une seule ubiquitine mais sur plusieurs lysines (multi-mono-ubiquitination). Mais, il vient d'être montré par spectrométrie de masse que l'EGFR est poly-ubiquitiné par des chaînes d'ubiquitine, majoritairement de type K63 (Huang et al. 2006). De manière intéressante, la substitution de la partie cytosolique de l'EGFR par une ubiquitine est suffisante pour son internalisation indépendamment de la fixation du ligand (Haglund et al. 2003) semblant indiquer que l'ubiquitination et non la fixation de l'EGF est le signal d'internalisation, de manière similaire à ce qui est observé chez la levure.

L'EGFR peut être endocyté de manière dépendante (à forte dose en EGF) ou indépendante de l'ubiquitine (à faible dose en EGF) (voir paragraphe suivant) (Sigismund et al. 2005). Ainsi, l'ubiquitine serait requise pour l'endocytose de l'EGFR dépendante des rafts mais pas celle dépendante de la clathrine (pour revue, voir (Mukhopadhyay and Riezman 2007)).

L'ubiquitine joue aussi un rôle prépondérant pour le ciblage des cargos dans les vésicules endosomales internes des MVBs (voir chapitre II C.2.a.).

f. Différents modes d'internalisation chez les eucaryotes supérieurs

Différents modes d'internalisation semblent cohabiter chez les eucaryotes supérieurs : la phagocytose, la pinocytose et la macro-pinocytose, comme décrit dans la revue (Conner and Schmid 2003) et sur la figure 10 A. Nous n'entrerons pas ici dans les détails.

La 1^{ère} voie est la phagocytose, celle-ci permet l'internalisation de particules de volume important comme les bactéries et n'a lieu que dans certains types cellulaires comme les macrophages. La macropinocytose, intervient notamment dans la régulation négative de molécules de signalisation. Ces deux voies s'accompagnent de la formation de larges protrusions de la membrane plasmique dépendant de l'actine. La pinocytose permet l'internalisation de molécules par des vésicules de taille inférieure à 100 nm.

La voie la mieux caractérisée chez les mammifères est l'endocytose médiée par la clathrine (CME) (figure 10 C). Elle est importante, par exemple, pour l'endocytose des récepteurs à la LDL (low-density lipoprotein) et à la transferrine. Les différentes étapes du processus sont résumées sur la figure 10 B. Après la concentration de ligands liés à leurs récepteurs au sein de zones portant un manteau de clathrine, les vésicules s'invaginent et sont fermées et séparées de la membrane plasmique grâce à la dynamine. La clathrine interagit avec le récepteur *via* AP2 qui joue le rôle d'adaptateur. Après la formation de la vésicule, les composants du manteau sont recyclés pour être ré-utilisés.

Plus récemment, d'autres voies, indépendantes de la clathrine ont été mises en évidence en utilisant des inhibiteurs de la voie médiée par la clathrine ou des déplétions de ses constituants. Ces voies alternatives dépendent de différents types de rafts (microdomaines enrichis en cholestérol et sphingomyeline). Certaines structures lipidiques particulières enchassant une protéine, la cavéoline, forment une invagination nommée cavéolae. La voie cavéolae intervient dans l'internalisation du virus SV40, des protéines à ancre GPI et de toxines (Pelkmans et al. 2002; Nichols 2003; Parton 2003), il n'existe que dans certains types cellulaires. D'autres types de rafts interviennent également dans l'internalisation d'autres molécules, comme l'interleukine 2, ces voies sont encore largement méconnues en terme de machinerie et de régulation.

Un même cargo peut transiter par différentes voies en fonction des conditions du milieu, comme c'est le cas pour le récepteur à l'EGF (Sigismund et al. 2005). En effet, l'EGFR, non-ubiquitiné, est internalisé *via* l'endocytose médiée par la clathrine à faible dose en EGF. A fortes doses en EGF, l'EGFR est ubiquitiné et endocyté *via* une voie indépendante de la clathrine mais dépendante des rafts.

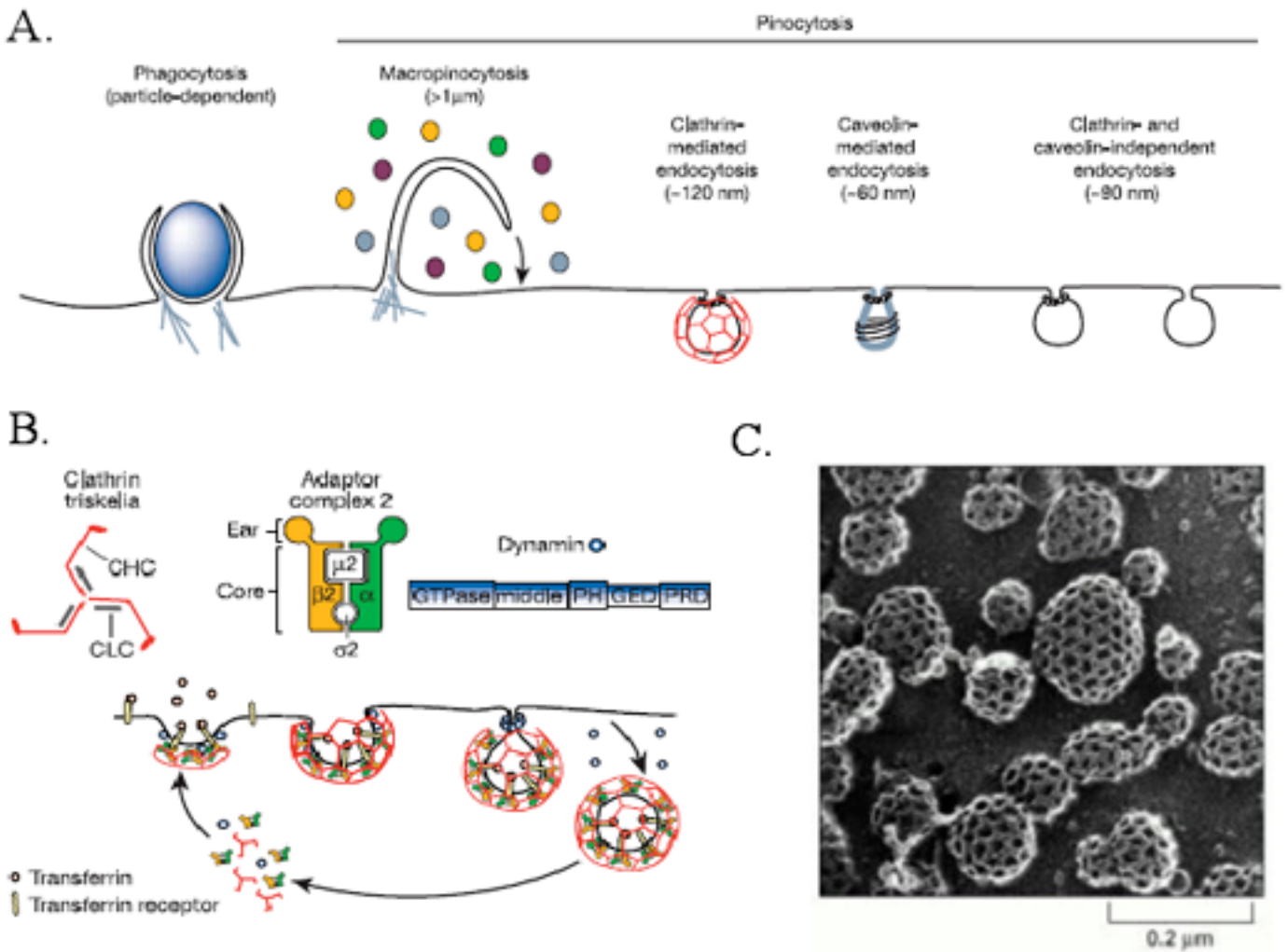


Figure 10 : Les voies d'endocytose chez les eucaryotes supérieurs.

A. Différents modes d'internalisation chez les eucaryotes supérieurs : phagocytose et pinocytose (macropinocytose ; endocytose médiée par la clathrine ; cavéolae ; endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline mais dépendante d'autres rafts).

B. Haut : structure des protéines intervenant dans l'endocytose médiée par la clathrine : le triskèle de clathrine (CHC, chaîne lourde ; CLC, chaîne légère), l'adaptateur AP-2 hétérotétramérique et la GTPase dynamine.

Bas : les étapes de la formation de la vésicule contenant la transferrine liée à son récepteur :

La clathrine aide à déformer la membrane plasmique et à former un puit recouvert de clathrine. Le complexe AP2 est envoyé à la membrane plasmique via son domaine alpha-adaptine, permet l'assemblage de la clathrine via sa sous-unité β_2 , et interagit avec les signaux de tri du cargo par sa sous-unité μ_2 . Après formation de la vésicule, la dynamine est recrutée au niveau du cou et s'y assemble en un anneau de constriction qui permet la fission de la vésicule qui est libérée puis les composants du manteau sont recyclés. A et B adaptés de (Conner and Schmid 2003)

C. Structure de vésicules recouvertes de clathrine à la membrane plasmique, étude en microscopie électronique (Deep etch cryo-electromicroscopy). <http://www.steve.gb.com/science/protein-targeting.html>.

II.C.2. L'entrée dans les MVBs

En l'espace de 6 ans, des progrès très importants ont été réalisés dans la compréhension des événements associés à la genèse des corps multivésiculaires (multivesicular bodies, MVBs). Au niveau des endosomes précoces (dans les cellules de mammifères), et des endosomes tardifs (dans la levure), se produit un processus d'invagination de la membrane de l'organite vers l'intérieur de ces compartiments. Suite à la formation de ces vésicules internes à l'endosome, il devient un véritable corps multivésiculaire, bien reconnaissable par microscopie électronique (figure 11). Les premières descriptions en microscopie électronique datent de la fin des années 60 chez les mammifères.

Comme mentionné au chapitre II B.3.a., parmi les 75 mutants *vps* identifiés par plusieurs cribles génétiques chez la levure, 18 sont regroupés sous le terme de *vps* de Classe E (Raymond et al. 1992). Tous sont caractérisés par la formation d'un compartiment endosomal exacerbé, dit compartiment Classe E. De nombreuses études en microscopie électronique chez la levure et les mammifères montrent que ce compartiment consiste en un empilement de saccules et de tubules (figure 11).

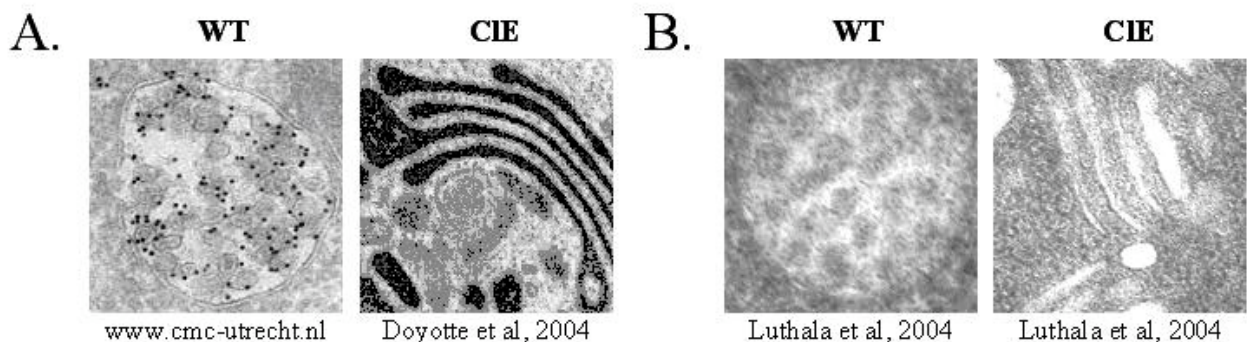


Figure 11 : Etude en microscopie électronique des compartiments endosomaux tardifs.

Dans un contexte sauvage (WT) et Classe E (CIE) ; A. Cellules de mammifères ; B. Levure S. cerevisiae.

Il est à noter que la topologie de ce bourgeonnement vésiculaire (vers le lumen de l'endosome) est inversée par rapport à ce qui a lieu au niveau des autres organelles (vers le cytoplasme). Ceci pose un certain nombre de questions sur les protéines capables de générer une telle courbure. Il a été proposé que des lipides soient impliqués grâce à une asymétrie locale dans la composition lipidique entre les deux couches de la membrane riche en PI(3)P (ou LBPA chez les mammifères) sous l'impact du gradient de pH. Alternativement, la réponse à cette question pourrait être apportée par une étude récente menée par Eugster et ses collègues. Vps27p interagit avec Ent3p et Ent5p, deux protéines à domaine ENTH (famille des epsines) et ANTH respectivement. Ces deux protéines sont requises pour le tri des cargos au niveau du MVB et se lient avec le phosphatidyl inositol-3, 5-bisphosphate PI(3,5)P₂ (produit par la phosphatidyl inositol 3-phosphate 5-kinase : Fab1p). Ent3p and Ent5p pourraient déformer la membrane du MVB pour permettre la formation de la vésicule (Friant et al. 2003; Eugster et al. 2004). La protéine Epsine 1 a une fonction similaire à la membrane plasmique

dans les cellules de mammifères, cependant, la topologie est inversée. Des expériences supplémentaires semblent donc nécessaires afin de résoudre cette énigme (Ford et al. 2002).

Ce type de bourgeonnement « inversé » est également utilisé par les rétrovirus qui bourgeonnent à la membrane plasmique ou dans des organelles internes en fonction du type cellulaire. En effet, des études récentes suggèrent que le virus HIV, qui ne possède pas sa propre machinerie de bourgeonnement, est capable d'interagir avec la machinerie ESCRT de formation des MVBs mais également de la détourner vers la membrane plasmique pour bourgeonner vers le milieu extracellulaire (Fengsrud et al. 2000; Pornillos et al. 2002; Pornillos et al. 2003). Cependant, les modalités exactes de ce bourgeonnement sont un sujet de polémique. Il a été observé que dans des cellules où le fonctionnement des ESCRTs est inhibé, la réplication du virus est inhibée et un virus immature reste attaché à la membrane plasmique. Il semble que le virus s'accumule et bourgeonne majoritairement au niveau des MVBs contenant aussi les MHC classe II (Raposo et al. 2002). Une hypothèse séduisante a été proposée pour expliquer la propagation des rétrovirus : ils seraient inclus et libérés avec les exosomes, vésicules intraluminales des MVBs libérées dans le milieu extracellulaire après fusion de certains MVBs avec la membrane plasmique (Gould et al. 2003) (Fevrier and Raposo 2004).

a. Tri des cargos et ubiquitine

Les endosomes tardifs sont des compartiments qui jouent un rôle central dans le trafic intracellulaire. En effet, deux voies de trafic vers la vacuole convergent vers ce compartiment : la voie VPS et la voie d'endocytose. Un tri s'opère entre les protéines qui vont être recyclées vers l'appareil de Golgi, celles qui vont être recyclées vers la membrane plasmique, et celles qui sont destinées à la vacuole.

Différentes études ont montré que le ciblage des protéines (Fur4p, Gap1p, Phm5p, Cps1p...) vers les zones invaginées requiert en général leur ubiquitination préalable (Katzmann et al. 2001 ; Reggiori and Pelham 2001; Urbanowski and Piper 2001 ; Hicke and Dunn 2003). L'ubiquitination du cargo met en jeu l'enzyme Rsp5p. Au contraire de ce qui se passe à la membrane plasmique, aucune phosphorylation préalable de Fur4p n'est ici nécessaire. La protéine Sna3p semblait être un cas particulier avec un tri indépendant de l'ubiquitine (Reggiori and Pelham 2001). Mais, il vient d'être montré que son trafic de l'appareil de Golgi aux endosomes dépend d'une liaison directe à Rsp5p (Watson and Bonifacino 2007) (McNatt et al. 2007) (Oestreich et al. 2007b). Par ailleurs, son ciblage vers les MVBs dépend de son ubiquitination (communication personnelle Grimal et Stawiecka).

La machinerie mise en jeu dans la reconnaissance des protéines ubiquitinées et la genèse des MVBs est conservée de la levure à l'homme. Parmi les 18 protéines Vps de classe E, dix forment les complexes ESCRTs, alors que certaines participent au tri du cargo ubiquitiné en amont, comme Vps27p/HRS et Hse1p/STAM respectivement chez la levure et les cellules de mammifère. Ces protéines sont parfois appelées complexe ESCRT 0. Suite à une étude en double hybride, il a été

proposé que Hse1p pourrait interagir avec Rps5p et le recruter au niveau du MVB afin qu'il ubiquitine le cargo (Bowers et al. 2004).

Vps27p/HRS est une protéine centrale du processus par les différentes interactions qu'elle médie. Tout d'abord, elle interagit avec le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P), lipide spécifique des endosomes *via* son domaine FYVE (Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1). De plus, Hrs contient un motif d'interaction avec la clathrine, et une colocalisation de Hrs avec un manteau plat de clathrine sur les endosomes a été observée en microscopie électronique (Fengsrud et al. 2000 ; Sachse et al. 2002). Ce manteau permettrait la concentration des facteurs impliqués dans l'invagination avec les cargos.

En outre, Vps27p possède un domaine VHS et deux domaines UIM d'interaction avec l'ubiquitine lui permettant donc d'interagir avec le cargo ubiquitiné et d'en gérer le tri vers les zones d'invagination (Fengsrud et al. 2000 ; Bilodeau et al. 2002 ; Kuma et al. 2002 ; Bache et al. 2003a ; Swanson et al. 2003). La mutation du domaine UIM de Vps27p entraîne un défaut de tri des protéines ubiquitinées mais pas un défaut de formation des MVBs dont les vésicules restent vides (Bilodeau et al. 2002 ; Kuma et al. 2002) suggérant que ces deux étapes sont bien distinctes. Plusieurs sous-unités de la machinerie d'invagination possèdent des domaines de liaison à l'ubiquitine et d'autres sont également ubiquitinées, ce qui pourrait réguler leur activité. Il est à noter qu'à la fin du processus d'invagination, le cargo et la machinerie sont dé-ubiquitinés par l'ubiquitine isopeptidase, Doa4p , permettant ainsi le maintien du stock d'ubiquitine par recyclage (Dupre and Haguenaer-Tsapis 2001).

Enfin, Vps27p interagit avec le complexe ESCRT I et pourrait donc le recruter au niveau de la membrane du MVB quand un cargo doit être internalisé (Bache et al. 2003b ; Odorizzi et al. 2003). Hse1p/STAM qui interagit avec Vps27p semble aussi impliquée dans le tri des protéines ubiquitinées (Bilodeau et al. 2002 ; Bache et al. 2003a) ; mais sa fonction dans la levure est moins caractérisée.

b. Les complexes ESCRTS

Préalablement à l'invagination de la membrane de l'endosome, trois complexes protéiques dits ESCRTs (endosomal protein sorting complex required for transport) agissent séquentiellement : ESCRT I (composé de Vps23p, Vps28p, Vps37p et Mvb12p), ESCRT II (Vps22p, Vps25p et Vps36p) et ESCRT III (Vps2p, Vps20p, Vps24p et Vps32/Snf7p) (Katzmann et al. 2001 ; Babst et al. 2002) (figure 12A). A quelques exceptions près, la fonction moléculaire de chacune de ces protéines reste floue. Le complexe ESCRT I, recruté par Vps27p, va prendre en charge les protéines ubiquitinées et recruter le complexe ESCRT II. Ce dernier va ensuite permettre le recrutement et l'assemblage du complexe ESCRT III. Après déubiquitination, le cargo est internalisé alors que les complexes ESCRTs sont dissociés de la membrane du MVB par l'activité ATPasique de Vps4p (Babst et al. 1997; Odorizzi et al. 1998).

Les complexes ESCRTs semblent hautement conservés au sein du règne eucaryote. Le complexe ESCRT I forme un complexe stable cytoplasmique qui atteint la membrane de l'endosome par

recrutement par Vps27p *via* son interaction avec Vps23p. Vps23p et son homologue humain Tsg101 (tumor sensibility gene 101) possèdent un domaine UEV de liaison à l'ubiquitine ; ce domaine est requis pour la reconnaissance des protéines ubiquitinées (Babst et al. 2000 ; Bishop et al. 2002). ESCRT II est un complexe hétérotrétramérique soluble et stable grâce à plusieurs interactions (figure 12B). Vps36p appartenant au complexe ESCRT II possède deux domaines NZF de liaison à l'ubiquitine dont la mutation entraîne un défaut similaire à la délétion de la protéine entière : absence de formation du MVB (Falguieres et al. 2001). Récemment, il a été montré que la surexpression du complexe ESCRT II pouvait contrebalancer un défaut de l'ESCRT I et permettait le recrutement normal de l'ESCRT III et conduire à la formation de vésicules (Babst 2005).

Les protéines constituant le complexe ESCRT III ne sont pas trouvées en interaction dans le cytosol, elles ne s'associent qu'après recrutement séquentiel de Snf7p/Vps20p puis Vps2p/Vps24p au niveau des membranes endosomales. Vps20p pourrait interagir avec des protéines trans-membranaires à transporter. Il a été proposé par Babst *et al* que le rôle de ESCRT III serait de concentrer les protéines à internaliser (Babst et al. 2002). De plus, Snf7p recrute trois protéines Vps de classe E sur la membrane : Doa4p, Vps4p et Bro1p. Les phénotypes de *doa4Δ*, où le pool d'ubiquitine est réduit, sont différents des phénotypes Classe E classiques et indiquent que la dé-ubiquitination n'est pas requise à la formation du MVB (Amerik et al. 2000). Au contraire, la dissociation des complexes ESCRTs de la membrane endosomale médiée par Vps4p semble essentielle à la formation des vésicules (Odorizzi et al. 1998). Le rôle de Bro1p semble être d'activer Doa4p, en effet, le défaut de tri d'une souche délétée pour *BRO1* peut être complété par surexpression de *DOA4*.

Plusieurs nouveaux Vps de classe E associés aux ESCRTs ont été identifiés ces dernières années grâce au réseau d'interactions obtenu par des double-hybrides à large échelle (Bowers et al. 2004; Babst 2005) (figure 12B). Par exemple, Vps60p, Vps46p/Fti1p/Did2p et Vta1p pourraient réguler l'activité ATPasique de Vps4p (Lottridge et al. 2006). Vps46p régule l'association de Vps4p aux membranes ainsi que l'interaction entre Vta1p et Snf7p (ESCRT III). Enfin, au cours d'un crible pour trouver des facteurs impliqués dans la sélection des cargos et basé sur la localisation de Sna3-GFP, un nouveau composant du complexe ESCRT I a été identifié : Mvb12p (Oestreich et al. 2007a). Celui-ci a été découvert simultanément par deux autres groupes par un crible de localisation d'ORF au MVB et de délocalisation de GFP-CPS (Chu et al. 2006; Curtiss et al. 2007).

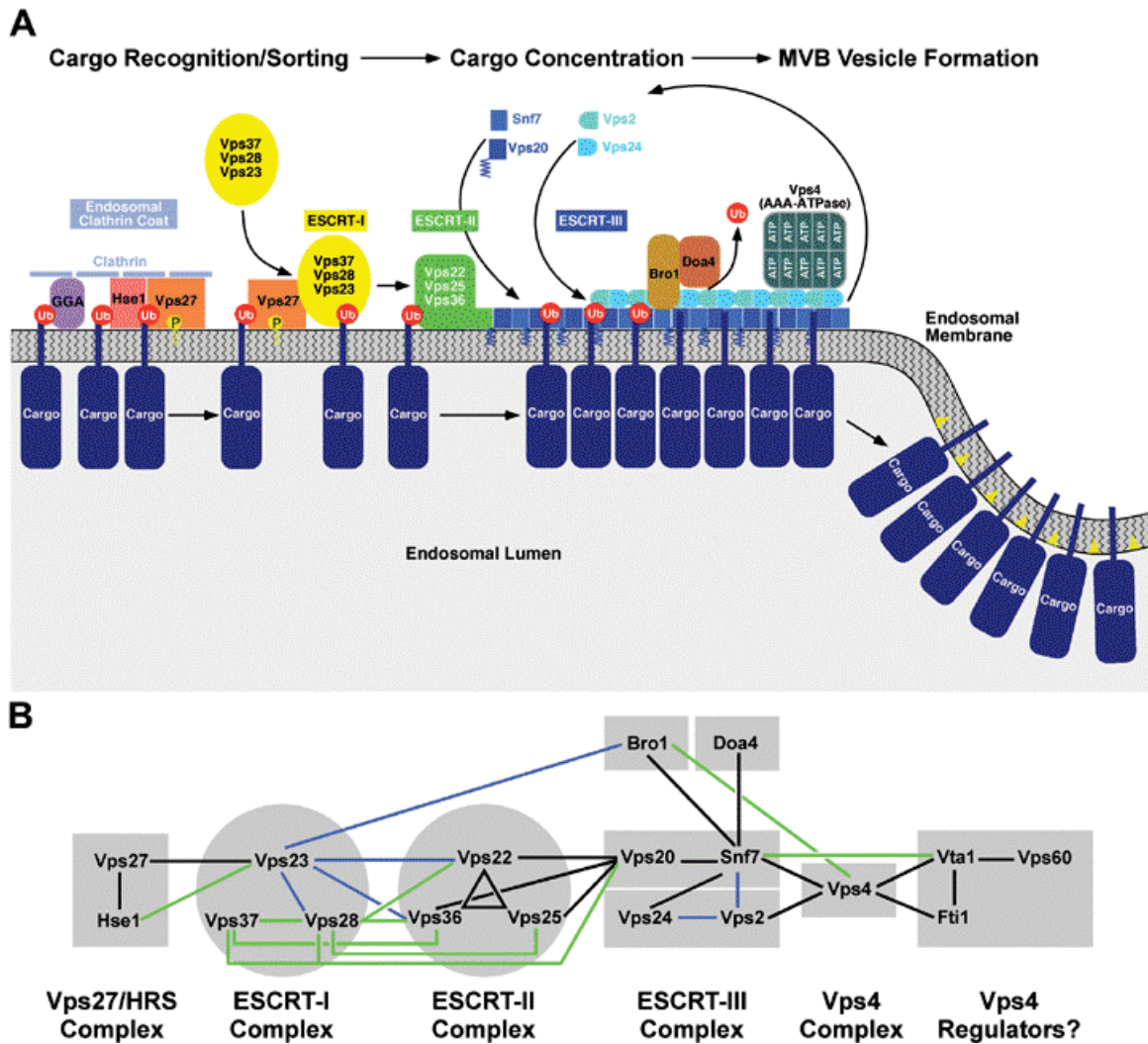


Figure 12 : Les complexes ESCRTs.

A. Le complexe *Vps27p/Hse1p* interagit avec le manteau plat de clathrine, le *PI(3)P* (en jaune) et le cargo ubiquitiné. *Vps27p* recrute *ESCRT-I* du cytoplasme à l'endosome et *ESCRT-I* interagit avec le cargo. Puis, *ESCRT-I* active *ESCRT-II*, qui initie l'oligomérisation de *Vps2*, *Vps24*, *Vps20*, *Snf7* conduisant à la formation du complexe *ESCRT-III*. *Bro1p* recrute *Doa4p* qui dé-ubiquitine le cargo. Enfin, l'ATPase *Vps4* dissocie les *ESCRTs* qui peuvent être réutilisés pour la formation d'une autre vésicule. L'invagination et la formation des vésicules du MVB pourraient être la conséquence d'une asymétrie locale dans la composition lipidique entre les deux couches de la membrane (triangles jaunes). *B.* Réseau d'interactions entre les *ESCRTs* d'après les études en double-hybride. En vert : interaction observée chez la levure. En bleu : interaction chez les mammifères. En noir : interactions observées chez la levure et les mammifères. D'après (Babst 2005)

L'étude de ces interactions a permis de mieux comprendre le processus, mais il semble maintenant crucial de connaître la dynamique de ces interactions ; par exemple, Bro1p interagit avec le complexe ESCRT I (Vps23p), ESCRT III (Snf7p) et Vps4p, mais on ne sait pas si ces interactions sont exclusives ou si elles peuvent être simultanées.

Enfin, un dernier Vps de classe E a été identifié dans le groupe de Stevens : Vps44p/ Nhx1p. Il a la particularité d'être le seul Vps de classe E à être trans-membranaire. C'est un échangeur de sodium/proton (de la famille NHE) localisé au MVB, sa fonction dans la formation des vésicules reste inconnue ; mais des expériences ont montré que le transport d'ions *via* Nhx1p est requis pour leur formation (Bowers et al. 2000; Bowers and Stevens 2005).

Les études conduites chez les eucaryotes supérieurs suggèrent que la fonction des ESCRTs y est similaire à celle décrite auparavant dans la levure. Par exemple, la déplétion de Tsg101 modifie la signalisation du de l'EGF en empêchant sa dégradation lysosomale (Babst 2005).

Au cours de mon travail de thèse (publication 1), j'ai étudié le recyclage de la perméase à uracile dans un contexte déficient pour la formation du MVB (*vps37A*). Les données de la littérature concernant le recyclage dans ce contexte seront exposées au chapitre III B.4..

II.C.3. La fusion avec le lysosome/vacuole

Dès 1965, Christian de Duve *et al* ont observé les lysosomes en microscopie électronique (De Duve and Wattiaux 1966). Ce compartiment au pH acide (4.8) contient des hydrolases et reçoit le matériel à dégrader issus des voies de sécrétion, d'endocytose et d'autophagie (cette dernière sera traitée au chapitre IV).

Quand la membrane de l'endosome tardif fusionne avec la membrane vacuolaire, ses vésicules internes sont déversées dans le lumen de la vacuole. Sous l'effet des protéases vacuolaires, les protéines contenues dans ces vésicules sont alors maturées (cas de certains enzymes vacuolaires), ou dégradées (cas de protéines provenant de l'appareil de Golgi, ou des protéines endocytées). Au contraire, les protéines des zones endosomales non invaginées se retrouvent sur la membrane vacuolaire comme les sous-unités de la v-ATPase.

La même machinerie, conservée de la levure à l'homme, intervient dans la fusion homotypique entre vacuoles, la fusion des MVBs et des vésicules de la voie AP3 avec la vacuole et la fusion des autophagosomes avec la vacuole (figure 13 A). Les mutants *vps* de classe C présentent des vacuoles très fragmentées résultant de leur impossibilité à conduire la fusion homotypique. Le complexe Vps Classe C / HOPS (Vps11p, Vps18p, Vps16p, Vps33p, Vps39p et Vam6p) fait partie des complexes de « tethering » décrits au chapitre II A.3.C. et intervient à l'étape de fusion avec la vacuole notamment.

La fusion à la vacuole est également contrôlée par un complexe de SNARES composé de Vam3p, Vti1p, Vam7p et Ykt6p et par la RAB GTPase Ypt7p. Le complexe Vps classe C interagit avec

Vam3p et Ypt7p. Vps39p/Vam6p et Vps41p sont des GEF. Vps39p stimule l'échange de nucléotides sur Ypt7p et on pense donc que le complexe HOPS serait un effecteur de Ypt7p (Wurmser et al. 2000 ; Bowers and Stevens 2005). Mon1p et Cez1p semblent aussi avoir un rôle dans la fusion à la vacuole. Mon1p interagit avec le HOPS et est requis pour l'attachement de la SNARE Vam3p (Wang et al. 2002; Wang et al. 2003).

La fusion homotypique des vacuoles a été reconstituée *in vitro* par le groupe de Wickner. Pour ce faire, des vacuoles issues de deux souches sont mélangées ; les premières sont délétées pour *PHO8* (phosphatase alcaline, ALP) et les autres n'ont pas d'activité protéasique (Haas et al. 1994). Pho8p est apportée à la vacuole par la voie AP3 (voir chapitre II B.3.a.) sous forme inactive ; elle est alors maturée sous forme active par les protéases et son activité peut être mesurée par un essai colorimétrique. Donc, si une fusion entre les vacuoles des deux types a lieu, une activité ALP est mesurée. De plus, la fusion peut être suivie au microscope. Grâce à cette approche, les étapes et les déterminants cellulaires nécessaires à la fusion ont pu être mis en évidence en utilisant des mutants.

La fusion est divisée en quatre étapes : l'amorçage (priming), l'attachement (tethering), l'arrimage stable (docking) et la fusion (Wickner 2002; Wang et al. 2002) (figure 13 B).

Au cours de l'amorçage où les vacuoles sont encore dispersées, l'ATP hydrolysé par Sec18p (homologue de NSF) et sa co-chaperonne Sec17p (a-SNAP) est nécessaire pour le désassemblage du complexe cis-SNAREs. Puis, l'attachement requiert Ypt7p activée et le HOPS. Le complexe HOPS active Ypt7p dont il est l'effecteur et se lie à la forme GTP de Ypt7p. Vam7p s'associe aussi au HOPS et à Ypt7p qui le lie aux membranes. Cette liaison entre le HOPS et le complexe SNARE se fait *via* Vps33p qui appartient à la famille des protéines MS (Munc18/Sec1) se liant aux SNAREs. Le complexe trans-SNAREs se forme. Au cours de cette étape, les vacuoles se rassemblent et accumulent les facteurs de fusion selon une série d'événements coopératifs hautement ordonnés et réversibles (Jun et al. 2006). Une étude récente montre que le HOPS se lie aux phosphoinositides (Stroupe et al. 2006). Le HOPS est donc un facteur central pour le processus de fusion en liant l'activation de la GTPase, l'assemblage du complexe SNAREs, la liaison aux phosphoinositides et au domaine PX de Vam7p. L'enrichissement des différentes protéines aux sites de fusion (vertices) serait contrôlée par des microdomaines lipidiques à la membrane vacuolaire. L'arrimage (docking) se traduit par une libération de calcium et fait intervenir Rho1p et Cdc42p. Enfin, la fusion entre les membranes peut avoir lieu de manière dépendante de Vac8p et le contenu des vacuoles est mélangé.

Comme détaillé dans ce chapitre, certaines protéines de membrane plasmique internalisées sont transportées jusqu'à la vacuole pour y être dégradées. Cependant, nombre d'entre elles sont triées au niveau endosomal pour être recyclées vers la membrane plasmique chez les mammifères ou chez la levure. Le recyclage fera l'objet du prochain chapitre.

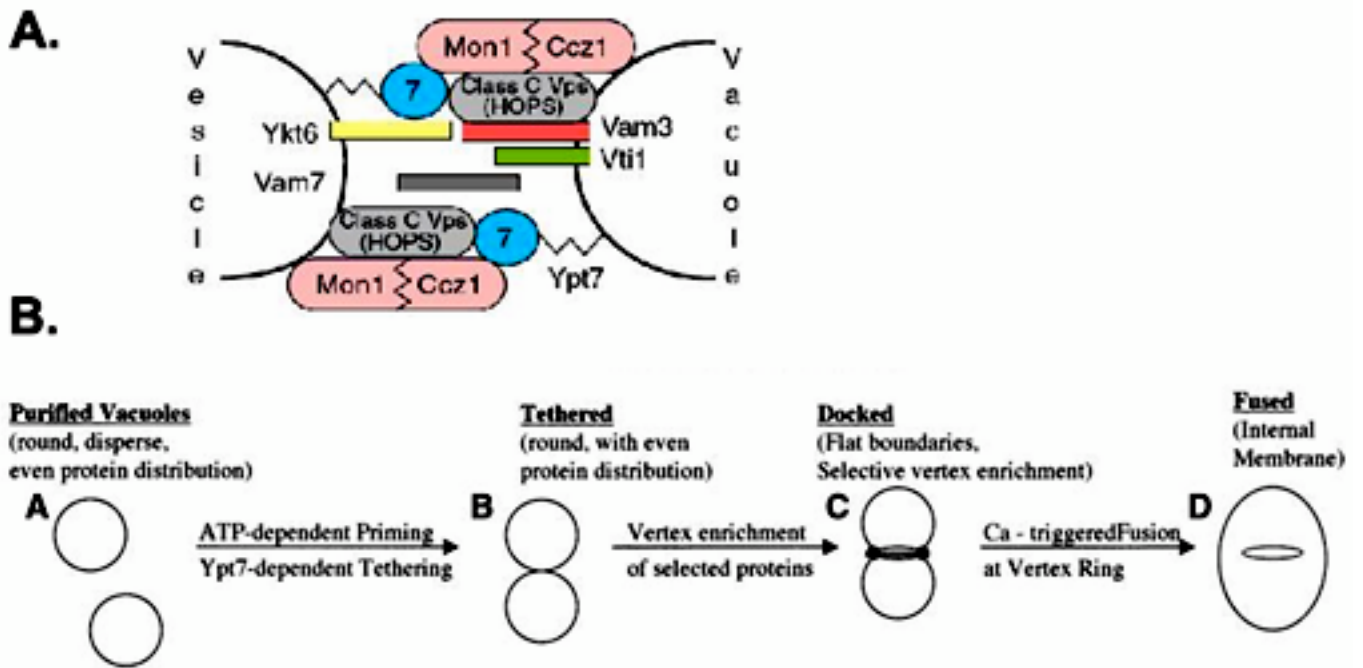


Figure 13 : Fusion à la vacuole.

A. Les protéines impliquées : Vam3p, Vam7p, Vti1p et Ykt6p font partie de la famille des SNARES. Ypt7p est une RAB GTPase. Le complexe HOPS est composé de Vps11, 16, 18 et 33p. Mon1p et Ccz1p interviennent également dans le processus. Adapté de (Klionsky 2005b). B. Les étapes : (A) l'amorçage requiert l'ATP et la dissociation des complexes SNARES. Les vacuoles sont dispersées. (B) l'attachement et l'arrimage sont initiés par Ypt7p et ses effecteurs (HOPS) qui conduisent à la formation du complexe SNARES au niveau des vertices (C) fusion au niveau des vertices initiée par un flux de calcium et mélange des contenus luminaux (D). Adapté de (Wickner 2002).

III. Le recyclage endocytique

Après son internalisation, une protéine de membrane plasmique est ciblée aux endosomes et peut soit être ciblée vers la vacuole pour y être dégradée, soit retourner vers la membrane plasmique ou, en d'autres termes, recycler (figure 1). Une précision mérite d'être apportée : nous traiterons ici uniquement du « recyclage endocytique » des cargos de membrane plasmique, principalement récepteurs et transporteurs et pas du recyclage des protéines entre les organites intracellulaires, comme Vps10p qui cycle entre Golgi et endosome tardif (voir chapitre II B.3.a.). Une confusion est parfois aussi faite entre voie de sécrétion indirecte (i.e. passant par les endosomes, voir chapitre II B.2. (Harsay and Schekman 2002)) et recyclage passant par les endosomes. Il se pourrait qu'une partie de la machinerie soit commune entre ces deux voies mais dans un cas la protéine est néosynthétisée alors que dans l'autre elle a déjà transitée par la membrane plasmique.

Le terme recyclage sera employé à la place de recyclage endocytique (i.e. endocytose suivie de recyclage) dans la suite du texte. Il fait intervenir la plupart des protéines de machinerie introduite au chapitre II.A..

Le recyclage semble exister dans tous les organismes eucaryotes de la levure à l'homme. Il est à noter qu'au cours de l'évolution, une complexification des organelles par lesquels passent les cargos qui recyclent s'est faite ; avec apparition notamment d'un endosome de recyclage.

III.A. Rôles et régulation du recyclage

Le recyclage a fait l'objet de nombreuses études dans les cellules de mammifères et dans une moindre mesure chez la levure; ses rôles multiples seront présentés dans une première partie.

III.A.1. Rôle économique

Le recyclage joue un rôle «économique» puisqu'il permet à un récepteur de servir plusieurs fois dans le cycle capture extracellulaire d'un ligand/libération intracellulaire (figure 14); comme l'illustre la capture d'un neurotransmetteur par un récepteur dans la fente synaptique et sa libération dans l'espace post-synaptique et la nouvelle capture d'un neurotransmetteur et ainsi de suite (Camilli and Takei 1996). Cela permet à la cellule d'augmenter énormément sa capacité de capture. Ainsi, la plupart du temps, après internalisation d'un couple récepteur-ligand, le ligand est détaché au niveau de l'endosome de tri suite à la baisse de pH et suit la voie de dégradation, alors que le récepteur retourne à la membrane plasmique et capture un autre ligand. Le premier exemple documenté date du début des années 80 avec le récepteur du LDL, une molécule unique pouvant recycler des centaines de

fois (Goldstein et al. 1985). En outre, on estime la proportion de récepteur à la transferrine recyclée à chaque cycle de capture d'ions ferriques à plus de 95% (Gruenberg and Maxfield 1995; Maxfield and McGraw 2004). Le coût énergétique du recyclage d'un récepteur pour la cellule versus sa néosynthèse est, *a priori*, bien moindre. De plus, le recyclage peut être très rapide en fonction de la voie suivie. Chez la levure, le récepteur de phéromones, Ste3p, suit aussi ce principe d'économie cellulaire. En effet, il capte l' α -facteur puis, après internalisation, il libère son ligand et recycle (Chen and Davis 2000) (voir chapitre III.C.1.a.).

Les lipides composant les membranes sont aussi recyclés. Ainsi, dans les fibroblastes, une quantité de membranes correspondant à 50% de la surface totale est utilisée toutes les heures pour former des vésicules d'endocytose (Steinman et al. 1976). Pour contre-balancer cette énorme perte de membrane plasmique, les membranes internalisées sont recyclées vers la membrane plasmique (Mayor et al. 1993). Dans cette étude, Mayor et al ont utilisé un marqueur lipidique (le C6-NBD-sphingomyelin) et ont montré qu'il recyclait en suivant une voie identique à celle du récepteur à la transferrine en terme de cinétique et de morphologie des compartiments traversés. Ce recyclage permet aussi le maintien de l'identité lipidique des organelles.

Dans la levure aussi, les membranes recyclent. En utilisant le FM4-64, colorant fluorescent qui se lie aux membranes, le groupe de Emr a observé qu'une partie des membranes endocytées était délivrée à la vacuole (Wendland et al. 1996). Cependant, en suivant le devenir de FM4-64 préalablement endocyté, Wiederkehr et al ont montré que 50% des membranes sont recyclées toutes les dix minutes. Ce recyclage des membranes fait intervenir des fusions vésiculaires nécessitant de l'ATP, comme l'indique l'absence de recyclage dans un mutant *sec18* thermosensible à température restrictive ou après ajout d'azoture de sodium (Wiederkehr et al. 2000).

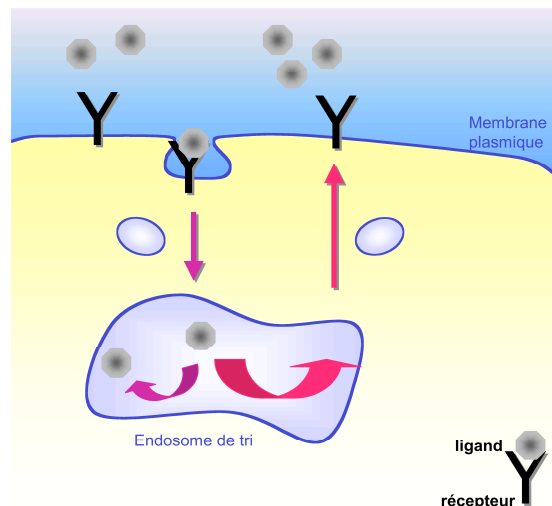


Figure 14 : Rôle économique du recyclage

Après capture d'un ligand, le couple formé par le récepteur et le ligand est internalisé et localisé au niveau de l'endosome précoce ou de tri. Le ligand est détaché sous l'influence de la diminution de pH et poursuit, la plupart du temps, son chemin sur la voie de dégradation. Au contraire, le récepteur est recyclé vers la membrane plasmique. Pour simplifier le schéma, uniquement l'endosome de tri ou précoce est représenté, mais le récepteur peut suivre différentes voies de recyclage via des organelles supplémentaires

III.A.2. Signalisation

De plus, la balance entre endocytose suivie de dégradation et recyclage endocytique permet de réguler finement la signalisation cellulaire. En effet, cela permet d'adapter l'expression des protéines membranaires à l'origine des voies de signalisation par une régulation positive ou négative en fonction des conditions du milieu. Avoir un réservoir de molécules pré-synthétisées et un mécanisme pour les envoyer rapidement à la membrane plasmique permet une régulation rapide en réponse à un stimulus. C'est le cas pour la chitine synthase chez la levure qui est stockée dans le chitosome et rapidement envoyée à la membrane plasmique en cas de dommage de la paroi (Valdivia and Schekman 2003)(voir chapitre III.C.1.b.). L'expression de Ste3p est, elle aussi, régulée par le milieu. En effet, en présence de ligand, la majorité du récepteur est recyclé alors qu'en son absence, après internalisation, le récepteur est dégradé (Chen and Davis 2000). De tels exemples sont aussi documentés chez les eucaryotes supérieurs. Par exemple, le transporteur de glucose GLUT4 est transloqué à la membrane plasmique en réponse à l'insuline afin de permettre l'entrée de glucose dans les cellules musculaires et les tissus gras (Royle and Murrell-Lagnado 2003; Rudich and Klip 2003). A partir d'un endosome périnucléaire spécialisé (insulin regulated compartment, IRC) où il est stocké et qui ne contient pas d'autres cargos du recyclage, GLUT4 traverse les mêmes endosomes de recyclage que le récepteur à la transferrine et rejoint la membrane plasmique. GLUT4 recyclerait selon deux modes : un constitutif et un régulé par le substrat.

Le trafic des récepteurs de tyrosine kinases des hormones de croissance, comme l'EGFR a aussi été étudié. A la surface cellulaire, la liaison de l'agoniste (EGF) conduit à la stimulation de cascades de signalisation de type ras/MAPK (mitogen activated protein kinase) et à l'internalisation rapide du récepteur. Puis, il semble que le récepteur à l'EGF soit principalement envoyé vers l'endosome tardif en présence d'EGF, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'une signalisation prolongée serait problématique pour la cellule. La balance entre dégradation endocytaire et recyclage est donc un moyen important pour la cellule pour moduler la signalisation. Dans ce contexte, on comprend facilement que des dysfonctionnements des voies d'endocytose et/ou de recyclage soient associés à certains cancers. Par exemple, une déficience de Tsg101, un membre de la machinerie ESCRT, provoque une activité prolongée de l'EGFR qui stimule la progression tumorale (Babst et al. 2000) (voir chapitre II.C.2.b. et III.E. et résultats).

III.A.3. Transcytose et polarisation cellulaire

Dans les cellules épithéliales, le recyclage intervient dans la relocalisation de récepteurs initialement ciblés à la membrane basolatérale puis internalisés et recyclés spécifiquement vers la membrane apicale, ou inversement (figure 15). Cette forme particulière de recyclage s'appelle transcytose (Gruenberg and Maxfield 1995). Ainsi, la transcytose permet la polarisation cellulaire et son maintien dans les cellules épithéliales et les neurones.

La membrane plasmique des cellules épithéliales est divisée en deux zones : la surface apicale côté lumen et la surface basolatérale qui est au contact des cellules adjacentes. Cette différence d'environnement explique pourquoi des protéines différentes doivent y être exprimées. Les protéines néosynthétisées passent l'ER et l'appareil de Golgi où elles sont triées vers la membrane apicale ou basolatérale. De là, elles peuvent être endocytées et dirigées vers l'autre membrane *via* les endosomes (Tuma and Hubbard 2003). Dans les cellules MDCK, les flux à travers les voies d'endocytose et de recyclage sont dix fois supérieurs à ceux à travers la voie de sécrétion ; montrant le rôle essentiel de la transcytose dans le maintien de la polarité cellulaire à l'équilibre (Mostov and Ter Beest 2003). De même, les hépatocytes et les entérocytes utilisent la transcytose pour re-localiser les protéines transmembranaires et les protéines à ancre GPI de la membrane basolatérale à la membrane apicale (Polishchuk et al., 2004). Dans le système immunitaire, les récepteurs des immunoglobulines traversent la cellule de la membrane basolatérale à la membrane apicale (Rojas and Apodaca 2002).

Dans les neurones, les cargos ayant pour destination finale l'axone sont d'abord adressés de manière aléatoire à la dendrite et à l'axone puis dans un 2^{ème} temps, ceux qui étaient mal localisés, sont recyclés vers l'axone (Horton and Ehlers 2003). C'est le cas de la SNARE VAMP2 (Sampo et al. 2003).

Enfin, le recyclage participe également aux changements morphologiques des cellules dans des conditions spécifiques. Par exemple, pendant le croisement, dans la levure, le récepteur Ste3p est relocalisé par recyclage au niveau du shmoo (protrusion cellulaire dirigée vers la cellule de signe sexuel opposé) suivant le gradient de phéromones (Chen and Davis 2000). En outre, dans les cellules en migration, le recyclage permet l'insertion spécifique de protéines au niveau du front de migration. Par exemple, le récepteur de la transferrine (TfR) et la SNARE VAMP3 sont endocytés et recyclés *via* l'endosome de recyclage vers le front de migration des fibroblastes et des macrophages respectivement (Hopkins et al. 1994; Bajno et al. 2000), (Mellman 2000). De même, le recyclage vers le front de migration permet la concentration des intégrines à ce niveau permettant le déplacement des cellules de lignées cancéreuses (Powelka et al. 2004).

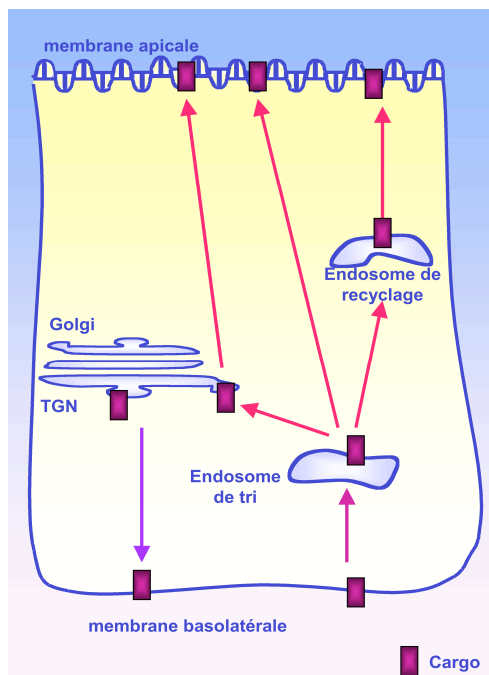


Figure 15 : Transcytose dans les cellules épithéliales

Exemple où la protéine est d'abord ciblée à la membrane apicale puis recyclée spécifiquement vers la membrane basolatérale en suivant l'une des voies qui seront traitées au chapitre III.B.2..

III.A.4. La présentation antigénique

Un autre exemple de recyclage spécialisé est la présentation antigénique dans le système immunitaire. Les protéines potentiellement antigéniques sont endocytées et dégradées partiellement. Certains peptides s'associent avec les MHC classe II au sein des vésicules intraluminales de MVBs spécialisés dans les cellules présentatrices d'antigènes (Kleijmeer et al. 2001; Murk et al. 2003). Le complexe ainsi formé est alors recyclé à la membrane plasmique où il est reconnu par les lymphocytes T. Le mécanisme conduisant à ce recyclage est encore sujet à débat.

III.B. Cargos modèles, machinerie et routes chez les Eucaryotes supérieurs

La découverte des premiers cargos recyclant datent du début des années 80 dans les cellules de mammifères avec le récepteur de la transferrine (Ciechanover et al. 1983), il a fallu attendre 15 ans de plus chez la levure. Parmi les cargos ayant permis de faire avancer les connaissances sur le recyclage, on peut citer, les récepteurs à la transferrine, TrfR ; à la LDL (low-density lipoprotein), LDLR ; aux enzymes lysosomales, CI-MPR (cation-independent mannose-6-phosphate receptor) ou encore les protéines membranaires furine, TGN38 (marqueur de l'appareil de Golgi) et GLUT4 (transporteur de glucose). Leurs voies de recyclage respectives sont représentées sur la figure 16.

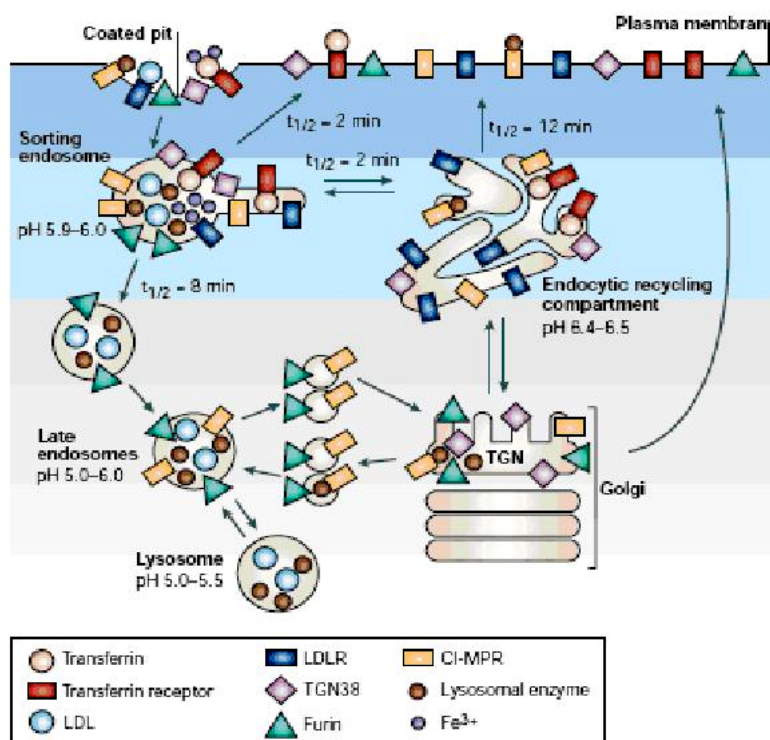


Figure 16 : Les voies de recyclage chez les eucaryotes supérieurs

Le récepteur à la transferrine se lie à la transferrine (où sont fixés deux ions Fe³⁺), LDLR (récepteur à la low-density lipoprotein) lie la LDL (low-density lipoprotein); et le récepteur du cation-indépendant mannose-6-phosphate (CI-MPR) lie enzymes lysosomales. Toutes ces protéines ainsi que les protéines transmembranaires, TGN38 et la furine, sont alors concentrées dans des puits recouverts de clathrine puis endocytées à l'endosome de tri. La plupart sont alors rapidement redirigées vers la membrane plasmique ou envoyées vers le compartiment endocytique de recyclage (ERC). Depuis l'endosome de recyclage, la très grande majorité du LDLR et du récepteur à la transferrine (où la transferrine reste fixée mais sans les deux ions Fe³⁺ libérés à pH acide) sont recyclés vers la membrane plasmique. La furine reste dans l'endosome de tri qui est mûri en endosome tardif puis circule vers l'appareil de Golgi. 80% du TGN38 internalisé et du CI-MPR retournent vers la surface cellulaire alors que 20% sont triés vers le TGN. Le CI-MPR et la furine peuvent cycliser entre TGN et endosomes tardifs, puis sont finalement réadressés du TGN vers la membrane plasmique. Les valeurs approximatives des $t_{1/2}$ des différentes étapes sont aussi données. Adapté de (Maxfield and McGraw 2004).

III.B.1. Les organites du recyclage

Comme indiqué précédemment, une plus grande diversité d'organites impliqués dans le recyclage semble exister chez les mammifères par rapport à la levure (figure 16). Ce chapitre est consacré à la définition des caractéristiques principales (distribution, morphologie, protéines associées) de chaque compartiment endosomal. Elles sont résumées dans la tableau 3 (Gruenberg and Maxfield 1995).

L'endosome précoce de levure correspond à deux organites bien distincts par leur fonction chez les mammifères : l'endosome de tri et l'endosome de recyclage (Sheff et al. 1999). Les endosomes précoces ou de tri sont tubulo-vésiculaires et reçoivent du matériel directement depuis les vésicules recouvertes de clathrine et contiennent la protéine EEA1. Les endosomes de recyclage ou compartiments endocytiques de recyclage (ERC) sont formés d'un réseau de tubules.

Chaque endosome possède une localisation subcellulaire (périnucléaire ou périphérique), une morphologie (tubulaire ou vésiculaire), un pH (de plus en plus acide quand on s'enfonce dans la voie d'endocytose) et des RABs différentes. Rab 4 et 5 sont situées à l'endosome précoce, Rab 7 et 9 sont à l'endosome tardif. Rab4 intervient dans le recyclage direct depuis l'endosome précoce. Rab9 intervient dans le retour entre endosomes tardif et Golgi. Enfin, l'année dernière, l'existence d'un nouvel organelle dit de « pré-tri » a été proposé (Lakadamyali et al. 2006).

Une définition fonctionnelle des endosomes existe aussi, basée sur le contenu en cargos en cinétique. Par exemple, les endosomes de recyclage ne contiennent pas les cargos comme la LDL qui doivent être dégradés mais contiennent la transferrine. Cependant, il n'existe pas de vrais marqueurs stables de ces organites qui sont dynamiques à cause du trafic permanent des vésicules et/ou de la maturation du compartiment lui-même. En effet, même les protéines dites résidentes d'un compartiment X à l'équilibre cyclent en permanence entre plusieurs compartiments. En outre, il est bien établi que l'endosome de tri est maturé en endosome tardif en quelques minutes.

Par conséquent, afin de définir l'identité d'un organelle, les auteurs se basent en général sur une collection de cargos et de protéines de machinerie qui y sont enrichis. De plus, une étude cinétique permet de s'assurer de l'identité ; par exemple, un organelle qui contient des low-density lipoprotein (LDL) après deux minutes d'incubation ne peut être qu'un endosome de tri.

Plus récemment, un niveau supplémentaire de complexité a été mis en évidence. Sur la base d'une étude cinétique de la co-localisation entre différentes RABs et le récepteur de la transferrine, le groupe de Zerial a proposé que les endosomes seraient composés d'une mosaïque de sous-domaines présentant différentes RABs (Sonnichsen et al. 2000; Zerial and McBride 2001) (voir paragraphe III.B.3.) (figure 17).

	distribution	Morphologie	pH luminal	GTPases	V-SNAREs	Cargos endocytiques y transitant	protéines périphériques / marqueurs
endosomes de tri	périphériques	Tubulo-vésiculaires	5.9-6,2	Arf6, Rab5	VAMP3	tous	EEA1
ERCs	périnucléaires ou en surface	tubulaires	6,5	Arf6, Rab4, Rab11	VAMP3	cargos en recyclage	
MVBs	partout dans le cytoplasme	multivésiculaires	5,5	Rab7, Rab9		certaines cargos en recyclage et cargos à dégrader	
endosomes tardifs	périnucléaires	structure en oignons	5,5	Rab7, Rab9		cargos à dégrader	LAMP

Tableau 3 : caractéristiques des endosomes chez les mammifères

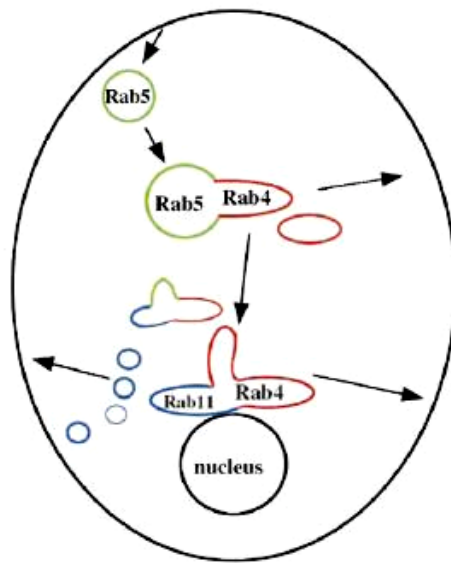


Figure 17 : les endosomes, mosaïque de domaines RAB

Etude de la co-localisation dynamique du récepteur à la transferrine le long de ses routes de recyclage avec les Rabs impliquées dans le recyclage : Rab4, 5, 11. Les flèche indique le trajet du récepteur à la transferrine. Il entre dans la cellule via des structures contenant Rab5 (endosome de tri). Puis, lors de son recyclage rapide, il est transféré vers des domaines membranaires de l'endosome de tri contenant Rab4. Alternativement, il transite par des structures positives pour Rab4 et Rab11, correspondant aux endosomes de recyclage et conduisant à son recyclage lent. Adapté de (Sonnichsen et al. 2000).

III.B.2. Les routes de recyclage :

De cette multiplicité des structures endosomales découle aussi une multiplicité des voies empruntées par les cargos du recyclage (figure 16).

Le mécanisme d'internalisation médiée par la clathrine a été décrit au chapitre II.C.1.f.. La plupart des cargos pour lesquels un recyclage a été démontré sont endocytés par cette voie. C'est le cas du récepteur de la transferrine dans les cellules CHO par exemple. Plus récemment, un recyclage de cargos internalisés par la voie cavéolae ou rafts a été décrit (Sharma et al. 2003).

Le récepteur à l'EGF est capable d'entrer dans la cellule par ces deux voies en fonction de la concentration en EGF (Sigismund et al. 2005), comme discuté au paragraphe II.C.1.e. et II.C.1.f.. Cependant, uniquement les récepteurs à l'EGF endocytés par la voie médiée par la clathrine semblent recycler (Simona Polo, communication personnelle). L'hypothèse retenue pour expliquer cette observation est que l'EGFR endocyté par la voie raft ou cavéolae dépendante est ubiquitiné, ce qui constitue un signal de dégradation actif.

La suite de la description se base sur des expériences faites sur des cargos entrant par la voie médiée par la clathrine.

Le 1^{er} tri a lieu au niveau de l'endosome précoce ou de tri ; certains cargos vont rester au niveau de l'endosome précoce qui sera mûri en endosome tardif (Stoorvogel et al. 1991) (Dunn and Maxfield 1992), d'autres retournent à la membrane plasmique, d'autres vont vers l'ERC.

Les vésicules d'endocytose fusionneraient ensemble et avec un endosome de tri pré-existant pendant 5 à 10 minutes. Ensuite, les endosomes de tri sont transloqués le long des microtubules, deviennent plus acides et acquièrent les propriétés des endosomes tardifs. Ce pH acide libère la majorité des ligands de leurs récepteurs. Les ligands restent dans le lumen de l'organite pendant sa maturation. Pendant cette phase de maturation, la majorité des récepteurs sont efficacement triés vers des zones tubulaires qui vont bourgeonner vers les autres organelles impliqués dans le recyclage ou la membrane plasmique (Maxfield and McGraw 2004).

Au cours de la voie la plus rapide ($t_{1/2}=1-7\text{min}$, en fonction des cargos et des approches expérimentales), le cargo cycle entre membrane plasmique et endosomes précoces directement. C'est le cas de 25% des lipides, de marqueurs en phase fluide et d'une partie du récepteur à la transferrine (Gruenberg and Maxfield 1995; Hao and Maxfield 2000). Les études menées dans les cellules CHO montrent que la transferrine reste liée à son récepteur après l'entrée dans l'endosome de tri et jusqu'au retour à la membrane plasmique. Les deux ions ferriques sont libérés dans l'endosome de tri (Sheff et al. 1999; Sheff et al. 2002).

De manière alternative, le cargo, comme le LDLR ou une partie du récepteur à la transferrine, peut transiter par l'endosome de recyclage, cette voie est plus lente ($t_{1/2}$ environ 15min). Il semble que l'ERC se déplace de la région périnucléaire à la surface cellulaire le long des microtubules.

D'autres escales sont possibles : de l'ERC, le cargo peut passer au TGN, c'est le cas d'une fraction du ci-MPR, de TGN38 ou de la toxine Shiga (Mallard et al. 1998; Mallet and Maxfield 1999).

Comme mentionné, certains cargos restent capturés pendant la formation des corps multivésiculaires à partir de l'endosome de tri et qui fusionnent ensuite rapidement avec les endosomes tardifs. A ce niveau, a lieu une seconde étape de tri : le cargo va vers le lysosome (enzymes lysosomales transportées par le ci-MPR) ou retourne vers l'appareil de Golgi puis la membrane plasmique, comme une partie du ci-MPR ou de la furine (Lin et al. 2004; Maxfield and McGraw 2004). L'étape de sortie du TGN semble plus lente et TGN38 et la furine sont donc trouvés majoritairement au TGN à l'équilibre.

Pour toutes les voies de recyclage décrites, il semble que l'étape de fusion à la membrane plasmique soit médiée par la même machinerie que la dernière étape de la voie d'exocytose, impliquant notamment le complexe Exocyste, conservé de la levure à l'homme (chapitre II.A.3.a.). Cependant, il semble exister différentes classes de vésicules de recyclage, même à partir d'un même compartiment endosomal. Par exemple, dans les cellules CHO, le récepteur à la transferrine et GLUT4 recyclent tous deux depuis l'endosome de tri jusqu'à la membrane plasmique directement, mais dans des vésicules se formant avec des cinétiques différentes (Lampson et al. 2001)

Enfin, il est important de noter que certains cargos sont capables d'emprunter différents itinéraires en fonction des conditions physiologiques, comme l'illustre le récepteur de la transferrine ou le CI-MPR pour lequel l'itinéraire est le plus complexe (Maxfield and McGraw 2004). De plus, dans les conditions où une voie est bloquée, une autre peut parfois être prise.

III.B.3. La machinerie

Comme les autres voies de trafic, le recyclage requiert une machinerie afin de recruter le cargo, former la vésicule et permettre sa fusion à chaque étape. Les familles de protéines intervenant dans ce mécanisme (manteaux, adaptateurs, complexes d'attachement, SNAREs et RABs) ont été décrites au paragraphe II.A.

Les GTPases des familles RABs et Arf ont un rôle central. En effet, plusieurs Rab (Rab4, Rab5 et Rab11) ainsi que leurs effecteurs interviennent pendant le recyclage (Zerial and McBride 2001) (figure 17). Ces RABs s'assemblent de manière dynamique aux organelles de recyclage. De plus, les GTPases et les ATPases assurent l'association et la dissociation des complexes effecteurs et des SNAREs et leur coordination temporelle pour la fusion des membranes. Rab5, enrichie sur les membranes de l'endosome de tri, permet le transport entre membrane plasmique et endosomes de tri et la fusion homotypique entre ces compartiments (Sonnichsen et al. 2000). Rab4 est impliquée dans la sortie de

l'endosome de tri vers la membrane plasmique ou l'ERC (McCaffrey et al. 2001). Parmi les effecteurs de Rab4/Rab5, on compte la Rabaptine-5 α et la Rabenosine-5, toutes deux essentielles au recyclage de la transferrine. La rabenosyne 5 contrôle le transport du cargo entre l'endosome de tri et l'ERC et interagit avec la protéine à domaine EH (voir chapitre II.C.1.c.), EHD1 (Naslavsky and Caplan 2005). La protéine humaine EHD1 et son orthologue chez *C. elegans* Rme1 présente un seul domaine EH en C terminal. La fonction de ces protéines semble conservée au cours de l'évolution (Grant et al. 2001; Lin et al. 2001; Wendland 2001) ; elles permettraient, comme les autres protéines de la famille EHD, de réguler la distribution des ERCs et la sortie des cargos vers le TGN ou la membrane plasmique. Cependant aucun homologue fonctionnel n'a été trouvé chez la levure malgré la présence de deux protéines ayant un domaine EH en C terminal (Irs4p et Tax4p) d'après le travail effectué au cours de cette thèse et présenté au chapitre II des résultats.

Rab11 localise à l'endosome de recyclage et permet, comme EHD1, la sortie des cargos vers le TGN ou la membrane plasmique. Une forme constitutivement inactive liée au GDP bloque le recyclage du récepteur à la transferrine (Ren et al. 1998). De plus, Rab11 régule la transcytose dans les cellules MDCK (Wang et al. 2000). Une revue récente résume l'implication des RABs dans le recyclage endocytique de l'EGFR (Ceresa 2006).

Les GTPases de la famille Arf semblent impliquées dans le recrutement des manteaux. Arf6 semble requise pour le transport du cargo entre l'ERC et la membrane plasmique (Donaldson 2003). Elle recrute l'exocyste au niveau des sites de recyclage polarisé dans les cellules épithéliales (Prigent et al. 2003).

Les RABs interagissent avec les microtubules et les filaments d'actine pour permettre ce déplacement. Les moteurs moléculaires et câbles intervenant dans le déplacement des vésicules et endosomes de recyclage ne seront pas traités en détails mais ont fait l'objet d'une revue récente (Soldati and Schliwa 2006). Dans les cellules animales, les transports « long courrier » sont assurés par les microtubules alors que les filaments d'actine interviennent dans les courts transports au niveau de la voie de recyclage et des autres voies. Le mouvement le long de ces câbles est dépendant de trois types de moteurs : les kinésines, les dynéines et les myosines. Les dynéines interviennent dans la localisation péri-nucléaire des endosomes ; alors que les kinésines permettent leur transport vers la surface cellulaire. L'un des effecteurs de Rab11 (Rab11-FIP2) interagit avec la myosine Vb qui permet le transport des vésicules le long des filaments d'actine entre l'ERC et la membrane plasmique. Arf6, connue pour être un régulateur du cytosquelette d'actine, participerait également à la régulation de ce transport (Powelka et al. 2004).

Concernant les manteaux, des données contradictoires sont disponibles. La clathrine et ses adaptateurs ainsi que COPI ne semblent pas requis pour le recyclage du récepteur à la transferrine dans les cellules non-polarisées (Maxfield and McGraw 2004). Les cargos qui recyclent ne semblent pas co-localiser

avec le manteau endosomal de clathrine, contrairement aux cargos qui seront invaginés dans les vésicules des MVBs (Bonifacino and Lippincott-Schwartz 2003). Pourtant, des études de Van Dam et al. suggèrent un rôle du couple clathrine-dynamine dans la formation des vésicules de recyclage du récepteur à la transferrine depuis l'ERC dans les cellules HeLa. Ils suggèrent également que le recyclage direct depuis l'endosome de tri est indépendant de ces acteurs mais requiert l'activité phosphatidylinositol 3-kinase (van Dam and Stoorvogel 2002; van Dam et al. 2002). De plus, dans les cellules épithéliales, l'adaptateur AP1 est requis pour le recyclage du récepteur à la transferrine et LDLR vers la membrane basolatérale (Gan et al. 2002). Ces résultats suggèrent que le rôle des manteaux et adaptateurs pourrait différer d'un type cellulaire à l'autre.

Il existe de nombreuses SNAREs et pourtant très peu semblent impliquées dans le recyclage. La v-SNARE VAMP3 (cellubrévine) localise à l'endosome de tri et intervient dans le recyclage du récepteur à la transferrine et de GLUT4 directement à la membrane plasmique (Maxfield and McGraw 2004). VAMP3 pourrait agir de concert avec VAMP4 pour le transport de TGN38 de l'ERC à l'appareil de Golgi.

La fusion à l'appareil de Golgi requiert aussi la présence des syntaxines (t-SNAREs) Syn6 et Syn16 au niveau de la membrane Golgienne et de Vti1a et Rab6a' (Mallard et al. 2002). Les homologues de levure Tlg1p, Tlg2p et Ypt6p sont impliqués dans cette même étape (chapitre III.C.2.).

Les nexines sont aussi impliquées dans la sélection des cargos, leur rôle au cours du recyclage sera traité dans le chapitre III.D.2..

Il est clair qu'on ne dispose pas encore du tableau complet des protéines impliquées dans le recyclage dans les eucaryotes supérieurs. D'autres études semblent nécessaires.

III.C. Cargos modèles, machinerie et routes chez la levure

Chez la levure, beaucoup moins de voies ont été décrites. De plus, seul l'endosome précoce (EE) a été décrit, l'endosome de recyclage ne semble pas exister.

L'un des 1^{ers} recyclage mis en évidence chez la levure est celui des membranes (voir chapitre III.A.1.) en utilisant le FM4-64 (Wiederkehr et al. 2000). Depuis, cet outil a permis de caractériser plusieurs mutants de recyclage (*rcy1Δ*, *gyp1Δ*, *vps33Δ*...) (figure 18).

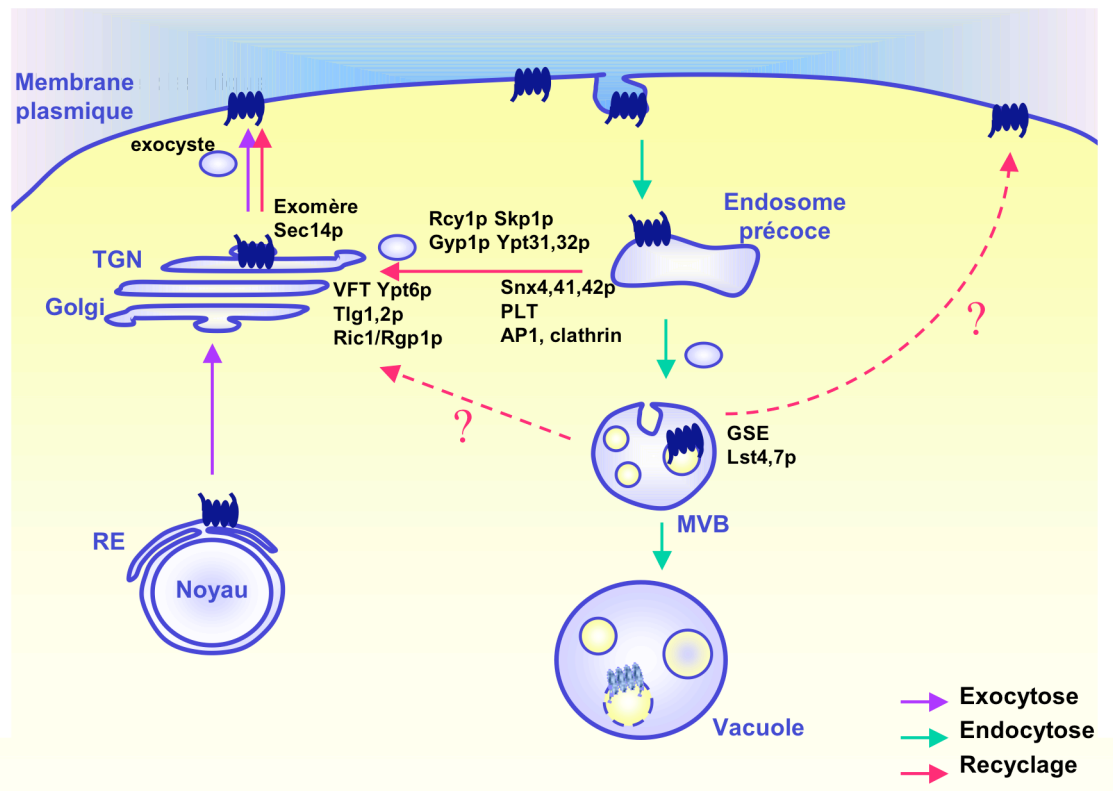


Figure 18 : Routes et machinerie de recyclage chez la levure.

Les flèches pleines en rose indiquent les voies de recyclage confirmées, via endosome précoce- Golgi -membrane plasmique. Les flèches en pointillés indiquent des recyclages proposés pour les perméases dans un contexte déficient pour les ESCRTs (voir chapitre III.E.). RE : réticulum endoplasmique, MVB : corps multivésiculaire ; PLT : translocases à phospholipides.

III.C.1. Routes et cargos

a. Recyclage de Ste3p et Ste6p

Comme mentionné précédemment, Ste3p, le récepteur de l' α facteur de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, est important pour le croisement. Il est endocyté selon deux modes, un mode constitutif suivi de dégradation et un mode induit par la phéromone suivi de son recyclage (Chen and Davis 2000, 2002). L'existence de ce recyclage a été suggérée par l'observation que la quantité de Ste3p à la membrane plasmique était plus importante dans des cellules traitées à l' α facteur, indépendamment de sa néosynthèse. Ce recyclage permet de réutiliser le récepteur (rôle économique, voir chapitre III.A.1.) et de le concentrer au shmoo (processus apparenté à la transcytose, voir chapitre III.A.3.), lieu où la néosynthèse est elle aussi dirigée. Cependant, la route suivie au cours de ce recyclage n'a pas été élucidée, il a été proposé que Ste3p recyclerait à partir d'un compartiment endosomal, dont la nature n'a pas été déterminée. On ne sait pas non plus si ce cargo transite *via* l'appareil de Golgi.

Le transporteur de l'a facteur à la membrane plasmique, Ste6p (famille des ABC transporteurs), est endocyté et dégradé de manière dépendante de l'ubiquitine. Il semble aussi capable de recycler (Losko et al. 2001). En utilisant alternativement ou simultanément des allèles thermosensibles de *sec1* (pour bloquer la fusion des vésicules de sécrétion) et *end4* (pour bloquer l'endocytose), Losko et al ont montré que Ste6p pouvait recycler à la membrane de façon indépendante de Sec1p. La route du recyclage d'un variant de Ste6p peu ubiquitiné et accumulé à la membrane plasmique a été récemment élucidée (Krsmanovic et al. 2005). Son recyclage n'est pas affecté dans des mutants déficients pour l'entrée dans le MVB (vps de classe E : *vps4Δ*, *vps27Δ*) ou la sortie de ce même compartiment (rétromère : *vps35Δ*) indiquant que Ste6p ne passe pas par ce compartiment. Au contraire, son recyclage est augmenté quand la voie d'endocytose est bloquée au niveau de l'endosome précoce (vps classe D : *pep12Δ*, *vps8Δ*, *vps21Δ*). De plus, son recyclage est bloqué dans des mutants de la fusion à l'appareil de Golgi (*ypt6Δ*), Ste6p traverse donc l'endosome précoce puis l'appareil de Golgi avant de rejoindre la membrane plasmique.

b. Recyclage de Chs1p et Chs3p

La chitine, composant majoritaire de la paroi cellulaire de levure, est synthétisée sous l'action d'enzymes nommées Chs de 1 à 3p. Celles-ci sont stockées dans une structure intra-cellulaire, le chitosome (Chuang and Schekman 1996; Ziman et al. 1996). Quand la chitine devient nécessaire à la jonction mère-fille, au site de bourgeonnement ou quand la paroi est endommagée par un traitement au calcofluor, la protéine intégrale de membrane Chs3p est relocalisée du chitosome vers la membrane plasmique (Holthuis et al. 1998a; Valdivia et al. 2002; Valdivia and Schekman 2003).

L'envoi spécifique de Chs3p au site de bourgeonnement n'est pas dépendant de sa néosynthèse mais dépend de son recyclage endocytique polarisé, comme montré en utilisant des mutants d'endocytose où cette localisation est perturbée (Chuang and Schekman 1996). Le stockage de Chs3p au chitosome est aussi dépendant du trafic endosomal.

Il est important de noter que les Chs sont exprimées de manière différentielle pendant le cycle cellulaire et que le maintien de leur localisation semble impliquer des mécanismes divergents. Par exemple, Chs2p est située à la jonction entre cellule mère et fille, de manière dépendante de sa sécrétion et après son internalisation, elle est dégradée. Au contraire, Chs3p et 1p sont recyclées. Cette observation implique la présence de signaux de tri différents sur les Chs.

La sensibilité au calcofluor permet de suivre la présence de Chitine à la paroi et des cribles basés sur ce principe permettent d'identifier des mutants de ce recyclage (Trautwein et al. 2006).

Différentes études ont permis de comprendre la route de recyclage suivie par Chs3p. Chs3p co-localise avec Ste2p (utilisée comme marqueur de l'endosome précoce) et le FM4-64 (en cinétique courte d'internalisation) mais pas avec Pep12p (marqueur de l'endosome tardif). De plus, Chs3p co-fractionne avec les marqueurs de l'endosome précoce et du TGN : Kex2p et Tlg1p. Ceci a permis de

montrer que le chitosome était un compartiment hybride de nature endosomale et Golgienne ou plus simplement que Chs3p était partitionnée entre ces deux organelles (Ziman et al. 1996; Valdivia et al. 2002). Il est difficile de différencier le TGN des endosomes précoces chez la levure en microscopie à fluorescence ou biochimiquement, il pourrait s'agir d'un même compartiment (Pelham 2002). Donc, Chs3p (et probablement Chs1p) sont retenues dans l'endosome précoce ou le TGN et recyclent quand elles deviennent nécessaires à la membrane plasmique de manière dépendante de Chs6p. La protéine G Rho1p et la kinase Pkc1p, activées en cas de dommage à la paroi, sont requises pour la redistribution de Chs3p vers la membrane plasmique (Valdivia and Schekman 2003). Une recherche de suppresseurs du défaut de recyclage de Chs3p dans *chs6Δ*, qui intervient dans la sortie du TGN, a permis de mettre en évidence une voie alternative de recyclage de Chs3p : directement à partir de l'endosome précoce, voie qui n'a jamais été confirmée pour d'autres cargos ou dans un contexte sauvage. Cette voie n'a lieu que dans un contexte déficient pour AP1 ou la clathrine et ne nécessite pas la signalisation médiée par Rho1p/Pkc1p, suggérant que la signalisation intervient à une étape plus tardive, à l'appareil de Golgi (Valdivia et al. 2002; Valdivia and Schekman 2003). Cette étude suggère un rôle de la clathrine dans la rétention de Chs3p dans l'endosome précoce et dans son trajet vers l'appareil de Golgi.

c. *Recyclage de Snc1p*

Snc1p est une v-SNARE, orthologue à la synaptobrevine/VAMP2, médiant la fusion des vésicules d'exocytose avec la membrane plasmique. Le recyclage de Snc1p a un rôle économique et semble contribuer à la polarité cellulaire. De manière intéressante, le maintien de cette polarité est dû au fait que la diffusion de Snc1p à la membrane plasmique de la levure est plus lente que son internalisation suivie de recyclage (Valdez-Taubas and Pelham 2003).

Comme Chs3p, sa route de recyclage a été largement documentée et on pense que les deux cargos recycleraient en suivant la même route à travers l'endosome précoce et le TGN.

A l'équilibre, Snc1p est majoritairement à la membrane plasmique dans une souche sauvage. La localisation de Snc1p n'est pas modifiée dans les mutants de trafic vers, à et à partir de l'endosome tardif (*pep12Δ*, *vps* de classe E, rétromère). Donc, Snc1p ne passe pas par l'endosome tardif mais passe par l'endosome précoce et le TGN (Lewis et al. 2000). Des passages très courts (5min) de cellules thermosensibles pour *sec14* (sortie du TGN) ou *sec6* (exocyste) à température restrictive montre une accumulation de Snc1p dans des vésicules intracellulaires. Ce laps de temps étant trop court pour une néosynthèse, il a pu être conclu de cette expérience que Snc1p recycle en permanence vers la membrane plasmique en passant par l'appareil de Golgi et de manière dépendante de l'exocyste (Lewis et al. 2000).

En conclusion de cette partie, une seule voie a été vraiment caractérisée dans la levure, entre endosome précoce, Golgi et membrane plasmique. Ceci différencie la levure des mammifères où une multiplicité de voies co-existent. Cependant, cette conclusion est à prendre avec précaution car d'autres cargos pourraient suivre d'autres voies, cela commence à émerger concernant les perméases dans un contexte déficient pour les ESCRTs (voir chapitre III.E.). Des études du recyclage sur d'autres cargos semblent donc nécessaires. Cela implique de mettre au point des protocoles permettant de dissocier les phases d'internalisation et de recyclage du cargo depuis l'intérieur de la cellule, ce qui n'est pas toujours possible.

III.C.2. La machinerie

Les protéines de la machinerie de recyclage chez la levure et leurs caractéristiques sont résumées dans la table 4. Leur lieu d'action est précisé sur la figure 18.

protéine ou complexe	famille	Cargo transporté	étape de trafic	références
Sec18p	ATPase	Fur4p, FM4-64	fusion vésiculaire	(Wiederkehr et al. 2000)
HOPS	facteurs d'attachement	FM4-64	Sortie de l'endosome précoce	(Bugnicourt et al. 2004)
Snx4, 41, 42p	nexines	Snc1p	tri vers la voie de recyclage à partir de l'EE	(Hettema et al. 2003)
AP1+clathrine	manteau et adaptateur	Chs3p	tri à l'EE	(Valdivia et al. 2002)
Dnf1, 2, 3p, Drs2p	P-ATPase, PLT	Snc1p, FM4-64	Formation de la vésicule à l'EE ou Golgi	(Hua et al. 2002; Furuta et al. 2007)
Rcy1p	protéine à F-box	Snc1p, FM4-64	transport EE vers Golgi et à travers l'appareil de Golgi	(Wiederkehr et al. 2000; Galan et al. 2001)
Skp1p	Sous-unité d'une E3 ligase	Snc1p, FM4-64	transport EE vers Golgi	(Galan et al. 2001)
Gyp1p (GAP de Ypt1p)	GAP	Snc1p, FM4-64	transport EE vers Golgi	(Lafourcade et al. 2004)
Ypt31, 32p	Ypt-Rab	Chs3p, Snc1p	Sortie de l'appareil de Golgi ou de l'EE	(Ortiz and Novick 2006; Furuta et al. 2007)
Ypt6p	Ypt-Rab	Snc1p, Gap1p (?), Ste6p	fusion à l'appareil de Golgi	(Siniosoglou et al. 2000; Nikko et al. 2003; Krsmanovic et al. 2005)
Ric1p/Rgp1p (GEFs de Ypt6p)	GEFs	Snc1p	fusion à l'appareil de Golgi	(Siniosoglou et al. 2000)
VFT (Vps51, 52, 53, 54p)	facteurs d'attachement	Snc1p	fusion à l'appareil de Golgi	(Siniosoglou and Pelham 2001)
Tlg1, 2p	SNAREs	Chs3p, Chs1p	fusion à l'appareil de Golgi	(Holthuis et al. 1998a; Lewis et al. 2000)
Exomère (Chs5p, Chs6p, Bch1p, Bud7p et Bch2p)	manteau	Chs3p	transport TGN vers PM	(Wang et al. 2006)
Sec14p	Protéine de transfert de PI	Snc1p	Sortie du TGN	(Lewis et al. 2000)
Rho1p, Pkc1p	signalisation	Chs3p	Sortie du TGN	(Valdivia and Schekman 2003)
Arf1p	RAB	Chs3p	Sortie du TGN	(Trautwein et al. 2006)
Exocyste	facteurs d'attachement	Snc1p, Fur4p	Fusion à la membrane plasmique	(Lewis et al. 2000; Bugnicourt et al. 2004)
Vam3p	SNARE	Gap1p (?)	Fusion à la vacuole	(Nikko et al. 2003)
Lst4p et Lst7p	inconnue	Gap1p	tri au LE vers la PM	(Rubio-Teixeira and Kaiser 2006)
GSE (Gtr1p, Gtr2p, Ybr077c, Ykr007w et Ltv1p)	GTPase	Gap1p	tri au LE vers la PM	(Gao and Kaiser 2006)
Ubp1p	Ubiquitine isopeptidase	Ste6p	?	(Schmitz et al. 2005)

Tableau 4 : La machinerie de recyclage chez la levure

EE : endosome précoce ; LE : endosome tardif ; PM : membrane plasmique ; PLT : translocases à phospholipides ; PI : phosphoinositides ; (?) indique que des données divergentes ont été publiées.

a. Machinerie commune aux cargos cyclant entre endosome précoce, Golgi et membrane plasmique

Ste6p, Snc1p et Chs3p recyclent selon cette voie et utilisent des machineries partiellement similaires.

Des nexines sont impliquées dans le choix de la voie suivie par Snc1p et Ste6p et sûrement d'autres cargos à l'endosome précoce (voir le chapitre suivant). Des vésicules de recyclage sont formées à l'endosome précoce, mais la machinerie de formation n'est pas totalement caractérisée. Les P-ATPases Dnf1, 2, 3p, étant des translocases à phospholipides putatives, pourraient y contribuer en générant l'asymétrie de membrane à l'endosome précoce. Un défaut de recyclage de Snc1p et du FM4-64 a été observé dans *dnf1Δdnf2Δdnf3Δ* (Hua et al. 2002).

La machinerie nécessaire à la fusion de la vésicule au TGN est la même dans tous les cas. Elle comprend la RAB Ypt6p et ses GEFs Ric1p et Rgp1p (Siniosoglou and Pelham 2001), le complexe VFT (Vps51p, 52p, 53p, 54p) (Conibear et al. 2003), les syntaxines Tlg1 et 2p (figure 19).

Dans les mutants *tlg1Δ* et *tlg2Δ*, Snc1p est dans des structures intracellulaires. Cette localisation pourrait être due à un défaut d'exocytose ou alternativement à un défaut de recyclage. En utilisant une forme bloquée à la membrane plasmique de Snc1p, il a été montré que Snc1p était normalement acheminée à la membrane plasmique dans *tlg1Δ* et *tlg2Δ*. Cela indique que Tlg1p et 2p ne sont pas requises pour l'exocytose de Snc1p mais pour son recyclage après endocytose. C'est également le cas pour Chs3p (Holthuis et al. 1998a).

Des cellules délétées pour *YPT6*, *RIC1* et *RGPI* présentent le même défaut de recyclage de Snc1p qui reste localisée dans des vésicules (Siniosoglou et al. 2000). Ces 3 protéines co-localisent avec Sec7p à l'appareil de Golgi, la localisation correcte de Ypt6p étant dépendante de ses GEFs. La GAP Gyp2p agirait en tant que régulateur négatif sur la GTPase Ypt6p au contraire de Rcy1p (voir paragraphe suivant) (Lafourcade et al. 2003). Donc, Ypt6p permettrait la fusion des vésicules à l'appareil de Golgi. Participe à cette étape un complexe d'attachement, le VFT (Vps Fifty Three), identifié par une recherche en spectrométrie de masse de protéines liant spécifiquement Ypt6p liée au GTP (Siniosoglou and Pelham 2001). Ce complexe est composé de Vps52p, Vps53p et Vps54p mais également de Vps51p identifiée plus tard (Siniosoglou and Pelham 2002). De manière intéressante, la délétion de chacun des composants de cette machinerie s'accompagne des mêmes défauts de recyclage de Snc1p mais également de défaut de retour de Vps10p au TGN depuis l'endosome tardif. Donc, la même machinerie intervient pour la fusion des vésicules issues des deux types d'endosomes avec le TGN. Un complexe équivalent nommé GARP intervient dans cette même étape dans les cellules de mammifères.

Après fusion de ces vésicules avec le TGN, les cargos doivent être incorporés au sein de vésicules destinées à la membrane plasmique. Pour tous les cargos, la formation de cette vésicule semble dépendante de la protéine Sec14p (Bankaitis et al. 1989; Lewis et al. 2000). Enfin, la fusion des vésicules de recyclage avec la membrane plasmique nécessite l'exocyste comme celle des vésicules de sécrétion (voir chapitre II.A.3.a.).

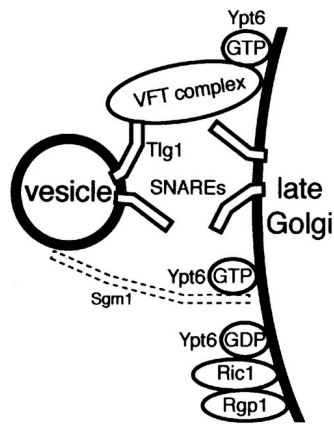


Figure 19 : Fusion de la vésicule au TGN

Ypt6p sous sa forme GTP recrute son effecteur, le VFT, qui interagit avec la SNARE Tlg1p et permet l'attachement de la vésicule. La fonction de Sgm1p dans le processus est inconnue. Adaptée de (Sinioussoglou and Pelham 2001).

b. Machineries spécifiques des cargos

De très nombreuses études ont été réalisées afin de comprendre le rôle de Chs5p et 6p sur le recyclage de Chs3p. On sait que ces protéines sont nécessaires à la sortie du TGN de Chs3p mais pas des autres cargos recyclés ou sécrétés. La réponse a été apportée par une étude récente montrant que Chs5p, Chs6p, Bch1p, Bud7p et Bch2p forme un nouveau type de manteau nommé exomère (voir chapitre II.A.4.) (Sancharjate and Schekman 2006; Wang et al. 2006). Ce manteau s'associe au cargo Chs3p et aux membranes du TGN grâce à l'interaction avec Arf1p et Sec7p (sa GEF). En effet, il a été montré que Bud7p, Bch1p, deux protéines redondantes pour le transport de Chs3p ainsi que Chs5p, et Chs6p se lient à Arf1p *via* leur C-terminal (Trautwein et al. 2006).

En outre, la myosine Myo2p permettrait le mouvement de Chs3p le long des câbles d'actine depuis le TGN (Santos and Snyder 1997). Récemment, les deux RABs Ypt31/32p, importantes pour la formation de vésicules de sécrétion au TGN, ont aussi été montrées comme importantes pour le recyclage de Chs3p (Ortiz and Novick 2006).

La machinerie de trafic de Ste6p, outre la machinerie de fusion au TGN, est moins caractérisée. De manière étonnante, il a été proposé que l'ubiquitine isopeptidase Ubp1p serait importante pour le recyclage de Ste6p, *via* la régulation du niveau d'ubiquitination d'acteurs de son recyclage. En effet, la sur-expression d'Ubp1p conduit à l'accumulation polarisée de Ste6p à la membrane plasmique. Les données présentées ne permettent cependant pas de conclure s'il s'agit d'un rôle sur le recyclage ou sur l'internalisation de la protéine. Cependant, une étude faite sur des variants non ubiquitinables de Ste6p appuierait l'hypothèse d'un rôle de Ubp1p dans le recyclage de Ste6p (Schmitz et al. 2005).

Ainsi, même si l'ubiquitine est principalement un signal d'endocytose et de dégradation, différentes études l'impliquent dans le recyclage. La protéine à F-box Rcy1p et son partenaire Skp1p au sein d'un complexe non-SCF (*Skp1*, *Cdc53/Cullin*, *F-box protein*) E3 ligase sont requis pour le recyclage de Snc1p (Wiederkehr et al. 2000; Galan et al. 2001). Leurs rôles dans ce recyclage commencent à être mieux compris car plusieurs études ont été menées afin de trouver les substrats de Rcy1p. La suppression de Gyp2p restaure le recyclage dans les cellules délétées pour *RCY1*. Gyp2p agirait en tant que régulateur négatif du recyclage, probablement en exerçant une régulation négative sur la GTPase Ypt6p. Ces résultats suggèrent que Rcy1p active la GTPase Ypt6p pendant le recyclage (Lafourcade et al. 2003). En outre, Rcy1p est un effecteur des Rabs redondantes Ypt31, 32p dans leur forme GTP (Chen et al. 2005). Ypt31p et Ypt32p contrôlent la localisation de Rcy1p à l'appareil de Golgi. Snc1p ne peut pas fusionner au TGN dans *rcy1Δ* et *ypt31Δypt32Δ*. Rcy1p interagit avec Snc1p.

En outre, la surexpression de Ypt31, 32p permet de supprimer les défauts d'un mutant *cdc50ts* (Furuta et al. 2007). Dans la levure, la famille de gènes *DNF/DRS2/CDC50* code des translocases à phospholipides putatives, connues pour être impliquées dans la génération de l'asymétrie des membranes et déjà discutées pour leur rôle dans le recyclage de Snc1p et du FM4-64. Rcy1p interagit avec Cdc50p-Drs2p. Les auteurs proposent que le complexe Ypt31p/32p-Rcy1p pourrait réguler l'action des translocases à phospholipides et permettre la formation de vésicules à l'endosome précoce et destinées à l'appareil de Golgi.

Deux travaux récents ont montré que Rav1p, une protéine qui régule l'assemblage de l'ATPase vacuolaire, était requise pour la sortie des cargos de l'endosome précoce vers le MVB (ou la maturation). Or, Skp1p, qui se lie à Rcy1p, se lie aussi à Rav1p (Sipos et al. 2004; Brace et al. 2006). L'étude de différents mutants de Skp1p a permis de suggérer que Skp1p permettrait de détacher Rav1p des membranes endosomales précoces et donc de diriger les cargos vers la dégradation. Donc, les deux partenaires de Skp1p contrôleraient chacun une voie à partir de l'endosome précoce : Rav1p, la dégradation et Rcy1p, le recyclage.

L'ensemble de ses travaux semble indiquer que Rcy1p aurait des rôles multiples, à travers ses divers partenaires, dans le trajet entre endosome et Golgi : formation de la vésicule à l'endosome précoce, fusion de la vésicule avec l'appareil de Golgi et formation de la vésicule destinée à la membrane plasmique. Des études supplémentaires seront nécessaires pour comprendre la dynamique de l'action de Rcy1p ainsi que son lien éventuel avec l'ubiquitine.

III.D. Les signaux de tri

Savoir si le recyclage est un processus actif ou une voie par défaut est une question importante. Si le recyclage d'un cargo nécessite son sauvetage le long de la voie d'endocytose, on devrait être capable d'identifier, en plus de la machinerie de recyclage, des signaux spécifiques sur les cargos.

Cependant, peu de données existent quant aux signaux régulant le recyclage chez la levure. Chez les mammifères, la plupart des études suggèrent que le recyclage serait une voie par défaut mais des données contradictoires cohabitent et il se pourrait qu'en fonction du cargo, des signaux actifs soient parfois nécessaires.

III.D.1. Rôle de la géométrie et des lipides

L'observation que la plupart des protéines solubles, comme les ligands détachés de leur récepteur à pH acide, sont délivrées à l'endosome tardif alors que la majorité des lipides et protéines membranaires sont recyclés vers la membrane plasmique a conduit Maxfield à proposer un modèle particulièrement intéressant où le tri serait basé sur la géométrie de l'endosome de tri. Puisque le ratio entre surface et volume de la partie tubulaire est plus grand que celui de la partie vésiculaire (70% du volume dans la partie vésiculaire et 80% de la surface dans les tubules), les tubules qui bourgeonnent pour former les vésicules de recyclage contiennent préférentiellement les lipides et protéines membranaires. Au contraire, les protéines solubles restent dans le domaine vésiculaire au volume plus important. Ainsi, en l'absence de signaux spécifiques, une protéine de membrane est plus susceptible de recycler que d'être dégradée, c'est donc la voie par défaut à cause de contraintes géométriques. En conséquence, l'envoi d'une protéine de membrane à endosome tardif mais non son recyclage requiert un signal spécifique (Maxfield and McGraw 2004). Ce signal est l'ubiquitination de la queue cytoplasmique dans la majorité des cas, comme pour l'EGFR ou Ste3p par exemple (voir chapitre II.C.2.a.).

Les lipides semblent également jouer un rôle dans ce tri. Sur la base de différentes études menées sur des protéines à ancre GPI, il a été suggéré que les microdomaines rafts contenant sphingolipides/cholestérol et les protéines associées soient stabilisés à l'endosome de tri lors de sa maturation en endosome tardif ; alors que les protéines contenues dans les domaines membranaires plus fluides recycleraient plus facilement (Maxfield and McGraw 2004). Chez la levure, aucune donnée n'est disponible sur le rôle des lipides et de la géométrie sur le recyclage.

Cependant, on ne comprend pas pourquoi parmi les protéines qui recyclent, certaines vont directement à la membrane plasmique alors que d'autres passent par l'ERC et parfois l'appareil de Golgi. On ne sait pas non plus pourquoi la plupart des cargos recyclent *via* au moins deux routes à des vitesses différentes.

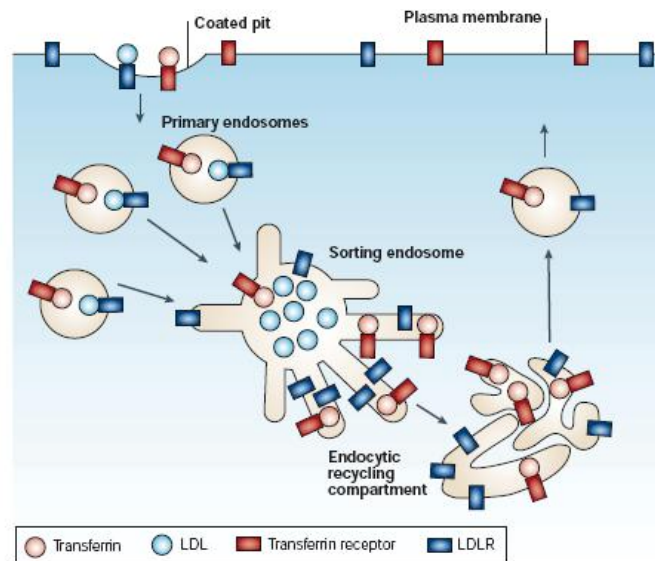


Figure 20 : Tri basé sur la géométrie de l'endosome de tri

Transferrine : rose ; Récepteur à la transferrine : rouge ; LDL (low-density lipoprotein) : bleu clair ; LDLR (récepteur à la low-density lipoprotein) : bleu. Les vésicules d'endocytose où se trouvent les couples récepteurs-ligands fusionnent avec les endosomes de tri (sorting endosomes). La LDL est libérée de son récepteur à pH acide ; elle devient soluble et reste dans la portion vésiculaire de l'endosome de tri de volume important. Au contraire, à cause de la géométrie, les récepteurs membranaires sont associés aux tubules où se forment les vésicules dirigées vers l'ERC (endocytic recycling compartment). Adapté de (Maxfield and McGraw 2004)

III.D.2. Rôle des nexines

En outre, une famille conservée de protéines, les nexines (voir chapitre II.A.5.) semble également impliquée dans le tri de la levure à l'homme. Ces protéines interagissent avec les phosphoinositides des membranes (via leur domaine PX), les cargos et la machinerie (Haft et al. 1998; Pelham 2002; Worby and Dixon 2002; Hettema et al. 2003)..

La 1^{ère} nexine identifiée, SNX1, interagit avec le récepteur à l'EGF au niveau de l'endosome précoce et contrôle sa répartition entre voies de recyclage et de dégradation (Kurten et al. 1996). Parmi les nexines, un sous groupe est caractérisé par une région coiled-coil en C-terminal qui lui conférerait une localisation endosomale : SNX1, 2, 4, 5 et 6 chez les mammifères ainsi que Vps5p et Snx4p chez la levure (Teasdale et al. 2001).

Plusieurs nexines permettent le tri des protéines des endosomes de tri (mammifères) ou tardifs (mammifères et levure) vers l'appareil de Golgi et font partie du complexe rétromère : Vps5p et Vps17p chez la levure, SNX1 et SNX2 dans les cellules de mammifères (Bowers and Stevens 2005; Bonifacino and Rojas 2006; Rojas et al. 2007). Cette étape a été particulièrement décrite pour les protéines Vps10p et Kex2p (levure) et Ci-MPR, TGN38, furine ou des toxines (mammifères) et est représentée sur la figure 21. Il existe une voie parallèle, dépendante de Btn2p et empruntée par Yif1p

(Kama et al. 2007). On ne sait pas si ces voies de l'endosome tardif vers le TGN sont réellement empruntées par des cargos recyclant vers la membrane plasmique dans la levure. En effet, un recyclage depuis ce compartiment a été uniquement observé pour des perméases mais dans un contexte génétique particulier (mutants *vps* de classe E, voir chapitre suivant) où le compartiment est modifié et où le rétromère semble incapable d'assurer le transport rétrograde (Bilodeau et al. 2002).

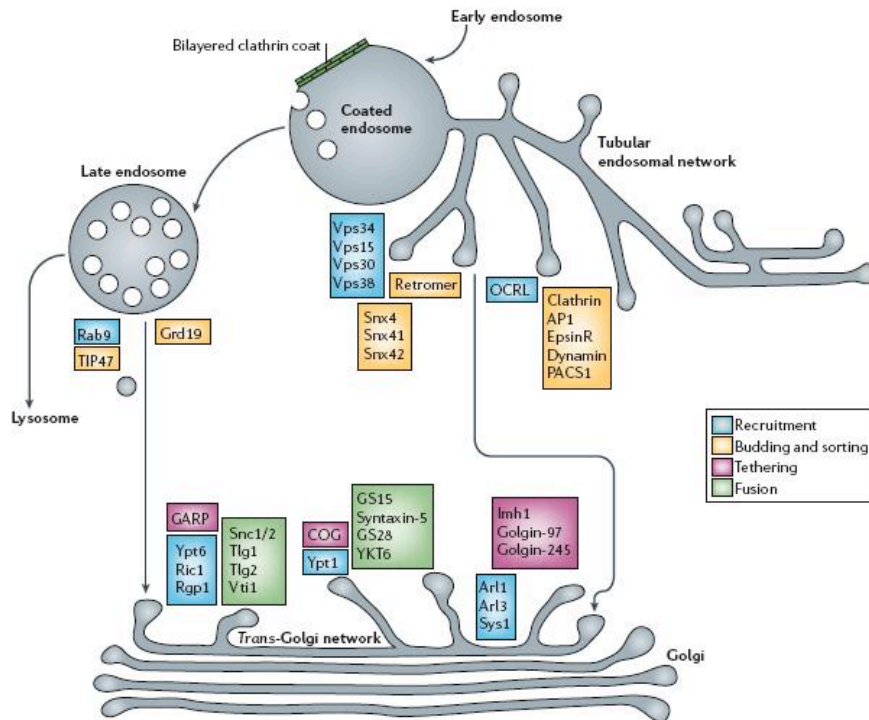


Figure 21 : Transport rétrograde des endosomes au TGN

Les cargos sont transportés du réseau tubulaire endosomal vers le TGN par plusieurs voies parallèles, la voie majoritaire est dépendante du rétromère qui est localisé à l'endosome de tri chez les mammifères et à l'endosome tardif chez la levure. Les composants de la machinerie de *S.cerevisiae* et des mammifères sont colorés en fonction de leur fonction : bleu, recrutement du cargo ; orange, bourgeonnement ; violet, attachement ; vert, fusion. Ils sont groupés sur la base des interactions physiques ou fonctionnelles. Adapté de (Bonifacino and Rojas 2006).

Chez la levure, le 1^{er} groupe de nexines est associé au rétromère et permet le retour au TGN depuis l'endosome tardif, un 2^{ème} groupe de nexines permet également le retour au TGN mais à partir de l'endosome précoce. En effet, les nexines Snx4p, Snx41p et Snx42p situées à l'endosome précoce permettent à Snc1p de recycler entre ce compartiment et l'appareil de Golgi avant de rejoindre la membrane plasmique. En leur absence, Snc1p est dégradée dans la vacuole, démontrant un processus actif de sauvetage contre la dégradation et non un rôle dans la fusion des vésicules (Hetteima et al. 2003). De plus, Snx4p se lie à Snc1p, cette liaison pourrait permettre de cibler Snc1p vers des régions de l'endosome précoce enrichies en PI3P destinées à être recyclées. Des résidus dans la queue

cytoplasmique près de son domaine trans-membranaire semble importants pour le recyclage de Snc1p (Lewis et al. 2000).

Ste6p semble aussi recycler selon un processus actif. La majorité de la protéine est normalement dégradée à la vacuole après ubiquitination. En utilisant des mutants où le trafic endosomal est bloqué à l'endosome précoce afin d'augmenter la proportion de Ste6p qui recycle, Krsmanovic a pu mettre en évidence des résidus acides jouant le rôle de signal de recyclage dans Ste6p (Krsmanovic et al. 2005). De plus, le recyclage de Ste6p est également inhibé dans un mutant *snx4Δ* (nexine).

Le recyclage de Chs3p ferait également intervenir un processus actif puisqu'il est dépendant de la cascade de signalisation Rho1p/Pck1p induite par le stress à la paroi cellulaire (Valdivia and Schekman 2003). Cependant, la manière dont Rho1 et Pck1p induisent le recyclage de Chs3p reste incomprise.

Au contraire de Ste6p, Chs3p et Snc1p pour lesquels le recyclage semble être un processus actif, le recyclage de Ste3p semble être la voie par défaut en présence d'a-facteur. En effet, alors que l'ubiquitination sur une lysine de la queue cytoplasmique de Ste3p est un pré-requis pour son endocytose constitutive ; celle-ci est dispensable pour l'internalisation du récepteur en présence de ligand et le recyclage qui suit (Chen and Davis 2000, 2002). Dans ce cas, l'internalisation de Ste3p en présence d'a-facteur est donc indépendante de l'ubiquitine et conduit à son recyclage par défaut ; ce qui n'est pas sans rappeler le cas de l'EGFR.

III.E. Recyclage dans les mutants ESCRTs

Comme mentionnée au chapitre II.C.2.b., l'invagination des cargos ubiquitinés au niveau des MVBs requiert l'action des complexes ESCRTs conservés de la levure à l'homme. Il a récemment été montré que cette machinerie était affectée dans certains cancers. En effet, leur perte de fonction conduirait à une présence plus importante de l'EGFR à la membrane plasmique et à une signalisation prolongée activant la progression tumorale (Babst et al. 2000). Des levures mutées dans les complexes ESCRT montrent à la fois une délocalisation des cargos normalement destinés à la lumière de la vacuole vers les membranes du compartiment classe E et de la vacuole ainsi qu'une accumulation à la membrane plasmique de divers transporteurs et récepteurs de manière similaire à l'EGFR. Parmi eux, on peut citer le récepteur de l'a-facteur, Ste3p qui est accumulé à la membrane plasmique dans des cellules délétées pour *VPS2* (Davis et al. 1993) ou pour *VPS8* (Luo and Chang 2000). Une forme mutante du récepteur de l'alpha-facteur, Ste2-3p, envoyée vers le compartiment lytique dans des cellules sauvages, s'accumule à la surface dans un mutant *vps23Δ* (Li et al. 1999). De plus, un mutant de l'ATPase de membrane plasmique Pma1-7, normalement envoyé à la vacuole, est trouvé à la membrane plasmique dans le mutant ESCRT *vps36Δ* et dans *vps8Δ* (bloquée plus tôt dans la voie) (Luo and Chang 2000). La perméase générale aux acides aminés, Gap1p, est stabilisée à la membrane

plasmique dans les cellules *bro1Δ* (Nikko et al. 2003). Depuis, un crible basé sur la sensibilité à l'ADCB drogue toxique transportée par Gap1p a permis de montrer que Gap1p s'accumulait à la membrane plasmique de la majorité des *vps* de classe E (Gao and Kaiser 2006; Rubio-Teixeira and Kaiser 2006). Trois autres perméases, Fur4p (perméase à uracile ; cette étude) et Can1p (perméase à arginine ; S. Emr, communication personnelle) ainsi que Sit1p (perméase à Ferrioxamine B ; (Lesuisse et al. 2005) ; N. Belgareh, M. Froissard, E. Lesuisse, communication personnelle) sont également accumulées à la membrane plasmique dans les mutants ESCRTs.

Comprendre pourquoi un défaut au niveau d'une machinerie endosomale tardive se répercute très en amont de la voie d'endocytose au niveau de la membrane plasmique n'est pas immédiat. Trois hypothèses principales ont été étudiées : sécrétion augmentée, blocage de l'internalisation ou recyclage accru des cargos internalisés. Les protocoles à mettre en place afin de trancher entre ces hypothèses ne sont pas toujours faciles et l'hypothèse valide pourrait différer d'un cargo à l'autre. Dans le cas de l'EGFR, les auteurs ont montré qu'il s'agirait d'un recyclage accru de la protéine. Lorsque j'ai commencé mon travail de thèse, aucun protocole ne permettait réellement de trancher entre les trois hypothèses pour les cargos pour lesquels le phénomène avait été observé chez la levure. Cette observation non expliquée (accumulation de transporteurs et de récepteurs à la membrane plasmique dans des levures déficientes pour la machinerie ESCRT) est donc à l'origine de mon projet de thèse. Afin de trancher entre les trois hypothèses, nous avons utilisé Fur4p comme protéine modèle et la levure comme organisme modèle ((Bugnicourt et al. 2004) et chapitre I des résultats). De plus, nous avons fait le pari que cette approche pourrait nous permettre de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et de la machinerie de recyclage, encore particulièrement mal connus chez la levure.

Depuis, il a été suggéré que, dans les cellules *bro1Δ*, la perméase Gap1p recyclerait de manière dépendante de Vam3p (SNARE de fusion à la vacuole, voir chapitre II.C.3.) indiquant que le recyclage pourrait se faire depuis la membrane de la vacuole. De manière intéressante Ypt6p a aussi été décrite comme essentielle pour ce retour de Gap1p à la membrane plasmique, semblant indiquer un transit par l'appareil de Golgi (Nikko et al. 2003). Deux études récentes ont mis en évidence que le tri de Gap1p vers la membrane plasmique dans le contexte génétique ESCRT- dépendait de Lst4p, Lst7p et d'un complexe GTPasique, le GSE, (Gao and Kaiser 2006; Rubio-Teixeira and Kaiser 2006; Seaman 2006). Cependant, ce trafic semble indépendant des facteurs de transit depuis l'endosome tardif vers et à travers l'appareil de Golgi (Rétromère, Ypt6p, Sec14p) ou vers la vacuole (Vam3p). Dès lors, ces différentes études semblent en désaccord quant à la voie empruntée par Gap1p sur la voie de recyclage : à travers l'appareil de Golgi ou pas ? depuis la membrane vacuolaire ou le compartiment classe E ? Nous avons également tenté de répondre à cette question pour Fur4p.

IV. L'autophagie

Il existe différentes voies de dégradation : la dégradation protéasomale des protéines poly-ubiquitinées cytoplasmiques à courte durée de vie ((Roos-Mattjus and Sistonen 2004) ; voir chapitre IIA.A.6.), la dégradation protéasique par le lysosome ou la vacuole des protéines néo-synthétisées (voir chapitre II.B.3.a.) ou endocytées (voir chapitre II.C.3.) et enfin l'autophagie qui sera traitée dans ce chapitre.

La macro-autophagie, qui sera désignée sous le terme d'autophagie ci-après, est une voie catabolique conservée chez tous les eucaryotes et aboutissant à la dégradation de constituants cellulaires par le lysosome ou la vacuole. La découverte des structures cellulaires de l'autophagie est contemporaine de celle du lysosome par de Duve (De Duve and Wattiaux 1966).

Cette voie joue de multiples rôles majeurs en situation physiologique et pathologique, les premiers mis en évidence furent la résistance à la carence nutritive ainsi que la dégradation des protéines à longue durée de vie. Pendant la carence, le développement ou la différenciation, les constituants cytoplasmiques sont englobés au hasard au sein de larges structures à double membrane formée *de novo* envoyées au lysosome où elles sont dégradées. Les cellules peuvent réguler l'activité catabolique de cette voie en fonction de leurs besoins. Ainsi, la présence de structures anormales : agrégats protéiques, pathogènes, organelles endommagés peut induire l'autophagie, mais les mécanismes de reconnaissance de ces structures restent largement inconnus. Dans la majorité des cas, l'autophagie est considérée comme non sélective. Certaines exceptions doivent ici être mentionnées. Tout d'abord, la levure possède une voie de biosynthèse très similaire à l'autophagie, nommée voie CVT (cytoplasm to vacuole) permettant le trafic de certaines peptidases vacuolaires, voie n'existant pas chez les eucaryotes supérieurs. De plus, une voie spécialisée, dite pexophagie, de dégradation des peroxysomes, existe. Ces différentes voies seront détaillées au chapitre IV.C.3. et IV.C.4..

Des avancées majeures dans la compréhension de cette voie ont été réalisées grâce à l'utilisation de la levure comme organisme modèle. Les gènes codant pour les protéines impliquées dans l'autophagie sont nommées *ATG* (autophagy related genes) et plusieurs sont conservées jusqu'aux mammifères (Klionsky et al. 2003).

IV.A. Les étapes

Des structures caractéristiques sont formées au cours de l'autophagie, comme visualisées en microscopie électronique (figure 22). Tout d'abord, de larges vésicules à double membrane (300-900nm) ou autophagosomes sont formées *de novo* dans le cytoplasme. Après fusion de ces vésicules avec la vacuole ou le lysosome, des vésicules à simple membrane ou corps d'autophagie sont déversées dans le lumen, pour revue voir (Reggiori and Klionsky 2005).

La biogenèse et la dégradation de ces structures peut être divisée en 6 étapes décrites ci-après : induction, expansion de la membrane, fermeture de la vésicule, attachement et fusion à la vacuole et enfin dégradation (figure 23) (pour revue, voir (Klionsky 2005b, 2005a; Reggiori and Klionsky 2005).

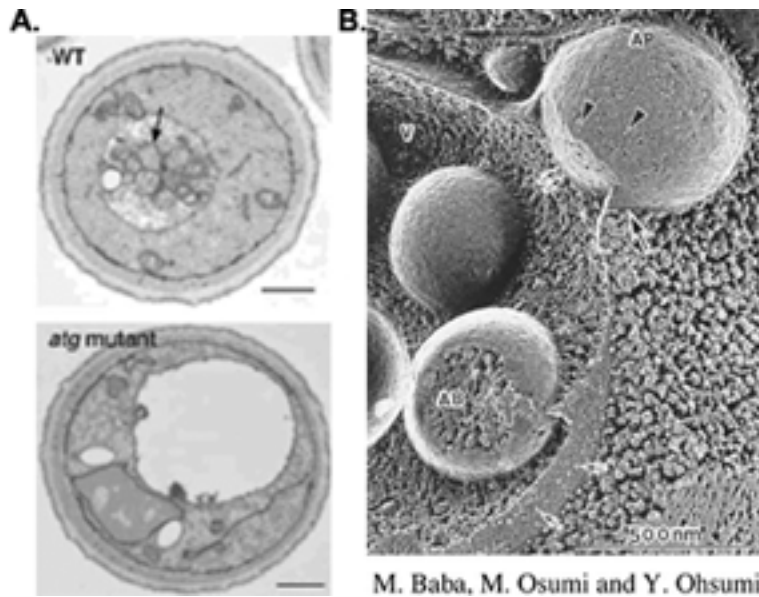


Figure 22 : Structures d'autophagie en microscopie électronique.

A. Corps d'autophagie dans les vacuoles d'une souche de levure sauvage et d'un mutant d'autophagie après carence azotée en présence de PMSF afin d'inhiber la dégradation des corps d'autophagie dans les vacuoles. Adapté de (Levine and Klionsky 2004). B. microscopie électronique à balayage. Autophagosome (A) fusionnant à la vacuole (V) et corps d'autophagie (AB) dans le lumen. Adapté du site web d'Ohsumi.

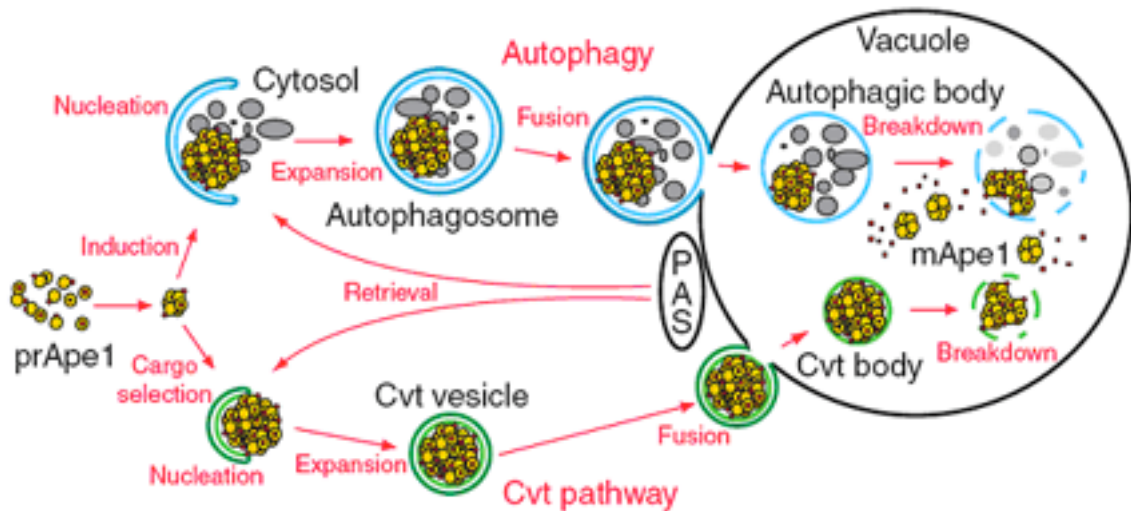


Figure 23 : Les étapes de l'autophagie et de la voie CVT chez la levure

Induction de l'autophagie par une carence azotée ou de la voie CVT par le complexe CVT incluant le précurseur prApeI. Nucléation de la vésicule à partir du PAS. Expansion des membranes et fermeture de la vésicule à double membrane ou autophagosome. Attachement et fusion à la vacuole ou au lysosome. Libération d'une vésicule à simple membrane ou corps d'autophagie dans le lumen. Dégradation de la vésicule d'autophagie et de ses constituants ou du corps CVT et maturation de mApeI. D'après (Klionsky 2005b).

IV.A.1. Signalisation

Dans la levure et les cellules mammifères, l'autophagie se produit à un niveau basal dans des conditions végétatives de croissance. Cela implique qu'il y ait un mécanisme pour « sentir les conditions du milieu » et réguler en conséquence le niveau d'autophagie. Dans la levure, les kinases Tor (Target of Rapamycin), Tor1p et 2p, sont au centre de cette signalisation. Elles inhibent l'autophagie en milieu riche (Noda and Ohsumi 1998; Carrera 2004). D'abord, la kinase Tor2p induit l'hyper-phosphorylation de la protéine Atg13p (Funakoshi et al. 1997). La forme phosphorylée d'Atg13p a une affinité faible pour la kinase avec laquelle elle interagit, Atg1p. Cette interaction pourrait agir comme interrupteur (Kamada et al. 2000). Une carence ou l'ajout de rapamycine inhibe la voie Tor, activant la déphosphorylation de Atg13p qui interagit alors avec Atg1p et active la formation de vésicules d'autophagie. De plus, la cascade de signalisation Tor contrôle la phosphorylation de divers effecteurs (Tap42, Sit4, Ure2 et Gln3) qui régulent la transcription de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans l'autophagie, comme Atg8p (Kirisako et al. 1999; Reggiori and Klionsky 2002). Il semble que d'autres facteurs soient impliqués dans la régulation de l'autophagie, comme la protéine kinase A, Gcn2p et Snf1p (Klionsky 2005b).

Dans les cellules de mammifères, la voie TOR est régulée par une succession complexe d'événements. La PI3-kinase active la protéine kinase B (PKB/Akt) et la kinase 3-phosphoinositide-dépendant 1 (PDK1) qui inhibe l'autophagie (Meijer and Codogno 2004). PTEN, une phosphatase à phosphoinositides, est un régulateur positif de l'autophagie *via* son effet inhibiteur sur Akt/PKB. Le complexe TSC1-TSC2, inhibé par Akt, agit comme GAP sur la protéine GTPase Rheb. Rheb liée au GTP stimule la voie Tor. Ras intervient aussi dans cette régulation (Klionsky 2005b).

IV.A.2. Nucléation de la vésicule et PAS

L'inhibition de la voie Tor qui conduit à la nucléation d'une vésicule *de novo*, reste un processus très mal compris. On ignore comment les lipides et la machinerie sont recrutés en un même site, étape clef de la nucléation.

Dans la levure, il semble qu'une structure protéique, supposée non lipidique, unique nommée PAS (pre-autophagosomal structure) adjacente à la vacuole soit primordiale pour cette étape. En effet, la grande majorité des protéines impliquées dans l'autophagie localisent au moins temporairement à ce niveau (figure 24) (Suzuki et al. 2001; Noda et al. 2002). On ne sait pas comment les membranes y sont transportées et s'y associent mais l'étude de Atg8p et de Atg9p et 27p qui sont des protéines associées aux membranes ou transmembranaires respectivement ont donné quelques pistes (voir chapitre IV.B.3. et IV.B.5.). Il a été proposé que Atg9p marquerait les membranes à envoyer au PAS (Noda et al. 2000).

Parmi les protéines qui pourraient agir à cette étape de nucléation, on compte des protéines associées au PI3P : la PI3 kinase de classe III Vps34p ainsi que Vps15p, Atg6p (Vps30p, homologue de beclin-1) et Atg14p qui fonctionnent au PAS (voir chapitre IV.B.4.). Certaines protéines recrutées au PAS par le PI3P sont en interaction avec Atg1p, comme le Atg20p et 24p, ce qui pourrait lier l'induction et la nucléation.

Dans les cellules eucaryotes supérieures, le PAS ne semble pas exister. Les autophagosomes peuvent se former à différentes localisations dans le cytoplasme. Un modèle propose que les autophagosomes seraient formés à partir de « membranes d'isolation » décorées de Atg12, Atg5 et Atg16, nommées phagophore (Mizushima et al. 2001; Mizushima et al. 2002) et dont la formation requière l'activité PI3 kinase.

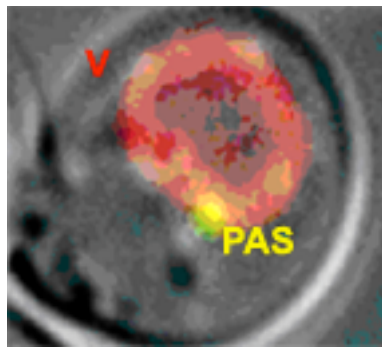


Figure 24 : Le PAS

PAS marqué avec GFP-Atg8p, membrane vacuolaire marquée au FM4-64. Adapté de (Suzuki et al. 2001).

IV.A.3. Elongation de la membrane

Il est à noter que le processus de formation de l'autophagosome diffère du processus classique de bourgeonnement d'une vésicule depuis un compartiment donneur. En effet, l'autophagosome se forme *de novo* et possède une double membrane. Les protéines générant la courbure de la membrane ainsi que les manteaux n'ont pas été décrits, il a été proposé que le système ubiquitin-like Atg12p-Atg5p-Atg16p, qui forme un complexe tétramérique de 350Kda, pourrait jouer un rôle de manteau (Kuma et al. 2002).

On ne connaît pas l'origine des membranes. L'élongation de la membrane pourrait reposer sur une fusion de vésicules d'origine inconnue (modèle de l'expansion vésiculaire). Alternativement, des bicouches lipidiques pourraient provenir de petits compartiments (modèle de l'apport de citernes) (Reggiori and Klionsky 2005; Reggiori 2006). Chez *S.cerevisiae*, plusieurs pistes ont été envisagées sur la base d'études génétiques : le réticulum endoplasmique (Ishihara et al. 2001), la mitochondrie, l'appareil de Golgi, l'endosome, pour revue, voir (Reggiori 2006).

L'origine de la membrane primaire (« isolation membrane ») ou phagophore chez les mammifères est également très incertaine, elle pourrait se former *de novo* ou dériver d'un organelle pré-existant. L'une

des difficultés pour en trouver l'origine est que les membranes composant les autophagosomes sont dépourvues de protéines trans-membranaires ; aucun marqueur d'organelle n'a pu y être trouvé (Fengsrud et al. 2000). Cette observation implique que les protéines trans-membranaires des membranes sources soient exclues avant la formation du phagophore. Plusieurs organelles pourraient participer à l'initiation de la vésicule : l'ER, l'appareil de Golgi ou la membrane plasmique, mais des données contradictoires ont été publiées sur chacun (Reggiori 2006). On peut également imaginer que l'autophagosome soit une mosaïque de domaines issus de ces différents organelles. Dans les stades plus tardifs de la biogenèse de l'autophagosome, l'endosome semble participer à l'apport de membrane.

Dans le cas de l'autophagie sélective (CVT), on pense que la présence du cargo stimulerait l'élongation de membrane (Shintani and Klionsky 2004b). Dans le cas de l'autophagie non sélective, ce serait des stimuli extracellulaires, nutriments ou cytokines, qui participeraient à cette étape.

La majorité des Atg semble impliquée dans cette étape d'élongation sans qu'on sache la plupart du temps quel est leur rôle précis. Chez tous les organismes, le système de conjugaison « ubiquitin-like » (Ubl) Atg12p-Atg5p se localise au phagophore et semble initier l'élongation de la membrane (Mizushima et al. 2003) (voir chapitre IV.B.3.). De même, la protéine Atg8p/LC3 s'associe aux membranes de l'autophagosome et semble jouer un rôle structural. Sa conjugaison au lipide PE (phosphatidylethanolamine) fait passer la protéine d'une forme soluble à une forme associée aux membranes (Ohsumi 2001) (voir chapitre IV.B.3.). Son absence conduit à la formation d'autophagosomes anormalement petits (Abeliovich et al. 2000).

IV.A.4. Fermeture de la vésicule et recyclage de la machinerie

Quand la membrane atteint une surface suffisante, un mécanisme inconnu doit indiquer qu'il faut la sceller afin de séparer les constituants à dégrader du reste du cytoplasme. De manière étonnante, cette fusion membranaire semble indépendante des SNAREs chez la levure.

C'est également à cette étape que la machinerie d'autophagie, parfois assimilée à un manteau, est décrochée de l'autophagosome afin de recycler dans le cytoplasme et de servir à la formation d'un nouvel autophagosome. Pour les protéines membranaires, comme Atg9p, un transport rétrograde actif a été mis en évidence (Noda et al. 2000; Reggiori et al. 2004b; Reggiori et al. 2005b) (chapitre IV.B.5.). La fraction de Atg8p associée au PE des membranes externes est recyclée par clivage protéolytique par la protéase Atg4p alors que la fraction associée à la membrane interne reste prisonnière (Kirisako et al. 1999) (chapitre IV.B.3.).

IV.A.5. Fusion à la vacuole

Le moment de la fusion de l'autophagosome avec la vacuole doit également être régulé. En effet, celle-ci ne peut avoir lieu qu'après fermeture de la vésicule et recyclage des protéines de la machinerie. Un senseur pourrait n'autoriser la fusion qu'après disparition du manteau putatif Atg12p, Atg5p, Atg16p ou d'Atg8-PE.

L'attachement et la fusion de l'autophagosome à la vacuole requièrent la même machinerie que la fusion de l'endosome tardif à ce même organelle : les SNAREs Vam3p, Vam7p, Vti1p et Ykt6p; les homologues NSF et SNAP : Sec17p et Sec18p; la RAB Ypt7p; le complexe Vps Classe C/HOPS et Ccz1p et Mon1p (voir chapitre II.C.3.) (Klionsky 2005b).

Chez les mammifères, RAB7, qui est impliquée dans la maturation de l'endosome tardif, semble important pour la fusion de l'autophagosome avec les organites de dégradation et son inactivation conduit à l'observation de vésicules autophagiques de taille anormalement grande (Gutierrez et al. 2004). Il a été proposé que l'autophagosome fusionnerait avec le système endosomal tardif avant maturation en autophagolysosome. Les microtubules et la dynéine sont impliqués dans cette étape.

IV.A.6. Dégradation du corps d'autophagie

La membrane externe de l'autophagosome fusionne avec la vacuole et y diffuse rapidement, une vésicule à simple membrane ou corps d'autophagie est alors libérée dans le lumen. Cette vésicule et ses constituants sont alors lysés sous l'action du pH acide, des protéinases A et B (Pep4p, Prb1p), de la lipase putative Atg15p et de la protéine intégrale de membrane Atg22p (Suriapranata et al. 2000) (Nakamura et al. 1997) (Teter et al. 2001). Atg22p est apportée à la membrane vacuolaire par la voie MVB mais de manière indépendante de l'ubiquitine. Il est maintenant clair que l'ensemble de la machinerie de dégradation des corps d'autophagie participe aussi à la dégradation des vésicules CVT, des corps de pexophagie, des vésicules issues de la voie ALP et des vésicules des MVBs (Epple et al. 2003).

Les macromolécules résultant de cette dégradation sont alors recyclées afin de participer aux fonctions essentielles à la viabilité en milieu carencé. Au contraire, les peptidases vacuolaires apportées à la vacuole par la voie CVT sont maturées et deviennent actives.

IV.B. La machinerie

Si le processus d'autophagie est connu depuis plus de quarante ans, pendant longtemps, sa description était basée sur des observations morphologiques. Dans les 15 dernières années, des cribles génétiques chez *S.cerevisiae* ont permis l'identification de 25 mutants *atg* (ou mutants d'autophagie) et de mutants altérant l'ensemble des voies de dégradation vacuolaire (Tsukada et al. 1993). L'ensemble de ces protéines et leurs propriétés sont reprises dans le tableau 5. Il est à noter que la majorité des Atg est mentionnée comme intervenant dans la phase de formation (nucléation, expansion) mais leur fonction moléculaire reste souvent floue.

La quasi-totalité des Atg sont cytoplasmiques et peuvent s'associer périphériquement aux membranes et localiser au PAS, centre organisateur de l'autophagie. Les exceptions, protéines membranaires, seront traitées au paragraphe IV.B.5..

Enfin, à ce niveau, il est important de rappeler que l'autophagie se distingue des autres voies de trafic par l'absence des grandes familles de protéines (RAB, Snares...) et de manteaux entourant la vésicule. La machinerie spécifique à la voie CVT et à la pexophagie sera traitée dans les parties correspondantes (chapitres IV.C.2. et IV.C.3.). Les protéines identifiées chez les eucaryotes supérieurs seront présentées au chapitre IV.B.6.. Beaucoup d'éléments ont déjà été abordés lors du paragraphe précédent, le but de cette partie est donc de se focaliser autour des complexes protéiques intervenant dans l'autophagie sur la base du schéma de la figure 25.

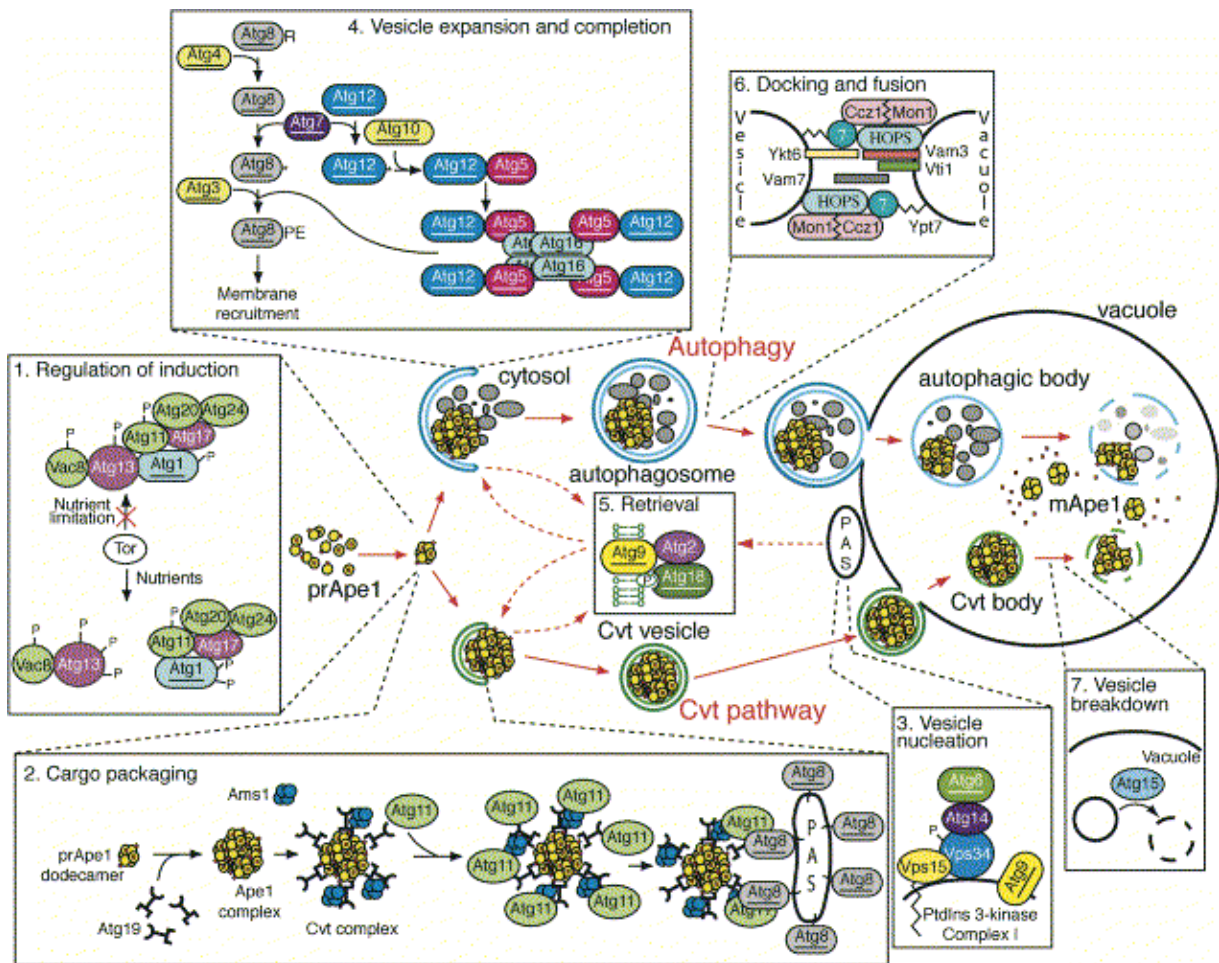


Figure 25 : Machinerie et étapes de la voie CVT et de la voie d'Autophagie

La machinerie intervenant à chaque étape est rassemblée ici. Les protéines ayant des orthologues fonctionnels chez les eucaryotes supérieurs apparaissent soulignées. Les protéines dans des ellipses vertes ne sont requises que pour la voie CVT, celles violettes n'interviennent que dans l'autophagie. **1. Régulation de l'induction.** La carence inactive la kinase Tor et l'hypo-phosphorylation de Atg13p qui devient très affin pour Atg1p. Atg1p contrôle la conversion entre voie CVT et autophagie. **2. Empaquetage du Cargo.** La plupart des complexes sont communs aux deux voies sauf pour cette étape de « préparation » du complexe CVT où Ape1p organisée en oligomères et Ams1p se lie à leur récepteur Atg19p qui se fixe alors à Atg11p et emmène l'ensemble au PAS où Atg19p interagit avec Atg8p qui participe à la formation de la vésicule. **3. Nucléation de la Vésicule.** La kinase à PI3P, Vps34p, fait partie d'un complexe qui génère du PI3P au PAS. **4. Expansion de la Vésicule.** Cette étape fait intervenir les deux systèmes de conjugaison « ubiquitin-like » (Ubl). Atg8p est modifiée par la protéase Atg4p puis conjuguée au PE et recrutée au PAS. L'E1 Atg7p est requise pour l'activation des deux Ubl Atg8p et Atg12p. Atg3p et Atg10p sont les E2 respectives. Atg12p se lie alors à Atg5p puis à Atg16p qui s'oligomérisent, permettant ainsi la formation d'un complexe multimérique. **5. Recyclage de la machinerie.** Les Atg associées périphériquement aux membranes de la vésicule se détachent après sa fermeture. Le sauvetage de Atg9p qui est trans-membranaire requiert l'action de Atg2p et Atg18p. Atg8-PE située à la membrane externe est clivée. **6. Attachement et fusion.** La machinerie de fusion de la vésicule CVT et de l'autophagosome avec la vacuole est commune à celle de l'endosome tardif avec la vacuole. **7. Dégradation de la vésicule.** La dégradation des corps CVT et d'autophagie fait intervenir la lipase putative Atg15p. D'après (Levine and Klionsky 2004).

Protéine S.c.	type de protéine	rôle	étape	processus	Interaction avec autres Atg	orthologue mammifère
Atg1p	kinase à sérine/thréonine	cible inconnue	induction	CVT, PEX, ATG	Atg13p, Atg11p, Atg17p	ULK1
Atg13p	Phosphoprotéine	module l'activité de Atg1p	Induction	ATG	Atg1p, Atg17p, Vac8p	
Atg2p		recyclage de Atg9p	Formation	CVT, PEX, ATG	Atg18p, Atg9p	Atg2
Atg3p	famille des E2	conjugaison d'Atg8p	formation	CVT, PEX, ATG	Atg7p, Atg8p, Atg12p	Atg3
Atg4p	protéase à cystéines	Modifie Atg8p et Atg8-PE	formation	CVT, PEX, ATG	Atg8p	Atg4A et B
Atg5p		conjugaison à Atg12p	formation	CVT, PEX, ATG	Atg12p, Atg16p	Atg5
Atg6p (Vps30p)		complexe de synthèse du PI3P	formation	CVT, PEX, ATG	Atg14p, Vps15p, Vps34p	Beclin-1
Atg7p	famille des E1	conjugaison d'Atg8p et Atg12p	formation	CVT, PEX, ATG	Atg3p, Atg8p, Atg12p	Atg7
Atg8p	protéine Ubiquitine-"like"	Conjugué au PE, contrôle la taille de l'autophagosome	formation	CVT, PEX, ATG	Atg3p, Atg4p, Atg7p, Atg19p	MAP-LC3, GATE16, GABARAP
Atg9p	protéine trans-membranaire	marqueur des membranes de l'autophagosome	formation	CVT, PEX, ATG	Atg2p, Atg18p, Atg23p	Atg9
Atg10p	famille des E2	conjugaison d'Atg12p	formation	CVT, PEX, ATG	Atg12p	Atg10
Atg11p	Protéine à Coiled-coil	protéine de transport et organisation du PAS, interagit avec complexe CVT	formation	CVT, PEX, (ATG)	Atg1p, Atg13p, Apt17p, Atg20p, Atg19p, Vac8p	
Atg12p	protéine ubiquitine-"like"		formation	CVT, PEX, ATG	Atg3p, Atg5p, Atg7p, Atg10p, Atg16p, Atg17p	Atg12
Atg14p		complexe de synthèse du PI3P	formation	CVT, PEX, ATG	Atg6p, Vps15p, Vps34p	
Atg16p	Protéine à Coiled-coil	s'associe avec Atg12p-Atg5p	formation	ATG, PEX	Atg5p, Atg12p, Atg16p	Atg16L
Atg17p		module l'activité d'Atg1p	formation	ATG	Atg1p, Atg13p, Atg11p, Atg12p, Atg24p	
Atg18p		s'associe au PI3P à la vacuole, recyclage d'Atg9p	formation	CVT, PEX, ATG	Atg2p, Atg9p	
Atg19p		récepteur des cargos CVT	formation	CVT	Atg8p, Atg11p	
Atg20p (Snx42p)	nexine	s'associe au PI3P	formation	CVT, PEX	Atg24p, Atg17p	
Atg21p		s'associe au PI3P	formation	CVT		
Atg23p	Protéine périphérique de membrane	Permet le trafic d'Atg9p de la mitochondrie au PAS	formation	CVT	Atg9p	
Atg24p (Snx4p)	nexine	s'associe au PI3P	formation	CVT, PEX	Atg20p, Atg1p	
Atg27p		transport d'Atg9p	formation	CVT, PEX		
Tlg1p -Tlg2p	vSNARE tSNARE		formation	CVT		
Vps45p	homologue de Sec1p		formation	CVT		
Sec12,16,23,24p		Facteurs de sécrétion précoce	formation	ATG		
Trs85p	Facteur d'attachement		formation	CVT, PEX, ATG		
Vps15p,Vps34p	kinases	complexe de synthèse du PI3P	formation	CVT, PEX, ATG	Atg14p, Atg6p	
VFT	complexe d'attachement	(Vps51, 52, 53, 54p) requis pour transport d'Atg9p au PAS	formation	CVT		
Vac8p	répétition armadillo	Marque la jonction nucléo-vacuolaire	formation	CVT, PEX, ATG	Atg13p	
Sec17-Sec18p	SNAP et NSF ATPase		fusion	CVT, PEX, ATG		SNAP NSF
HOPS	complexe d'attachement	(Vps11, 16, 18, 33, 39, 41)	fusion	CVT		Vps classeC
Vam3p	tSNARE		fusion	CVT		syntaxin
Ypt7p	RAB-Ypt-GTPase		fusion	CVT		RAB7
Ccz1p, Mon1p	Facteur d'attachement		fusion	CVT, PEX, ATG		
Vam6,Ykt7,Vti1p	vSNAREs de vacuole		fusion	CVT, PEX, ATG		
Atg15p	Lipase putative	Située dans le lumen vacuolaire	dégradation	CVT, PEX, ATG		
Atg22p	perméase	protéine intégrale de membrane	dégradation	CVT, PEX, ATG		
Pep4p, Prb1p	Protéinases A et B		dégradation	CVT, PEX, ATG		

Tableau 5 : Machinerie de l'autophagie et des processus similaires.

S.c. : Saccharomyces cerevisiae ; () : indique que la délétion n'inhibe que partiellement la voie. ATG : autophagie ; CVT : cytoplasme vers vacuole ; PEX : pexophagie. Formation : nucléation et expansion de l'autophagosome. Fusion : de l'autophagosome à la vacuole. Dégradation : du corps d'autophagie.

IV.B.1. Le complexe Atg1p

Comme précédemment mentionné, Atg1p est impliquée dans la phase d'induction contrôlée en amont par la voie TOR. Ainsi, elle fonctionnerait comme un interrupteur moléculaire entre la voie d'autophagie et la voie CVT, modulée par son activité kinase gouvernée par son attachement à Atg13p. Elle pourrait réguler la taille de la vésicule formée peut-être *via* l'interaction avec Atg17p (Cheong et al. 2005).

Au cours de la voie CVT, Atg1p interagit avec Atg11p qui lie le cargo, ce rôle sera détaillé au chapitre IV.C.2.. Au cours de la voie d'autophagie, l'adaptateur Atg11p devient partiellement dispensable. On pense que l'interaction d'Atg1p avec Atg13p pourrait réduire l'interaction avec Atg11p. L'activité kinase d'Atg1p contrôle le recyclage d'Atg9p et Atg23p (une protéine périphérique de membrane, requise pour la voie CVT).

IV.B.2. Atg11p : protéine centrale de la machinerie

Atg11p est un adaptateur qui médie de très nombreuses interactions, il est l'organisateur du PAS. Atg11p possède quatre domaines coiled-coil impliqués dans la formation d'oligomères de Atg11p ainsi que dans les interactions avec Atg1, 17, 19 et 20p (Yorimitsu and Klionsky 2005). L'ordre et l'exclusivité de ces interactions ne sont pas connus, mais leur étude permettrait de mieux comprendre la dynamique du processus. Il a été proposé qu'il y aurait 3 populations de Atg11p dans la cellule (figure 28). La première est associée à Atg23p et Atg17p et au cytosquelette d'actine et régule le transport antérograde de Atg9p de la mitochondrie au PAS au cours de la voie CVT. La seconde population correspond à celle qui s'associe et emmène le complexe CVT (Atg19p, Apel) au PAS. Enfin, Atg11p fait partie d'un complexe incluant Atg1p, Atg13p, Atg17p, Atg20p, Atg24p et Vac8p dont elle régule également l'arrivée au PAS (figure 26). Le fait que les protéines de ce complexe soient impliquées de manière différentielle soit dans la voie CVT, la pexophagie et/ou l'autophagie suggère que ce complexe serait responsable dans la conversion entre les voies (Kim et al. 2001). Atg11p est envoyée au PAS de manière dépendante de l'actine (He et al. 2006). Puis, il permet la localisation de Atg8p, Atg20, Atg1p et du complexe CVT au PAS en condition végétative de croissance. En carence, certaines protéines peuvent être envoyées au PAS de manière indépendante de Atg11p qui devient dispensable.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai montré que deux protéines à domaine EH Irs4p et Tax4p interagissaient avec le domaine NPF de Atg11p et tenté de mieux caractériser leur implication dans l'autophagie.

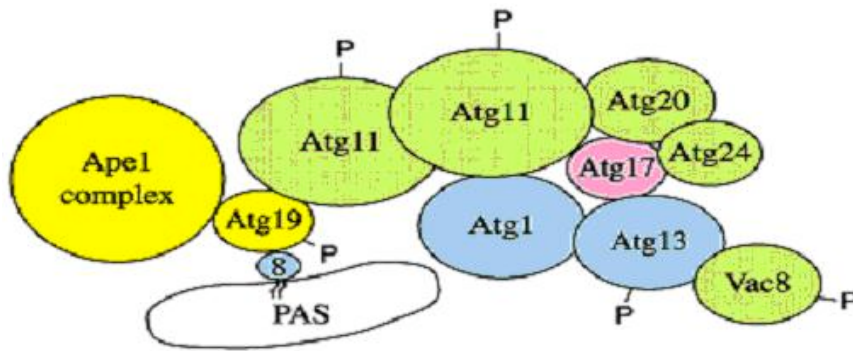


Figure 26 : Les interactions de Atg11p avec les autres Atg au PAS

Les protéines impliquées uniquement dans la voie CVT sont représentées en jaune. En vert, figurent les acteurs des voies sélectives : CVT et pexophagie. En rose, sont dessinées les protéines qui sont requises uniquement pour l'autophagie non sélective et enfin, en bleu, celles qui sont requises pour l'ensemble des voies. 8, Atg8p; PAS, pre-autophagosomal structure. Adapté de (Yorimitsu and Klionsky 2005).

IV.B.3. Atg8p et les systèmes de conjugaison

Atg8p est une protéine soluble ressemblant à l'ubiquitine (ubl). Son système de conjugaison a été bien étudié et est représenté sur la figure 27 (Ohsumi 2001). Son arginine en C-terminal est clivée par Atg4p laissant une glycine en C-ter. Atg8p est alors activée par l'E1 Atg7p qui forme un pont thioester avec la glycine finale de Atg8p (Kirisako et al. 1999). Atg8p est alors transférée à l'E2 Atg3p puis conjuguée covalamment à une molécule de PE qui permet son association aux membranes (Ichimura et al. 2000). Cette liaison est réversible et après fermeture de la vésicule d'autophagie, Atg8p est libérée du PE par Atg4p. Atg8-PE serait conjuguée aux lipides avant son arrivée au PAS et pourrait donc participer à l'apport de lipides marqués pour s'insérer dans l'autophagosome (Suzuki et al. 2001). Ainsi, en l'absence de Atg8p, les membranes ne sont pas délivrées au PAS et les autophagosomes sont anormalement petits (Abeliovich et al. 2000). Cependant la nature de ces lipides reste inconnue.

Atg7p joue aussi le rôle d'E1 dans un second système de conjugaison : celui de l'ubl Atg12p qui se lie de manière covalente à Atg5p grâce à l'E2, Atg10p. Atg16p, qui se multimérise, forme alors un complexe tétramérique avec Atg5p-Atg12p, formant un manteau putatif (voir chapitre IV.A.3.) (Kuma et al. 2002). De manière intéressante, ce système de conjugaison et Atg21p qui se lie au PI3P, sont requis pour la lipidation de Atg8p et sa localisation au PAS pendant la voie CVT (Meiling-Wesse et al. 2004; Stromhaug et al. 2004).

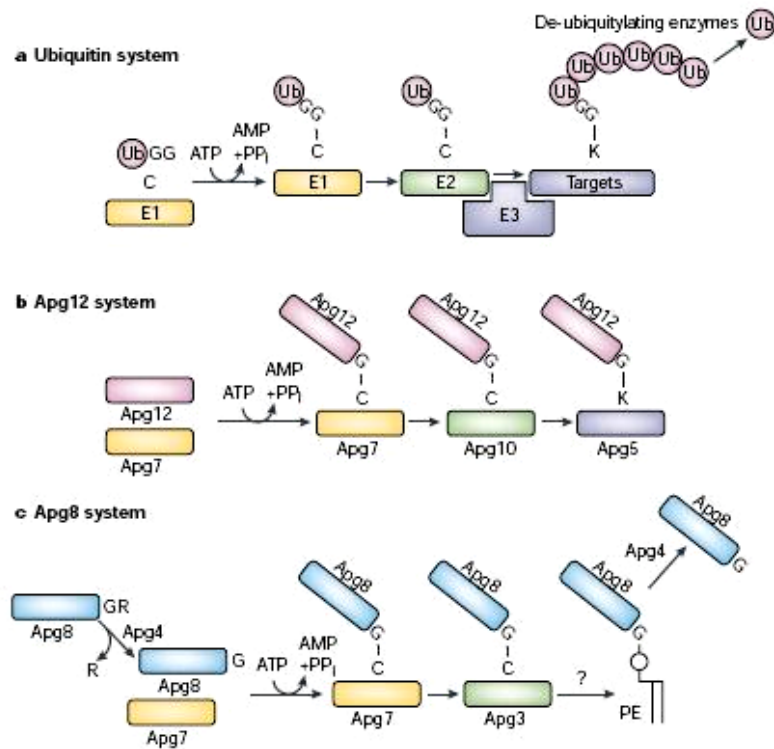


Figure 27 : Les systèmes de conjugaison ubiquitin-like impliqués dans l'autophagie

Les protéines sont notées par leur ancienne nomenclature *Apg* = *Atg*. **a.** le système ubiquitine (voir chapitre II.A.6.). **b.** Le système *Atg12p*. La glycine carboxy-terminale de *Apg12p* est activée par l'E1 *Apg7p*. Puis, *Apg12p* est transférée à l'E2 *Apg10p*. Finalement, *Apg12p* est conjuguée à *Atg5p*. Aucune enzyme ne semble permettre la dé-conjugaison de *Atg12p*. **c.** le système *Atg8p*. *Atg8p* est clivée par *Atg4p*, exposant une glycine qui est activée par l'E1 *Atg7p* et transférée sur l'E2 *Atg3p*. Enfin, *Atg8p* est conjuguée au PE (phosphatidyl-éthanolamine). La déconjugaison est médiée par *Atg4p*. Adapté de (Ohsumi 2001).

IV.B.4. Le complexe PI3-kinase

Chez la levure, il existe une PI3-kinase unique : Vps34p. Elle fonctionne au sein de deux complexes : tous deux contiennent Vps34p et les régulateurs Vps15p et Atg6p (Vps30p). De manière additionnelle, le complexe I qui fonctionne au PAS, contient Atg14p alors que le complexe II inclut Vps38p et fonctionne à l'endosome (Kihara et al. 2001). Le PI3P produit par le complexe I recrute plusieurs Atg au PAS : Atg18p, Atg20p, Atg21p, Atg24p et Atg27p (Nice et al. 2002; Stromhaug et al. 2004). Atg20p et Atg24p interagissent avec le complexe kinase Atg1p, couplant peut-être induction et nucléation/expansion.

IV.B.5. Les protéines membranaires

Atg9p est une protéine intégrale de membrane nécessaire pour tous les types d'autophagie (Lang et al. 2000). Atg9p pourrait participer à l'apport des membranes nécessaires pour former l'autophagosome. Son trafic a donc été étudié extensivement. Elle cycle entre mitochondrie et PAS (figure 28) (Reggiori et al. 2005b). Une fraction de Atg11p, associée à Atg23p et Atg17p et au cytosquelette d'actine régule le transport antérograde de Atg9p de la mitochondrie au PAS (He et al. 2006; Reggiori and Klionsky 2006). Le complexe VFT et les facteurs de sécrétion précoces interviendraient également (Shintani and Klionsky 2004b).

Malgré son statut de protéine transmembranaire, Atg9p ne reste pas associée à l'autophagosome après sa fermeture (Noda et al. 2000). Ainsi, un recyclage actif de Atg9p du PAS vers la mitochondrie a été mis en évidence et requiert le complexe Atg1p–Atg13p, Atg2p, Atg18p et le complexe PI3–kinase (Tucker et al. 2003; Mari and Reggiori 2007). L'activité kinase de Atg1p est requise pour le transport rétrograde de Atg23p et Atg9p (Reggiori et al. 2004a).

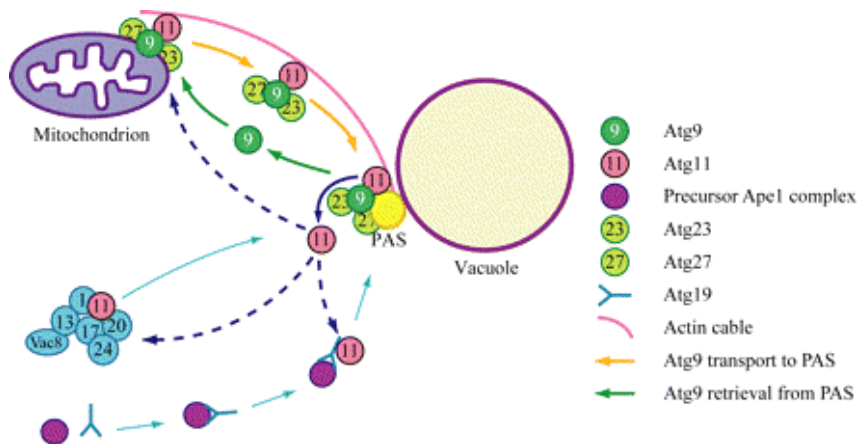


Figure 28 : Modèle pour le transport de Atg9p entre mitochondrie et PAS

Atg9p pourrait participer à l'apport des membranes, elle cycle entre PAS et mitochondrie. Au cours de la voie CVT, une fraction de Atg11p, associée à Atg23p, Atg17p, Atg27p et au cytosquelette d'actine régule le transport antérograde de Atg9p de la mitochondrie au PAS. Les deux autres populations de Atg11p connues sont le complexe avec Atg1p (Atg1, Atg11, Atg13, Atg17, Atg20, Atg24, Vac8) et le complexe Atg11p, Atg19p, ApeI. Ces deux complexes sont emmenés au PAS par Atg11p. Le recyclage de Atg9p du PAS vers la mitochondrie requiert le complexe Atg1p–Atg13p, Atg2p, Atg18p et le complexe PI3–kinase. D'après (He et al. 2006).

Une seconde protéine transmembranaire a été récemment identifiée, Atg27p. Elle est requise pour la voie CVT et la pexophagie mais partiellement dispensable pour l'autophagie. Elle interagirait avec le PI3P et agirait en effecteur de la kinase Vps34p spécifiquement pendant la voie CVT (Wurmser and Emr 2002). Cette donnée n'a pas été confirmée par des expériences plus récentes et elle semble plutôt importante pour le transport de Atg9p de la mitochondrie au PAS (Yen et al. 2007). Sur la base de co-

localisations, il a été proposé qu'Atg27p transiterait entre la structure pré-autophagosomale, la mitochondrie et l'appareil de Golgi.

Ainsi, les deux protéines transmembranaires Atg9p et Atg27p, cyclent entre mitochondrie et PAS, apportant peut-être avec elles les membranes autophagiques. D'un point de vue conceptuel, on peut imaginer que ces protéines permettraient de coordonner les fonctions de la mitochondrie, source d'énergie centrale de la cellule et de l'autophagosome en transférant l'apport d'énergie de l'une à l'autre. Néanmoins, aucun marqueur classique des mitochondries n'est retrouvé au niveau du PAS ou de la vésicule autophagique.

IV.B.6. Machinerie chez les eucaryotes supérieurs

C'est chez les mammifères que les structures d'autophagie ont été décrites en premier et pourtant ce sont les cribles chez la levure qui ont permis d'en découvrir la machinerie. Une fois les séquençages des génomes achevés, la comparaison entre levure et eucaryotes supérieurs a permis de montrer que plusieurs homologues existaient (Reggiori and Klionsky 2002; Levine and Klionsky 2004; Reggiori 2006). Puis, les protéines codées par ces homologues ont été étudiées et dans de nombreux cas, une fonction similaire a été mise en évidence (Codogno 2004). Deux différences notables existent cependant : l'absence de la voie CVT et l'absence du PAS qui pourrait être remplacé par le phagophore chez les eucaryotes supérieurs.

Comme chez la levure, les Atg des eucaryotes supérieurs sont solubles, à l'exception d'Atg9, mais s'associent de façon transitoire avec la membrane pré-autophagosomale. La formation de l'autophagosome repose également sur deux systèmes de conjugaison de type conjugaison à l'ubiquitine. Chez les mammifères, les protéines Atg5 et Atg12, permettent le recrutement de MAP-LC3 (Atg8p chez la levure) conjugué au PE (phosphatidyléthanolamine) et sont recyclées vers le cytosol dès la formation complète de l'autophagosome (Kabeya et al. 2000; Mizushima et al. 2001). Comme chez la levure, Atg4 hydrolyse la liaison entre MAP-LC3 et le PE permettant le recyclage de MAP-LC3. La fraction de MAP-LC3 associée à la membrane interne de l'autophagosome est dégradée en même temps que le corps d'autophagie. Dans ces cellules, le PI3P est également important pour la formation de la vésicule, il est produit par la phosphatidylinositol 3-phosphate kinase (PI3K) de type III (Petiot et al. 2000). L'orthologue de la protéine Atg6p de levure est la protéine à domaine coiled-coil béclin 1 (Liang et al. 1999). Elle a été identifiée en recherchant des partenaires de la protéine anti-apoptotique bcl-2. Ses liens avec l'apoptose et l'apparition de tumeurs seront traités aux chapitres IV.D.1. et IV.D.3..

IV.C. Les différents types d'autophagie et cargos associés

IV.C.1. Méthodes de mesure de l'Autophagie non sélective

L'autophagie en tant que mécanisme de réponse à la carence est principalement un processus non-sélectif qui permet la dégradation de fraction de cytoplasme et le recyclage des constituants macromoléculaires. Une revue récente résume l'ensemble des méthodologies permettant l'étude de cette voie (Klionsky et al. 2007). Chez la levure, elle est étudiée par microscopie électronique ou optique en suivant la formation des autophagosomes dans le cytoplasme de souches où la fusion vacuolaire est inhibée (*vam3Δ*, *ypt7Δ*) ou la présence des corps d'autophagie dans les vacuoles de souches où la dégradation protéolytique est inhibée par l'utilisation de PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) ou de mutants des protéases vacuolaires (*pep4Δ*) (voir figure 22) (Takeshige et al. 1992; Baba et al. 1994). Le devenir de cargos transportés à la vacuole par la voie d'autophagie peut également être suivi. Par exemple, la phosphatase alcaline (PHO8) délétée de son segment trans-membranaire (PHO8Δ60) n'est plus transportée à la vacuole par la voie AP3 (voir chapitre II.B.3.b.) mais devient un cargo de l'autophagie. Après l'arrivée à la vacuole du corps d'autophagie et sa dégradation, PHO8Δ60 est maturée sous sa forme active. On peut alors mesurer son activité qui est proportionnelle à l'efficacité de l'autophagie (Noda et al. 1995). En outre, Atg8p restant associée à la membrane interne de l'autophagosome, il peut être également être utilisé pour suivre les autophagosomes en microscopie ou leur dégradation en western-blot (Kirisako et al. 1999; Suzuki et al. 2001). Chez les eucaryotes supérieurs, LC3, l'orthologue de Atg8p peut également être utilisé dans ce même but. La majorité des études se basent sur le suivi des protéines à durée de vie longue, dégradées par autophagie dans ces cellules.

IV.C.2. Autophagie sélective : CVT

Une seconde voie fait intervenir de nombreux composants de la machinerie d'autophagie : la voie CVT ou voie d'autophagie sélective. Cette route qui permet un transport biosynthétique du cytoplasme à la vacuole est représentée sur la figure 23. Elle est active en milieu riche et permet la maturation de l'aminopeptidase 1, Ape1p et de l'alpha mannosidase vacuolaire, Ams1p qu'on peut suivre en immunoblot. Des cribles génétiques basés sur cette maturation ont conduit à l'identification de neuf *ATG* codant des protéines dispensables pour l'autophagie mais importantes pour la voie CVT, certains intervenant également dans la voie de pexophagie (tableau 5). Celles-ci sont majoritairement impliquées dans la sélection du cargo et son transport vers le PAS où la vésicule CVT est formée. Il est important de mentionner que les gènes codant ces facteurs, comme Atg11p, n'ont pas

d'homologues clairs chez les eucaryotes supérieurs soutenant l'idée que cette voie sélective n'y existe pas (Reggiori and Klionsky 2002).

Au niveau mécanistique, le précurseur d'Ape1p contenant un signal d'adressage à la vacuole forme des dodécamères qui s'assemblent en oligomères d'ordre supérieur (Kim et al. 1997). Le précurseur de Ape1p ainsi que Ams1p se lie à un récepteur, Atg19p (Shintani et al. 2002) (Scott et al. 2001). L'ensemble formé par Atg19p et ses ligands est nommé « complexe CVT ». Puis, l'adaptateur Atg11p se fixe sur Atg19p. Atg11p emmène le complexe CVT au PAS où la vésicule CVT sera formée (Yorimitsu and Klionsky 2005). Atg11p interagit avec de nombreux autres Atg. Atg11p et Atg19p se lie à Atg8-PE qui participe à l'élongation de la membrane (Yorimitsu and Klionsky 2005). La vésicule CVT possède une double membrane comme l'autophagosome mais elle est de taille largement inférieure, environ 150nm et contient uniquement le complexe CVT (Shintani et al. 2002; Shintani and Klionsky 2004b). L'étude de la voie CVT a permis de montrer que la présence du cargo est essentielle à la formation de la vésicule CVT. En effet, ni le PAS ni la vésicule CVT ne sont formés en l'absence d'un des composants du complexe CVT ou de Atg11p. En conditions de carence, ces composants sont dispensables pour la formation de vésicules d'autophagie (Shintani et al. 2002; Shintani and Klionsky 2004b).

La voie CVT est bloquée dans des mutants conditionnels de l'actine. Ce phénotype semble expliqué par le fait que Atg11p est apportée au PAS le long des câbles d'actine. Puis, Atg11p conduit également Ape1p au PAS et permet le transport de Atg9p de la mitochondrie au PAS (Reggiori et al. 2005a; He et al. 2006; Monastyrska et al. 2006; Reggiori and Klionsky 2006). En carence, Atg11p et l'actine deviennent dispensables.

Ald6p, la déhydrogénase à acétaldéhyde, pourrait également emprunter une voie sélective d'autophagie en conditions de carence, plus rapide que l'autophagie classique et indépendante de Atg11p donc de la voie CVT (Onodera and Ohsumi 2004). Ce résultat remet en cause la notion d'aspécificité de l'autophagie.

IV.C.3. Pexophagie

La pexophagie, ou dégradation des peroxysomes dans la vacuole ou le lysosome, est également une voie dérivée de l'autophagie (Hutchins et al. 1999; Dunn et al. 2005; Sakai et al. 2006). Le nombre de peroxysomes est augmenté rapidement sur certaines sources de carbone comme l'acide oléique pour *S. cerevisiae* ou le méthanol chez les levures méthylotropiques comme *Hansenula polymorpha*. Lors du retour sur un milieu contenant du glucose ou de l'éthanol, les peroxysomes deviennent inutiles et sont dégradés par la pexophagie. Chez les levures *Pichia pastoris*, *H. polymorpha* et *Yarrowia lipolytica*, deux types de pexophagie existent : la micropexophagie où un groupe de peroxysomes est englobé dans une protrusion de la membrane vacuolaire et la macropexophagie où les peroxysomes sont

séquestrés individuellement au sein de vésicules adressées à la vacuole (Dunn et al. 2005). Chez *S.cerevisiae*, seule la macropexophagie semble exister. Uniquement cette voie sera discutée ci-après, car elle fait intervenir une machinerie largement similaire à l'autophagie et/ou à la voie CVT. C'est le cas de Atg11p, Atg1p et Atg17p, chez *S.cerevisiae* et *H.polymorpha*. L'actine semble également importante pour la pexophagie, probablement pour des raisons similaires à la voie CVT (Reggiori et al. 2005a).

En outre, il semble qu'une protéine conservée de la levure à l'homme, Pex14p, localisée à la membrane peroxysomale, agirait comme récepteur pour la reconnaissance des peroxysomes par la machinerie d'autophagie (Reggiori and Klionsky 2005). Cependant, aucune interaction directe de Pex14p avec les adaptateurs de la machinerie d'autophagie comme Atg11p n'a pu être mise en évidence. La dégradation de Pex14p ou de Fox3p, thiolase située dans la matrice peroxysomale peut être suivie en immunoblot et traduit la vitesse de la voie de pexophagie. Alternativement, une construction RFP-SKL peut être utilisée dans le même but. En effet, le tripeptide SKL est un signal d'adressage aux peroxysomes ; RFP-SKL est donc incorporé dans la matrice peroxysomale et permet de suivre la localisation intracellulaire des peroxysomes et leur adressage à la vacuole pour dégradation.

La pexophagie existe également dans les cellules de mammifères. Des études en microscopie électronique ont montré que des peroxysomes étaient entourés d'une double membrane dans des conditions induisant leur dégradation (Yokota et al. 1993). La pexophagie y dépend également des protéines Atg, comme Atg7p (Komatsu et al. 2005).

IV.C.4. Mitophagie

La dégradation par autophagie d'autres organelles commence à émerger, comme celle des mitochondries ou mitophagie, voir la revue (Kundu and Thompson 2005). Depuis longtemps, il a été observé qu'après passage des levures en milieu carencé, des mitochondries étaient observées dans les autophagosomes ; mais on ne savait pas si cette présence résultait d'un processus spécifique ou non (Takeshige et al. 1992; Baba et al. 1994). L'identification de la protéine Uth1p, située à la membrane externe de la mitochondrie a constitué un premier indice sur la sélectivité du processus. En effet, cette protéine semble importante pour la dégradation des mitochondries mais pas pour l'autophagie non spécifique en réponse à la carence azotée (Kissova et al. 2004). La dégradation des mitochondries par la mitophagie dépend donc de Uth1p dont le rôle exact est encore inconnu mais également de certaines Atg impliquées aussi dans l'autophagie, comme Atg5p ou Atg7p. Le signal induisant la dégradation des mitochondries serait généré par l'organite lui-même, permettant le contrôle qualité. Ainsi, les mitochondries endommagées ou incapables de maintenir la différence de potentiel à la membrane interne, sont dégradées préférentiellement par une voie dépendante de Atg5p (Priault et al. 2005).

L'ensemble de ces données suggèrent que l'autophagie est un mécanisme de dégradation des mitochondries individuelles endommagées en condition végétative et de groupes de mitochondries en condition de carence.

L'autophagie serait également impliquée dans l'élimination des mitochondries endommagées ou dépolarisées chez les eucaryotes supérieurs (Bota and Davies 2001; Elmore et al. 2001). Dans une souris *ATG7*^{-/-}, l'autophagie induite par la carence est déficiente et une accumulation de mitochondries endommagées est observée, suggérant un rôle de l'autophagie dans le contrôle qualité des mitochondries (Komatsu et al. 2005). D'autres études sont nécessaires afin de mettre en évidence les autres Atg importants pour cette dégradation.

IV.C.5. Autres formes d'autophagie

Outre la macro-autophagie largement détaillée ci-dessus d'autres formes d'autophagies existent.

L'autophagie médiée par des chaperonnes (CMA) semble être un processus central dans le vieillissement (Massey et al. 2006). Chez les mammifères, cette voie permet la dégradation sélective de protéines solubles dans le lysosome. Les protéines présentant une séquence d'adressage de type KFERQ sont reconnues par un complexe de chaperonne contenant hsc70. Une fois à proximité de la membrane lysosomale, la protéine cible interagit avec le récepteur de la voie, LAMP-2A (lysosomal associated membrane protein type 2A) et est transloquée vers le lumen du lysosome.

La microautophagie fait intervenir la séquestration de cytoplasme ou d'organelles directement par des protrusions de la membrane vacuolaire suivie de leur invagination. Cette voie est largement méconnue en termes d'importance physiologique et de machinerie moléculaire. Comme mentionnée dans le chapitre correspondant, la microautophagie est l'une des deux formes d'autophagie intervenant dans la dégradation des peroxysomes. La microautophagie intervient également dans la suppression de fractions de noyau dans la levure. On appelle cette voie "PMN" (piecemeal microautophagy of the nucleus) (Roberts et al. 2003; Kvam and Goldfarb 2007). Elle a lieu spécifiquement au niveau des jonctions nucléovaculaires formées par l'interaction forte entre la protéine de membrane vacuolaire Vac8p et la protéine d'enveloppe nucléaire Nvj1p. La PMN est induite par la carence azotée mais n'est pas bloquée dans un mutant *atg7Δ* suggérant qu'elle ne dépend pas de la machinerie classique d'autophagie.

Dans la levure, les ribosomes peuvent également être dégradés par une voie sélective d'autophagie, dépendant partiellement de la machinerie d'autophagie mais également de facteurs spécifiques (Kraft et Peter, communication personnelle). De plus, une autophagie sélective du réticulum endoplasmique (« ER-phagy ») peut se mettre en place dans cet organisme afin de contre-balancer l'expansion du RE pendant l'UPR (« unfolded protein response ») (Bernales et al. 2006).

Dans les cellules de mammifères, des compartiments Golgiens inactivés recrutent LC3, suggérant leur reconnaissance par la machinerie d'autophagie (Perez, communication personnelle).

IV.D. Rôle en situations physiologiques et pathologiques

Comme dit en début de chapitre, chez les eucaryotes supérieurs, l'autophagie participe au catabolisme des protéines à durée de vie longue. En outre, elle est la seule à permettre la dégradation de portions de cytoplasme en carence mais également la dégradation de particules de taille importante, comme des organelles (mitochondries, peroxyosomes, noyau, voir chapitre précédent), des pathogènes ou des agrégats protéiques. A ce titre, ses rôles en conditions physiologiques et pathologiques sont multiples et certains ont déjà été décrits au chapitre IV.C.. Cette implication dans des aspects très variés de la vie d'une cellule reflète le besoin d'une voie catabolique permettant le recyclage des ressources et l'adaptation rapide à des conditions nutritives variables ou le remodelage de l'architecture cellulaire ou encore la protection contre l'apparition de structures « dangereuses » dans le cytoplasme (Mizushima et al. 2002). Si les mécanismes moléculaires de l'autophagie commencent à être bien disséqués, on en est plus au stade de l'observation que de la compréhension concernant les connections entre autophagie et les différents aspects de la vie cellulaire des eucaryotes décrits ci-dessous. L'ensemble de ces fonctions impliquent nécessairement un mécanisme actif de reconnaissance des structures à dégrader chez les eucaryotes supérieurs. Celui-ci est aujourd'hui inconnu.

IV.D.1. Différentiation induite par la carence, développement, mort cellulaire, dégénérescence et longévité

Les exemples de l'implication de l'autophagie dans ces 5 versants de la vie des organismes uni et multi-cellulaires sont nombreux et ont été résumés dans une revue (Levine and Klionsky 2004), quelques uns seront cités ci-après.

L'autophagie est stimulée par la carence dans tous les organismes. Elle permet alors de recycler des macromolécules issues de portions de cytoplasme ou d'organelles afin de les mettre au service des fonctions essentielles à la survie. En conséquence, les cellules déficientes pour l'autophagie ont une survie réduite en carence. Cette observation est à la base de nombreux cribles ayant permis d'isoler des mutants *atg* chez la levure dans les années 1990 (Tsukada and Ohsumi 1993).

Intuitivement, on comprend facilement que la dégradation autophagique permette l'ajustement de l'expression des protéines devenues obsolètes pendant la différenciation, souvent induite par le stress. Les ressources ainsi recyclées sont utilisées pour en former de nouvelles protéines et structures rendues nécessaires par les changements phénotypiques. Cette hypothèse est confortée par des données génétiques chez *S. cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*, et *C. elegans* (figure 29). Dans ces

trois organismes, la machinerie d'autophagie intervient dans la différenciation induite par le stress. Alors que les Atg sont indispensables pendant la croissance végétative chez la levure, elles deviennent nécessaires pendant la carence et la formation des spores qui suit (Tsukada and Ohsumi 1993). Chez l'amibe, une carence nutritive induit un cycle complexe de développement conduisant à la formation d'un organisme multicellulaire, le « fruiting body ». Cette sporulation lui permet de se disperser à la recherche de réserve du sol. La mutagenèse par insertion dans plusieurs *ATG* entraîne une perte importante de viabilité pendant la carence et la formation de structures anormales (Otto et al. 2003). Enfin, en cas de nourriture limitée, la larve de nématode passe en diapause «dauer» afin de survivre. Il a été montré que l'autophagie est accélérée pendant la transition vers le stade dauer et l'inactivation de certains Atg bloque cette transition (Melendez et al. 2003).

Des données récentes impliquent également l'autophagie dans le développement précoce chez la drosophile, chez la souris et dans les plantes. La déplétion de *drATG3* par interférence à ARN conduit à la mort de la puppe pendant sa métamorphose (Juhász et al. 2003). Chez la souris, la disruption de *bécline 1 / ATG6* entraîne une létalité embryonnaire précoce (Yue et al. 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, les mutations de *AtAPG7* et *AtAPG9* conduisent à des altérations phénotypiques, comme la sénescence précoce des feuilles et l'absence de recyclage des ressources (Doelling et al. 2002).

Pendant le développement, l'autophagie participe donc au « remodelage » des cellules, on pense également que cette voie participerait à la mort cellulaire (Gozuacik and Kimchi 2007). En effet, dès les années 60, des vésicules d'autophagie ont été observées dans les cellules de glandes salivaires d'insectes pendant leur mort (Schin and Clever 1965). La multiplication des exemples, notamment dans les tissus larvaires chez *Drosophila melanogaster*, a conduit au concept de « mort cellulaire programmée par autophagie ou de type II » par opposition à la « mort cellulaire apoptotique ou de type I », où les structures sont morphologiquement différentes (Baehrecke 2003; Gozuacik and Kimchi 2007). Cependant, d'autres études semblent indiquer que les deux types de morts seraient reliés. En effet, différentes situations ont été observées où la macro-autophagie est soit un phénomène protecteur vis-à-vis de l'apoptose soit un événement pro-apoptotique et des vacuoles autophagiques sont fréquemment observées dans les cellules pendant leur mort par apoptose. Le lien entre les deux voies pourrait passer par le couple de protéines bcl-2 de nature anti-apoptotique qui se lie à bécline 1 qui contrôle l'autophagie. Cependant, l'inhibition de la caspase 8 et donc de l'apoptose entraîne une mort cellulaire alternative par autophagie dépendant de Atg7 et bécline 1 montrant que les deux voies sont reliées (Yu et al. 2004).

En conclusion, on ne sait pas si l'autophagie est réellement un processus promouvant la mort dans ces cellules, ou, si au contraire, l'autophagie est induite comme stratégie de survie qui paradoxalement pourrait finir par tuer la cellule par auto-cannibalisme trop poussé (Shintani and Klionsky 2004a). Malgré les avancées récentes dans la connaissance des mécanismes moléculaires contrôlant l'autophagie, on ne sait toujours pas expliquer ce paradoxe : comment pourrait s'opérer le basculement de sa fonction vitale vers sa fonction fatale ?

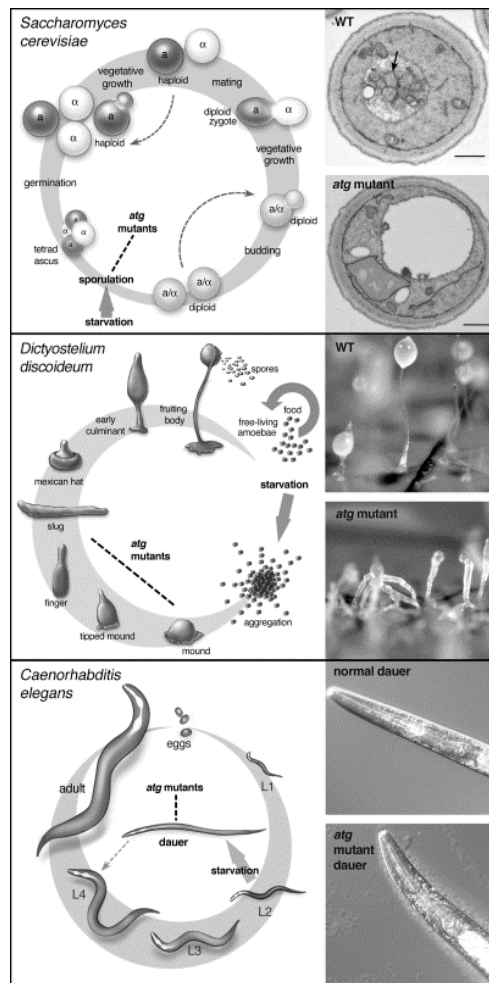


Figure 29 : Autophagie et différenciation induite par le stress / développement

Les cycles cellulaires de *S. cerevisiae*, *D. discoideum* et *C. elegans* sont présentés pour un organisme sauvage (WT) et un mutant d'autophagie (*atg*). Dans les trois cas, des mutations dans les gènes ATG bloquent la différenciation induite par le stress. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la carence induit la sporulation et la formation de corps d'autophagie dans les vacuoles visualisées en microscopie électronique dans un WT mais non présents dans le mutant *atg*. Chez *Dictyostelium discoideum*, la carence induit le développement d'une forme multicellulaire jusqu'au « fruiting body » mature chez le WT. Les mutations *Atg* bloquent le développement du fruiting body. Chez *Caenorhabditis elegans*, la carence conduit à l'arrêt du développement et au passage dans un stage alternatif appelé dauer chez un sauvage. Au contraire, chez un mutant *atg*, le développement dauer est altéré. D'après (Levine and Klionsky 2004).

Si le rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire au cours du développement est donc loin d'être une certitude, cette voie interviendrait aussi dans la mort cellulaire en conditions pathologiques. Par exemple, chez les patients atteints de maladies neurodégénératives à agrégats comme Alzheimer, Huntington, et Parkinson, l'autopsie des tissus cérébraux montre l'accumulation d'autophagosomes (Larsen and Sulzer 2002). Là encore, les résultats expérimentaux peuvent être interprétés inversement. L'autophagie pourrait être un mécanisme neuro-protecteur facilitant l'élimination des gros agrégats protéiques non pris en charge par le protéasome. Les deux modèles ne sont pas exclusifs, on peut imaginer que dans les stades précoces, l'autophagie participe au contrôle qualité puis finisse par induire la mort cellulaire. On ne sait pas comment ces agrégats sont reconnus par la machinerie d'autophagie. Une étude chez une souris déficiente pour *Atg7* montre l'accumulation d'agrégats polyubiquitinés dans le cytoplasme (Komatsu et al. 2005). L'ubiquitine, déjà connue comme signal de dégradation endocytaire et par le protéasome (voir chapitre II.A.6.), pourrait donc également servir de signal d'adressage vers la voie autophagique. Cette hypothèse nécessite confirmation et l'identification de la protéine *Atg* reconnaissant les protéines ubiquitinées.

L'autophagie est également un mécanisme d'anti-vieillessement en détruisant les espèces réactives de l'oxygène qui contribuent au stress génotoxique (Levine and Klionsky 2004). Chez *C.elegans*, l'inactivation, par des ARN à interférence, de l'expression de la bécline 1 diminue la longévité ; l'autophagie permettrait donc d'allonger la durée de vie (Melendez et al. 2003).

IV.D.2. Dégradation de pathogènes

Plus récemment, il a été montré que l'autophagie participe à la dégradation des pathogènes. La xénophagie correspond à l'autophagie des bactéries et virus (figure 30) (Levine 2005). Certaines bactéries, comme *L. monocytogenes*, phagocytées à la surface cellulaire, sont capables de lyser la membrane du phagosome. Après libération dans le cytoplasme, elles deviennent alors la cible de l'autophagie. Dans les cas de *L. pneumophila*, *P. gingivalis*, et *B. abortus*, le phagosome fusionne avec l'autophagosome ou y est séquestré. L'autophagie est donc un mécanisme de défense de l'intégrité cellulaire (Shintani and Klionsky 2004a). De plus, l'autophagie permet d'accroître la réponse immunitaire contre les cellules infectées en générant des peptides bactériens. Certaines bactéries peuvent cependant détourner la voie et utiliser l'autophagosome comme lieu de réplique. Ce type d'autophagie implique une reconnaissance sélective des pathogènes. Mais les signaux permettant la reconnaissance et quelles *Atg* les reconnaissent restent inconnus.

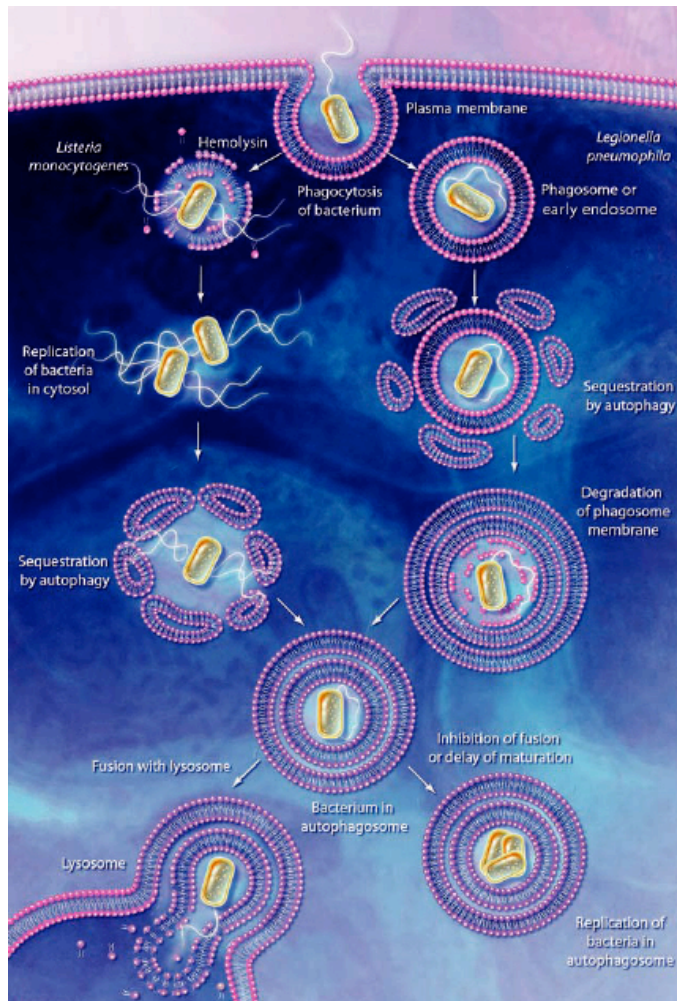


Figure 30 : Rôle de l'autophagie pendant la dégradation des bactéries

Certaines bactéries, comme *L. monocytogenes*, phagocytées à la surface cellulaire, sont capables de lyser la membrane du phagosome. Après libération dans le cytoplasme, elles deviennent alors la cible de l'autophagie. Dans les cas de *L. pneumophila*, *P.gingivalis*, et *B. abortus*, le phagosome fusionne avec l'autophagosome ou y est séquestré. Si la maturation ou la fusion de l'autophagosome au lysosome est inhibée, la bactérie peut se répliquer dans l'autophagosome. D'après (Shintani and Klionsky 2004a).

IV.D.3. Croissance cellulaire et tumorigénèse

Dans les années 70, il a été proposé que l'autophagie déterminerait la rapidité de la croissance cellulaire en régulant l'équilibre entre dégradation et nouvelle synthèse protéique (Amenta et al. 1978). Ce modèle a été remis en lumière ces dernières années par les liens identifiés entre autophagie et tumorigénèse. Ces liens sont complexes et semblent parfois contradictoires (voir la revue (Kondo et al. 2005)).

La majorité des données a été acquise par les études sur bécline 1. L'autophagie est sous le contrôle de bécline 1, suppresseur de tumeur. En effet, bécline 1, homologue de Atg6p, requise pour l'autophagie, inhibe la tumorigénèse et est exprimée à un niveau anormalement bas dans des cancers du sein. Cette observation suggère que l'inactivation de l'autophagie pourrait contribuer à la progression de cancers (Liang et al. 1999; Edinger and Thompson 2003). Des délétions mono-alléliques du gène *bécline 1* sont observées dans 40% à 70% des cancers spontanés du sein et de l'ovaire. Sa réintroduction dans des lignées cellulaires de carcinome mammaire réduit leur prolifération. En outre, les souris *bécline 1*^{+/-} développent plus fréquemment des tumeurs spontanées et induites dans de nombreux organes (Yue et al. 2003). De ces études, il ressort que *bécline 1* est un gène suppresseur de tumeur probablement en contrôlant l'autophagie.

Lors des étapes précoces de formation des tumeurs, l'autophagie jouerait un rôle anti-tumoral en promouvant la mort cellulaire programmée de cellules pré-cancéreuses. Dans les cellules cancéreuses, la mort autophagique a été décrite en réponse à de nombreuses thérapies antitumorales (Gozuacik and Kimchi 2004). L'autophagie pourrait également intervenir dans la prévention de l'apparition de certaines tumeurs en dégradant des organelles endommagés sources de radicaux libres mutagènes. Inversement lors des stades plus tardifs de la vie de la tumeur, l'autophagie permettrait une meilleure survie des cellules très peu irriguées au coeur des tumeurs. L'autophagie pourrait augmenter la résistance de tumeurs aux chimiothérapies. Enfin, de nombreuses molécules utilisées en chimiothérapie régulent les voies d'autophagies (Tamoxén, Temozolamide, Rapamycine,...). Moduler les voies d'autophagie lors des chimiothérapies pourrait donc être une piste prometteuse pour l'amélioration des stratégies anti-tumorales. Au préalable, il est cependant nécessaire de comprendre l'équilibre entre l'impact positif et négatif de l'autophagie sur la progression tumorale (Codogno 2004; Shintani and Klionsky 2004a).

Résultats et Discussions

I. Le recyclage chez la levure, identification d'une nouvelle route et de nouveaux acteurs :

I.A. Introduction

Comme présentée au chapitre II.C.2. de l'introduction, l'invagination des cargos ubiquitinés au niveau des MVBs requière l'action de trois complexes : ESCRT I, II et III qui sont conservés de la levure à l'homme. Des levures mutées dans les complexes ESCRTs (mutants *vps* Classe E) présentent à la fois un ciblage à la membrane limitante de la vacuole/lysosome de cargos normalement destinés à la lumière de la vacuole et, de façon plus surprenante, une accumulation à la membrane plasmique de diverses protéines pouvant conduire, par exemple à la prolifération des cellules cancéreuses (voir chapitre III.E. de l'introduction). L'observation initiale à l'origine de mon projet de thèse est donc que dans la levure comme chez les mammifères des cellules déficientes pour la machinerie ESCRT accumulent une série de transporteurs et de récepteurs à la membrane plasmique. Cette observation pose la question de savoir comment et pourquoi un défaut au niveau d'une machinerie endosomale tardive se répercute très en amont de la voie d'endocytose au niveau de la membrane plasmique. Plusieurs auteurs ont proposé que ce dernier phénotype pourrait être dû à un recyclage accru des cargos internalisés, mais la démonstration formelle n'a pas pu être apportée dans grand nombre de cas faute de protocole adéquat.

Contrairement à l'exocytose et l'endocytose, les voies et les acteurs du recyclage restent largement méconnus chez la levure. Notre travail se basait donc sur ce double objectif : comprendre l'origine des phénotypes d'accumulation de protéines à la membrane plasmique dans les mutants ESCRT et tenter de mieux caractériser le recyclage chez *S.cerevisiae*. Nous avons abordé cette question en utilisant comme protéine modèle l'uracile perméase Fur4p dont les mécanismes moléculaires de l'endocytose ont été finement disséqués au laboratoire. Comme dans le cas d'autres transporteurs et récepteurs, nous avons montré que Fur4p est accumulée à la membrane plasmique de souches de levures déficientes pour la machinerie ESCRT en testant leur sensibilité au 5-FU (5-Fluoro Uracile), analogue toxique de l'uracile. L'accumulation de Fur4p à la membrane plasmique des mutants ESCRTs peut résulter soit d'un retard de l'endocytose soit d'un recyclage accru. Pour trancher entre ces deux hypothèses nous avons mis au point un protocole permettant de découpler l'endocytose du recyclage de Fur4p. Nous avons ainsi pu montrer que Fur4p était endocytée à une vitesse normale dans des souches déficientes pour les complexes ESCRTs. En revanche, dans ces mêmes cellules, la perméase est très efficacement recyclée à la membrane plasmique après son endocytose alors qu'elle est dégradée dans les vacuoles des cellules sauvages. Si l'ubiquitination de Fur4p est essentielle pour son internalisation, nous avons pu montrer que la dé-ubiquitination de Fur4p n'est pas requise pour son retour à la membrane plasmique.

Quelle est la route empruntée par Fur4p lors de son recyclage dans des souches déficientes pour les complexes ESCRTs ? Le recyclage de protéines internalisées est très peu documenté dans la levure. Seule une voie de recyclage a été bien décrite : celle empruntée par la v-SNARE Snc1p impliquée dans la fusion des vésicules sécrétoires à la membrane plasmique. Snc1p cycle entre Golgi, membrane plasmique et endosome précoce (Lewis et al. 2000). La machinerie nécessaire au recyclage de Snc1p est bien caractérisée (Pelham 2002). Nos expériences ont montré que le recyclage de Fur4p à la membrane plasmique n'est pas affecté dans des mutants déficients pour la machinerie de recyclage de Snc1p. De même, des mutations dans le complexe rétromère nécessaire au trafic entre les compartiments endosomaux tardifs et l'appareil de Golgi n'affectent en rien le retour de Fur4p à la membrane plasmique. L'ensemble de ces données suggèrent que Fur4p ne passe pas par les compartiments Golgiens lors de son recyclage vers la membrane plasmique. En résumé, nous avons mis en évidence une nouvelle voie de recyclage différente de celle empruntée par la v-SNARE Snc1p. En outre, nous avons pu démontrer que le complexe d'attachement HOPS/ Vps de classe C impliqué dans le ciblage à la vacuole et à l'endosome tardif (voir chapitre II.C.3. de l'introduction) intervenait de façon globale sur les recyclages de cargos (Fur4p / Snc1p) et des membranes, probablement parce qu'il est requis pour le bon fonctionnement de l'endosome précoce. En effet, dans les souches déficientes pour ce complexe, les cargos et membranes semblent piégés au niveau de l'endosome précoce qu'ils soient destinés à l'endosome tardif ou à l'appareil de Golgi. L'ensemble de ces résultats fait l'objet de la publication numéro 1.

Afin d'identifier la machinerie du recyclage de Fur4p, nous avons employé une approche génétique globale. Nous avons utilisé le fait que le recyclage accru de Fur4p dans des mutants ESCRTs provoque une hypersensibilité de ces souches au 5-FU comme outil pour ce crible. Des levures doublement déficientes pour ESCRT et pour un élément nécessaire au recyclage de Fur4p devraient retrouver un niveau de résistance normal au 5-FU. Nous avons donc cherché des mutations supprimant l'hypersensibilité au 5-FU d'un mutant déficient pour ESCRT après construction des 4800 double mutants déficients pour ESCRT et pour l'un des gènes de levure non-essentiels à la viabilité. Après vérification directe du recyclage de Fur4p dans les souches devenues résistantes au 5-FU, uniquement deux candidats ont pu être confirmés, Ump1p et Ydr290w. Ump1p intervenant dans l'assemblage du protéasome, il nous semble probable que l'effet de cette protéine sur le recyclage de Fur4 soit plutôt indirect *via* la dégradation d'une protéine intervenant dans le trafic de Fur4p par exemple. Ydr290w n'a pas de fonction connue et des problèmes expérimentaux nous ont empêché d'aller plus loin.

En parallèle de ce crible dont les résultats se sont avérés décevants, nous avons également mené une approche gènes candidats. Nous nous sommes intéressés aux protéines de fonction peu caractérisée au sein de cinq familles impliquées dans les voies de trafic : les petites GTPase de type RAB, les nexines, les complexes d'attachement, les adaptateurs Ggas et les protéines à domaine EH ainsi qu'aux machineries du recyclage de Chs3p et Gap1p dont l'identification est contemporaine à notre étude. Aucun défaut important de recyclage de Fur4p n'a été observé dans l'ensemble des délétants pour les

gènes codant pour ces protéines suggérant que la machinerie de recyclage de Fur4p diffère de celle des autres cargos et/ou qu'il y a une redondance potentielle parmi les membres de ces machineries.

Enfin, nous avons également étudié le recyclage de Fur4p quand son trafic endosomal est bloqué au niveau de l'endosome précoce dans un mutant *pep12Δ*. Afin de déterminer la route suivie par Fur4p lors de ce recyclage, nous avons tenté de construire des souches délétées pour *PEP12* et pour des gènes codant des acteurs nécessaires au recyclage de l'endosome précoce à l'appareil de Golgi. Mais, la combinaison de ces deux types de délétion s'est avérée létale pour les cellules. En utilisant un mutant de la GTPase/Ypt, Vps21p (Ypt51p), supposé bloquer également le trafic de Fur4p au niveau de l'endosome précoce, nous avons cependant pu répondre à cette question. En effet, la délétion de facteurs impliqués dans le trafic endosome précoce, Golgi bloque le recyclage de Fur4p dans un contexte *vps21Δ*. Cette observation est intéressante car elle montre qu'un même cargo (Fur4p) peut suivre deux routes de recyclage différentes : une ne passant pas par l'appareil de Golgi depuis un compartiment de nature endosomale tardive et un recyclage par l'appareil de Golgi, comme Snc1p, depuis l'endosome précoce. Dans les deux cas, l'étape finale de fusion à la membrane plasmique semble dépendante de l'exocyste.

I.B. Matériels et méthodes

Construction des souches de levure et milieux

L'ensemble des souches de levures utilisées pendant ce chapitre I est décrit dans le tableau 6, par ordre d'apparition dans le texte.

Les simples mutants sont, sauf indication contraire, de contexte génétique BY et sont issus de la collection complète des souches de levures disruptées Euroscarf. Ceux construits lors de cette étude l'ont été par la méthode de disruption décrite par Longtine et al. (Longtine et al. 1998). Les doubles mutants ont été obtenus par croisements des simples mutants (Adams et al. 1997) ou par disruption du gène indiqué dans les mutants *vps37Δ*, *pep12Δ* ou *vps21Δ* (Longtine et al. 1998).

Les techniques spécifiques à la levure (préparation d'ADN génomique de levure, transformation de levures) ont été réalisées selon *Methods in Yeast Genetics* (Adams et al. 1997).

Des conditions classiques de croissance ont été utilisées (Sherman et al. 1986). La culture des levures se fait en milieu riche YPD, liquide ou solide (2% agar) : bactopeptone 2g/l, yeast extract 1g/l additionné d'une source de carbone (glucose 2%) ou en milieu minimum YNB, liquide ou solide (2% agar) : yeast nitrogen base 0.67g/l additionné d'une source de carbone (glucose, raffinose ou galactose 2%) et des acides aminés ou bases nécessaires (20μg/ml) (SD). La croissance des cellules se fait à 30°C pour les souches sauvages ou délétées pour des gènes non-essentiels et à 24°C pour les souches thermosensibles.

souche	génotype	Source/Référence
BY4741	<i>WT, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
BY4742	<i>WT, Mat α, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG400	<i>vps20::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG475	<i>vps22::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG401	<i>vps23::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG402	<i>vps24::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG403	<i>vps25::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG404	<i>vps28::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG407	<i>vps36::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG408	<i>vps37::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG503	<i>pep4::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG367	<i>ypt7::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG498	<i>pep12::kanMX, Mat α, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
RH144-3d	<i>sec18-1, Mat a, ura3-52, his4, leu2-3,112, bar1-1</i>	H. Riezman
MHY1251	<i>doa4::LEU2, vps24::HIS3, Mat a, ura3-52, trp1-1, lys2-801</i>	M. Hochstrasser
yJMG510	<i>vps37::HIS3, Mat α, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	Cette étude
yJMG844	<i>doa4::kanR, vps37::HIS3, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ</i>	Cette étude
yJMG453	<i>vps51::HIS3, Mat α, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	Cette étude
yJMG531	<i>vps37::kanMX, vps51::kanMX, Mat α, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG398	<i>rcy1::natMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG528	<i>vps37::HIS3, rcy1::natMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Cette étude
PC173-3A	<i>sec14-1, Mat α, leu2-3,112, ura3-52, suc2Δ9</i>	S. Friant
yJMG524	<i>vps37::kanMX, sec14-1, Mat α, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG412	<i>vps29::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG529	<i>vps37::HIS3, vps29::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG476	<i>vps33::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG523	<i>vps37::HIS3, vps33::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG530	<i>vps37::HIS3, ypt7::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG473	<i>vps16::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG474	<i>vps18::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG506	<i>vam3::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG527	<i>vam3::HIS3, pep12::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG553	<i>WT, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	C. Boone
yJMG564	<i>fur4::kanR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ</i>	Euroscarf
yJMG556	<i>vps37::natR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG860	<i>ptc4::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG858	<i>ygl014w::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG864	<i>ygl057c::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG863	<i>yfl046w::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG857	<i>yjl211c::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG862	<i>ydr090c::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude

Tableau 6 Souches de levures (page 1/2)

souche	génotype	Source/Référence
yJMG859	<i>yg1088w::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG866	<i>ump1::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG871	<i>ydr290w::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG695	<i>ump1::kanR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ</i>	Euroscarf
yJMG700	<i>ydr290w::kanR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ</i>	Euroscarf
yJMG363	<i>ypt10::kanMX4, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ1</i>	Euroscarf
yJMG364	<i>ypt11::kanMX4, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, his3Δ1</i>	Euroscarf
yJMG969	<i>vps37::his3, ypt10::kanMX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG970	<i>vps37::his3, ypt11::kanMX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG829	<i>snx4::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG837	<i>snx42::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG839	<i>snx41::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG831	<i>grd19::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG880	<i>vps5::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG902	<i>vps17::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG885	<i>bph1::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG886	<i>mvp1::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG887	<i>ypr097w::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG888	<i>ypt35::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG889	<i>ykr078w::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
YJMG985	<i>tax4::KAN, irs4::KAN, vps37::HIS3, leu2Δ0, MET15, ura3Δ0, his3Δ0, lys2Δ0</i>	Cette étude
yJMG903	<i>bch1::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG901	<i>bch2::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG898	<i>bud7::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG903	<i>chs6::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG899	<i>chs5::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG1154	<i>grt2::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG1151	<i>grt1::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG1153	<i>lst7::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG1152	<i>lst4::kanR, vps37::NatR, ura3Δ, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, lys2Δ, can1::MFA1pr-HIS3, lyp1Δ</i>	Cette étude
yJMG996	<i>gga2::KAN, vps37::KAN, leu2Δ, met15Δ, ura3Δ, his3Δ, lys2Δ</i>	Cette étude
yJMG972	<i>gga1::kanMX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG973	<i>gga2::kanMX, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG971	<i>vps37::his3, gga1::kanMX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG991	<i>vps21::KAN, sec14-1, leu2Δ, ura3Δ,</i>	Cette étude
yJMG330	<i>vps21::kanMX4, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ1</i>	Euroscarf
yJMG994	<i>vps21::KAN, vps51::KAN, leu2Δ, ura3Δ, his3Δ, lys2Δ</i>	Cette étude
YJMG417	<i>vps8::kanMX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG526	<i>sec6-4, vps37::Kan, ura3-52</i>	Cette étude
yJMG509	<i>sec6-4, ura3-52</i>	P. Novick
yJMG533	<i>sec6-4, pep12::KanMX, ura3-, leu2Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude

Tableau 6 : Souches de levures

Plasmides

Les plasmides utilisés lors de cette étude sont décrits dans le tableau 7.

Les techniques classiques de biologie moléculaire pour les clonages et la manipulation d'ADN recombinant (purification d'ADN plasmidique, électrophorèse d'ADN, digestion enzymatique de l'ADN et amplification par PCR, ligation, transformation de bactéries) ont été effectuées comme décrit dans Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 2000) et dans Molecular Cloning (Sambrook et al. 1997).

Les réactions de PCR ont été conduites avec le kit Triple Master d'Eppendorf selon les conditions recommandées. Les oligonucléotides d'amorce ont été synthétisés par Proligo-France.

La souche bactérienne DH5 α (*endA1*, *hsd R17*, *sup E44*, *thil 1*, *recA1*, *gyrA86*, *rel A1*, D(*arg F-lacZya*)U89, D80 *dLacZ* DM15) a été utilisée pour tous les clonages. Les bactéries sont cultivées à 37°C en milieu LB (Luria Bertani) liquide ou solide (2% agar) additionné d'ampicilline (100 μ g/ml).

Tous les plasmides utilisés sont des vecteurs "navettes" comprenant : deux origines de réplication (l'une pour *E.coli* et l'autre pour *S.cerevisiae*), le gène de résistance à l'ampicilline comme marqueur de sélection chez *E.coli* et un marqueur conférant la prototrophie pour l'uracile ou un acide aminé pour la sélection chez la levure. Les plasmides ARS/CEN sont présents en 2 à 5 copies, les plasmides 2 μ à une cinquantaine de copies par cellule.

Plasmide	caractéristiques	Référence
Yep352fF	FUR4, URA3, 2 μ	(Volland et al. 1994a)
p195gF	GAL-FUR4, URA3, 2 μ	(Volland et al. 1994a)
pFL38-gFP	GAL-FUR4-GFP, URA3, CEN	(Marchal et al. 2002)
pFL38-KR-gFP	GAL-FUR4-KR-GFP, URA3, CEN	(Blondel et al. 2004)
pFL38-Ub-KR-gFP	GAL-Ub-FUR4-KR-GFP, URA3, CEN	(Blondel et al. 2004)
pJMG118	Tpi-GFP-SNC1, URA3, CEN	(Lewis et al. 2000)
pJMG321	ADH-UMP1-GFP, URA3, CEN	Cette étude
pAS103	HA-NPR1, URA3, 2 μ	(Schmidt et al. 1998)

Tableau 7 : Plasmides

Microscopie à fluorescence

Un volume de 0,5ml de culture de cellules en phase exponentielle de croissance exprimant la protéine d'intérêt étiquetée à une protéine fluorescente est prélevé et centrifugé 3 min à 5000 rpm. Le culot de cellules est repris dans 20 μ l de milieu de culture. 2,3 μ l sont observés entre lame et lamelle sur un microscope Olympus BY61 avec filtre approprié ; pour la GFP : filtre Chroma GFP II (excitation 440-470 nm). Les images sont acquises avec une caméra Spot CCD et le programme Métamorph et traitées avec Photophop (Adobe).

Western blots et anticorps

La préparation d'extraits totaux de protéines de levure a été effectuée comme précédemment décrit (Volland et al. 1994a). Les cellules contenues dans 1ml de culture à DO 0,6-0,8 (correspondant à environ $1,5 \cdot 10^7$ cellules) sont lysées par 100 μ l de NaOH 1,85 N pendant 10 min dans la glace. Les protéines sont ensuite précipitées par ajout de 100 μ l de TCA 50% pendant 10 min dans la glace puis centrifugées à 13000 rpm pendant 5min. Le surnageant est éliminé et le culot protéique est repris dans 50 μ l de tampon d'échantillon (SDS 4%; Tris HCl 0,1M pH 6,8; EDTA 4mM; glycérol 20%; β -mercaptoéthanol 2% et bleu de bromophénol 0,02%) par unité de DO. Les protéines sont ensuite dénaturées à 95°C pendant 2 min ou à 37°C pendant 10 min pour révéler les protéines hydrophobes comme Fur4p qui agrègent lors d'un traitement à 95°C.

Les gels SDS-PAGE (acrylamide 8 à 12 %) et le transfert sur membrane de nitrocellulose sont effectués comme décrit dans Current protocols in molecular biology (Ausubel 2000). L'hybridation avec les anticorps primaires monoclonaux anti- GFP (Roche), anti-PGK (Molecular Probes) et anti-HA (Roche) a été effectuée selon les recommandations du revendeur. L'anticorps dirigé contre la séquence C-terminal de Fur4p a été décrit précédemment (Volland et al. 1994a). L'immunodétection est faite selon la méthode ECL ; l'anticorps secondaire est couplé à la peroxydase qui catalyse une réaction photoluminescente révélée sur film autoradiographique.

Trafic de Fur4p

- **Présentation du cargo**

La perméase à uracile de levure, Fur4p, est un transporteur de membrane plasmique possédant dix segments transmembranaires et trois grands domaines cytoplasmiques, les extrémités N- et C-terminales ainsi qu'une boucle centrale (Figure 31.A.) (Garnier et al. 1996). Son trafic a été étudié de manière extensive au laboratoire, ce qui en fait un très bon modèle pour répondre à de nouvelles questions en s'appuyant sur les données et outils déjà disponibles.

Fur4p suit la voie de sécrétion jusqu'à la membrane plasmique où elle transporte activement l'uracile en même temps qu'un proton. A la membrane plasmique, Fur4p subit une endocytose constitutive dépendante de l'ubiquitine (Galan et al. 1996). En condition de stress (choc thermique, carence carbonée, drogues (cycloheximide, rapamycine)...) ou en présence d'un excès de son substrat, son endocytose est accélérée. Après son internalisation, Fur4p suit la voie d'endocytose et est dégradée dans la vacuole (Volland et al. 1994b ; Galan et al. 1996) (figure 31.C). Fur4p est ubiquitinée au niveau de la membrane plasmique par Rsp5p, ligase d'ubiquitine à domaine HECT de la famille Nedd4 (Galan et al. 1996 ; Moreau et al. 1997a). Cette ubiquitination par des chaînes d'ubiquitine de type K63 déclenche l'internalisation du transporteur (Galan et al. 1996) (Galan and Haguenaer-

Tsapis 1997b). Des formes de Fur4p conjuguées à l'ubiquitine s'accumulent à la membrane plasmique dans un mutant déficient pour l'internalisation. D'autre part, l'ubiquitination de Fur4p requiert une phosphorylation préalable d'une séquence PEST en N-terminal de la protéine par les caséines kinases 1 de levure, Yck1p et Yck2p (Marchal et al. 2000). Un tri au cours de la voie de sécrétion s'opère en présence d'excès d'uracile et permet un adressage direct à la vacuole et une dégradation accélérée de la perméase (Blondel et al. 2004).

Nous disposons d'outils (forme étiquetée –GFP fonctionnelle...) et de méthodes (dosage de l'activité de la perméase) permettant de suivre cinétiquement l'endocytose de Fur4p. Au cours de ce travail, l'exocytose, l'endocytose et le recyclage de Fur4p ont été étudiés sur des cellules transformées par le plasmide pFL38gFP (GAL-Fur4-GFP, URA3, CEN) (figure 31.B.) qui permet la régulation de la synthèse de Fur4p. La fusion Fur4-GFP est fonctionnelle et la surproduction de la protéine (d'un facteur 20) n'affecte pas son endocytose (Dupré and Haguenaer-Tsapis 2001). De plus, divers mutants de Fur4p ont été construits : formes non phosphorylables, non-ubiquitinales avec ou sans ubiquitine fusionnée en phase ainsi que des variants incapables de lier le substrat, permettant de répondre à des questions particulières. Certains ont été utilisés au cours de cette étude (GAL-Fur4KR-GFP et GAL-Ub-Fur4KR-GFP).

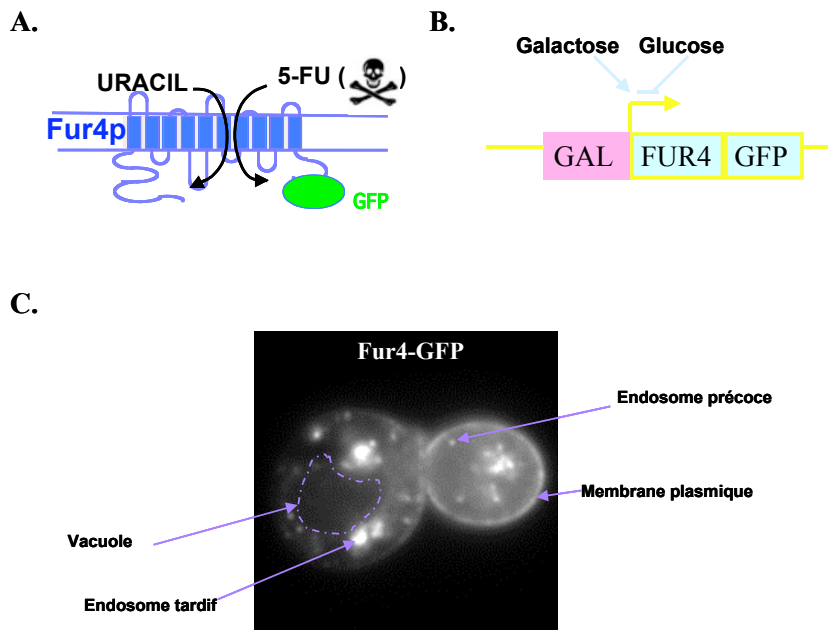


Figure 31 : Fur4p, cargo modèle

A. Représentation schématique de la perméase à uracile Fur4p. Elle possède dix segments transmembranaires et trois grands domaines cytoplasmiques, les extrémités N- et C-terminales ainsi qu'une boucle centrale. Elle transporte l'uracile et son analogue toxique, le 5FU à la membrane plasmique. B. Schéma du plasmide pFL38gf-GFP portant la fusion Fur4-GFP sous contrôle du promoteur fort pGAL10 inductible par le galactose et répressible par le glucose. C. Fur4-GFP suit la voie d'endocytose : elle est visible à la membrane plasmique, dans les endosomes précoces et tardifs avant son arrivée à la vacuole.

- **Test sur boîte de sensibilité au 5-FU**

Les levures à étudier sont transformées avec un plasmide vide conférant la prototrophie vis-à-vis de l'uracile. Une souche WT transformée avec un plasmide surexprimant Fur4p est utilisée comme témoin d'hypersensibilité et une souche délétée pour *FUR4* présente une plus grande résistance. Pour les tests en gouttes, les levures sont cultivées jusqu'en phase exponentielle et testées pour leur sensibilité au 5-FU. Après dilution en série, elles sont déposées sur des boîtes SD sans ou avec 2.5µM 5-FU. Dans le cas des tests à grande échelle du crible, des levures issues de colonies sur boîte sont déposées sans dilution sur boîte sans ou avec 5µM 5-FU afin d'avoir une réponse de type « pousse/ne pousse pas ».

- **Dosage de l'activité de transport de l'uracile**

L'activité de l'uracile perméase de Fur4p est évaluée en mesurant la quantité d' [¹⁴C]-uracile (ICN) 5µM incorporée par les cellules contenues dans 1ml de culture pendant 30 secondes à 30°C (Volland et al. 1994a). Les cellules sont ensuite filtrées sur filtres Whatman GF/C. Le filtre est rincé deux fois à l'eau glacée puis placé dans une fiole avec du liquide de scintillation (optiphase Hisafe 3). La radioactivité incorporée par les levures retenues sur le filtre est ensuite comptée grâce à un compteur à scintillation (Rackbeta 1254).

- **Néosynthèse et ciblage de Fur4p à la membrane plasmique**

Les souches à étudier sont transformées par le plasmide pFL38gf-GFP portant la fusion *FUR4-GFP* sous contrôle du promoteur fort *pGAL10* inductible par le galactose et répressible par le glucose (figure 31.B). Les souches sont cultivées en milieu YNB raffinose (2% final) pendant une nuit. La synthèse de Fur4-GFP est induite à 30°C par ajout de galactose (2% final) pendant 90 minutes ou trois heures dans les cellules en phase exponentielle de croissance (DO 0,5-0,7) puis stoppée par ajout de glucose (2% final) pendant 20 min. Ce temps est nécessaire afin que Fur4p néosynthétisée atteigne la membrane plasmique.

Lors de cette étude, nous avons également étudié la cinétique d'arrivée à la membrane plasmique d'une forme non taguée de Fur4p, comme décrit précédemment (Moreau et al. 1997b). Les cellules transformées avec p195gF ont été cultivées en milieu minimum avec raffinose (2%) jusqu'en phase exponentielle puis la synthèse de Fur4p a été induite par addition de galactose (2%). L'activité de la perméase a été mesurée toutes les 25 minutes pendant 2h30. Des extraits protéiques ont été préparés et la quantité de Fur4p a été vérifiée par western immunoblotting.

- **Endocytose de Fur4p induite par la rapamycine**

L'ajout de rapamycine provoque un stress qui accélère l'endocytose. La rapamycine (0.4µg/ml final) est ajoutée aux cellules transformées par pFL38gf-GFP et cultivées comme décrit ci-avant à 30°C. La localisation intra-cellulaire et l'activité de la perméase sont suivies toutes les 30 minutes pendant trois

heures. Les cellules thermosensibles sont transférées à température restrictive 15 minutes avant l'ajout de rapamycine.

- **Recyclage de Fur4p après endocytose induite par une carence carbonée**

La carence carbonée est un stress très brutal qui conduit à une endocytose rapide et totale de Fur4p et nous permet donc de découpler les phases d'endocytose et de recyclage de la perméase. La situation de carence carbonée présente l'avantage d'être facilement réversible puisqu'il suffit d'ajouter du glucose dans le milieu afin de mettre fin au stress. Après induction de la synthèse de Fur4-GFP comme décrit ci-avant, les cellules sont filtrées et placées en milieu minimum sans source de carbone pendant 75 min pour déclencher l'internalisation de Fur4p à 24°C. Après 75 min, le signal de fluorescence a disparu de la membrane plasmique. Du glucose (2% final) est ajouté et le recyclage est suivi pendant 60 min en mesurant la réapparition d'activité de la perméase et en suivant la relocalisation de fluorescence à la membrane plasmique par microscopie. Les cellules thermosensibles sont cultivées à température permissive pendant la phase d'endocytose puis transférées à température restrictive 15 minutes avant l'ajout de glucose.

L'activité de transport d'uracile radiomarquée médiée par Fur4p est dosée pendant la phase d'induction par le galactose et après ajout de glucose (de 3 min à 60 min); elle ne peut pas être mesurée pendant la carence carbonée puisque le transport nécessite de l'énergie ; cette phase est donc uniquement suivie en fluorescence.

Recyclage de GFP-Snc1p

Des cellules transformées avec pJMG118 (tpi-GFP-Snc1, CEN, URA3) cultivées en milieu sélectif jusqu'en phase exponentielle de croissance (0.5-0.7 unités DO/ml) sont observées au microscope à fluorescence. Des extraits protéiques totaux sont préparés et une analyse en western immunoblotting de la phosphorylation de la GFP-Snc1p est effectuée.

Test de recyclage du FM4-64

Le recyclage du FM4-64 est suivi comme décrit précédemment (Wiederkehr et al. 2000). Après culture, les levures sont mises en présence de FM4-64 pendant 15 minutes à 30°C, puis elles sont lavées trois fois dans du milieu SD froid. Elles sont alors resuspendues dans 10 µl de milieu SD et gardées sur glace. Du milieu SD pré-chauffé à 30°C est additionné aux cellules et la fluorescence est mesurée pendant une période de 600 secondes avec un spectrofluorimètre HITACHI F-2000. La décroissance de fluorescence est proportionnelle à la quantité de lipides membranaires recyclés.

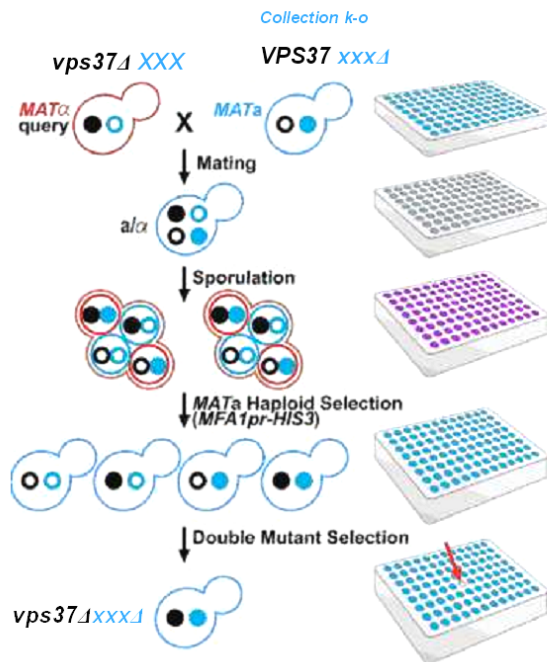
Crible génétique

Afin de construire les 4800 souches doubles mutantes de levures déficientes pour *VPS37* et pour l'un des gènes non essentiels de levure, nous avons croisé un mutant délété pour *VPS37* avec l'ensemble des souches composant la « KO-collection » de levure. La méthode SGA (Synthetic genetic array) permet l'obtention de doubles mutants sans avoir à disséquer les tétrades, travail qui serait titanesque à l'échelle des 4800 doubles mutants. Elle consiste à utiliser des souches portant plusieurs marqueurs de sélection et se base sur des étapes de sélections successives afin de permettre la croissance uniquement des spores doubles mutantes (figure 32.A.) (Tong et al. 2001).

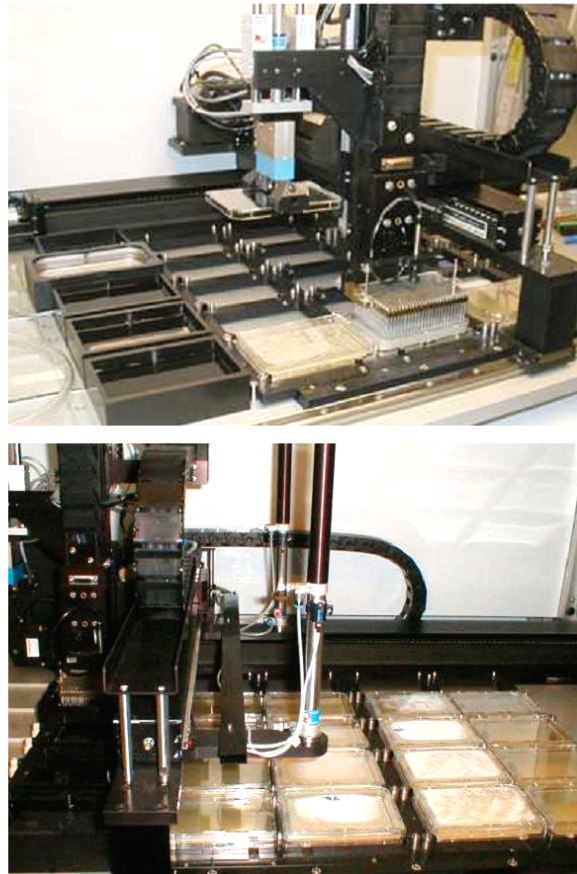
Dans notre cas, nous avons utilisée une souche *vps37::natR*, *MAT alpha*, *ura3Δ*, *his3Δ*, *leu2Δ*, *met15Δ*, *lys2Δ*, *can1::MFA1pr-HIS3*, *lyp1Δ*, transformée par un plasmide centromérique conférant la prototrophie vis-à-vis de l'uracile afin de pouvoir réaliser le test de sensibilité au 5-FU. Cette souche a été croisée avec la collection des simples mutants ayant le génotype suivant : *xxx::kanR*, *MAT a*, *ura3Δ*, *his3Δ*, *leu2Δ*, *met15Δ*. Les milieux utilisés à chaque étape et le génotype dont ils permettent la sélection sont présentés à la figure 32 C.

La manipulation des levures se fait grâce à un robot à l'aide d'une griffe à 192 dents permettant de répliquer 96 souches en duplicat d'une boîte à l'autre (figure 32.B.).

A.



B.



C.

étape	milieu	Génotype sélectionné				
croisement	YPD	2N				
diploïdes	YPD + G418, NAT	2N				
sporulation	SPO (NaAcetate, yeast extract, glucose, URA, HIS, LEU)	2N				
haploïde MATa	SD-HIS ARG URA LYS+CAN, S-AEC	MATa	can1Δ::MFA1pr-HIS3	lyp1Δ		
sélection kanR	SD-HIS ARG URA LYS+CAN, S-AEC, G418	MATa	can1Δ::MFA1pr-HIS3	lyp1Δ	xxxΔ::kanR	
sélection kanR natR	SD-HIS ARG URA LYS+CAN, S-AEC, G418, NAT	MATa	can1Δ::MFA1pr-HIS3	lyp1Δ	xxxΔ::kanR	vps37Δ::natR

Figure 32 : Méthode d'obtention de la collection des doubles mutants

A. méthodologie SGA (Synthetic genetic array). (i) une souche de signe sexuel alpha, ici, *vps37Δ* où *VPS37* est délété par un marqueur de sélection : *natMX* (nourseothricin-resistance marker) qui lui confère une résistance à un antibiotique, la nourseothricine, et portant le reporteur *MFA1pr-HIS3* est croisée avec la collection des simples mutants viables (4800) de signe sexuel a et où chaque gène est délété par *kanMX* (kanamycin-resistance marker). La croissance des doubles mutants hétérozygotes résultants s'effectue sur un milieu contenant de la nourseothricine et de la kanamycine. (ii) Les diploïdes sont transférés sur un milieu carencé en azote et carbone afin d'induire la sporulation et la formation de la progéniture méiotique haploïde. (iii) les spores sont transférées sur milieu synthétique sans histidine, afin de permettre la germination sélective des spores de signe sexuel a qui expriment le reporteur *MFA1pr-HIS3* alors que les spores alpha ne le peuvent pas. (iv) La progéniture uniquement de signe sexuel a est alors transférée sur milieu contenant de la nourseothricine et de la kanamycine, ce qui permet de sélectionner uniquement les spores double mutantes. Adapté de (Tong et al. 2001).

B. Robot utilisé pour la manipulation de la collection de levures. www.upstate.edu/biochem/genomics/robot.jpg ; www.utoronto.ca/boonelab/robotics.htm. C. Etapes de sélection et milieux associés. G418 : kanamycine, NAT : nourseothricine, S-AEC : S-Amino Ethyl cystéine, CAN : canavanine, SPO : milieu de sporulation.

I.C. Résultats

I.C.1. Une nouvelle voie de recyclage :

Les résultats présentés dans ce chapitre ont, pour la plupart, été publiés (Bugnicourt et al. 2004). La publication correspondante est présentée en annexe 1.

**Antagonistic roles of ESCRT and Vps
Class C/ HOPS complexes in the recycling
of yeast membrane proteins**

*Rôles opposés des complexes ESCRTs et Vps de classe C/
HOPS dans le recyclage des protéines de membrane*

Amandine Bugnicourt¹, Marine Froissard¹, Kostianna Sereti, Helle D. Ulrich², Rosine Haguenaer-Tsapis¹, Jean-Marc Galan¹

¹Institut Jacques Monod-CNRS/ Universités Paris 6 & 7
2 place Jussieu
75251 PARIS Cedex 05
France

²Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology
Karl-von-Frisch-Strasse
D - 35043 Marburg
Germany

Running title: Recycling in *S.cerevisiae*
Key words: recycling/Fur4p/ESCRT/HOPS

Les cellules déficientes pour les complexes ESCRTs accumulent Fur4p à la membrane plasmique

Fur4p transporte le 5-fluoro-uracil (5-FU), un analogue toxique de l'uracile. Nous avons étudié si les mutants *vps* de Classe E accumulaient Fur4p à leur membrane plasmique en regardant la sensibilité au 5-FU des souches *vps23Δ*, *vps37Δ*, *vps28Δ*, *vps22Δ*, *vps25Δ*, *vps36Δ*, *vps20Δ* et *vps24Δ*. Des cellules sauvages transformées avec un plasmide permettant la surexpression de Fur4p ont été incluses comme témoin hypersensible au 5-FU. Toutes ces souches sont plus sensibles au 5-FU qu'une souche *WT* suggérant que les mutants Vps CIE accumulent Fur4p actif à la membrane plasmique (NP). Des souches chacune déficientes pour un des complexes ESCRT sont représentées sur la figure 33 : ESCRT I (*vps37Δ*), II (*vps22Δ*) , III (*vps20Δ*). Dans les expériences suivantes, nous avons utilisé $\Delta vps37$ (ESCRT I) comme modèle pour l'investigation de ce phénotype.

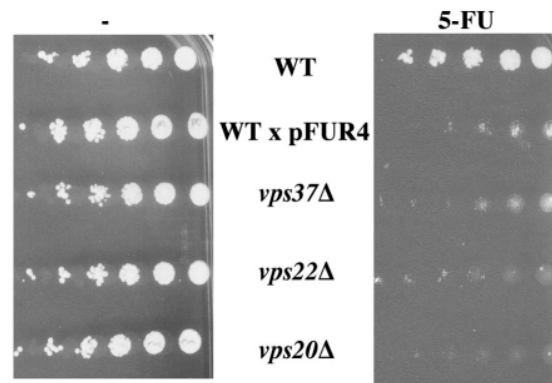


Figure 33: Les mutants ESCRTs sont hypersensibles au 5-FU

Des levures WT, vps37Δ (ESCRT I), vps22Δ (ESCRT II), vps20Δ (ESCRT III) transformées avec un plasmide vide conférant la prototrophie vis-à-vis de l'uracile et WT transformées avec un plasmide surexprimant Fur4p (x pFUR4) ont été testées pour leur sensibilité au 5-FU. Des cellules en phase exponentielle ont été diluées et déposées sur des boîtes SD sans (-) ou avec 2.5μM 5-FU (5-FU).

Nous avons d'abord cherché à savoir si ce phénotype résultait d'une sécrétion accrue de Fur4p dans les mutants *vps* Classe E. Nous avons comparé les cinétiques d'arrivée de Fur4p à la membrane plasmique dans les cellules *vps37Δ* et *wt*, en utilisant un plasmide codant pour Fur4p, sous contrôle du promoteur inductible GAL. La synthèse de Fur4p est induite dans des cellules par ajout de galactose dans un milieu avec raffinose. La quantité de Fur4p synthétisée est très similaire dans les deux souches, comme montré par le western immunoblotting (Fig. 34.A.). Les cinétiques de ciblage de Fur4p à la membrane plasmique le sont également d'après la mesure de l'entrée d'uracile radiomarquée dans *vps37Δ* et *WT* (Fig. 34.B.).

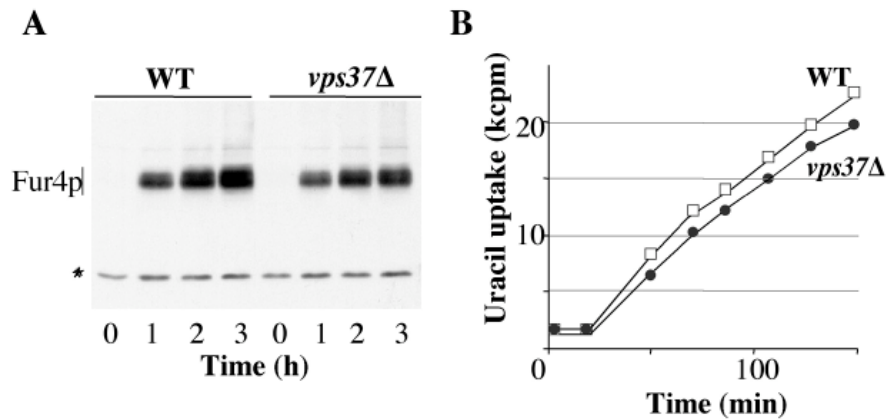


Figure 34: La sécrétion de Fur4p n'est pas modifiée dans les mutants ESCRTs

Des cellules WT (carré blanc) et *vps37Δ* (cercle noir) transformées avec *GAL-Fur4p* ont été cultivées en milieu minimum avec raffinose jusqu'en phase exponentielle de croissance. Puis, la synthèse de *Fur4p* a été induite par ajout de galactose. **A.** Des extraits protéiques ont été préparés toutes les heures après ajout de galactose. *Fur4p* a été détecté en western immunoblotting. L'astérisque (*) indique un témoin de charge, la protéine *PGK1*. **B.** L'entrée d'uracile radiomarqué a été mesurée toutes les 25 minutes pendant 150 minutes et le résultat est exprimé en *kCPM*.

Nous avons alors étudié si le défaut de la machinerie ESCRT affectait l'endocytose de *Fur4p*. Pour cela, nous avons exprimé une fusion fonctionnelle *Fur4-GFP* sous contrôle du promoteur *GAL10* à la membrane plasmique dans les cellules *vps37Δ* et *WT*. La synthèse de *Fur4-GFP* a été induite comme décrit en Fig. 34 puis du glucose a été ajouté pour la stopper. Vingt minutes après l'ajout de glucose ($t=0$), les cellules ont été collectées, observées au microscope à fluorescence (Fig. 35 B) et l'entrée d'uracile a été mesurée (Fig. 35 A). Comme attendu, la grande majorité de *Fur4p* est à la membrane plasmique dans les deux souches à $t=0$. La rapamycine est alors ajoutée, cette drogue mime la carence azotée (Schmeizle and Hall 2000) et induit donc l'endocytose de *Fur4p* (Volland et al. 1994a). Dans les cellules sauvages, *Fur4p* est rapidement internalisée et conduite au lumen de la vacuole (Fig. 35 A et B). Dans le mutant *vps37Δ*, *Fur4p* est partiellement stable à la membrane plasmique jusqu'à 3 heures après l'ajout de rapamycine, une fraction localise également dans une large structure intracellulaire qui correspond sûrement au compartiment Classe E car du FM4-64 y est également piégé (Fig. 35 B et NP). L'entrée d'uracile radiomarquée reste élevée dans *vps37Δ* par rapport au *WT* (Fig. 35 A). Afin de savoir si les autres mutants ESCRTs partageaient ce phénotype, nous avons mesuré l'endocytose de *Fur4p* comme décrit en fig. 35.A dans huit autres souches déficientes pour les complexes ESCRTs. Le pourcentage d'activité uracile perméase résiduel 3 heures après ajout de la rapamycine est présenté (Fig. 35 C). *Fur4-GFP* est stabilisée à la membrane plasmique dans tous les mutants Classe E testés.

En résumé, *Fur4p*, comme d'autres transporteurs et récepteurs, est accumulée à la membrane plasmique des mutants Vps Classe E.

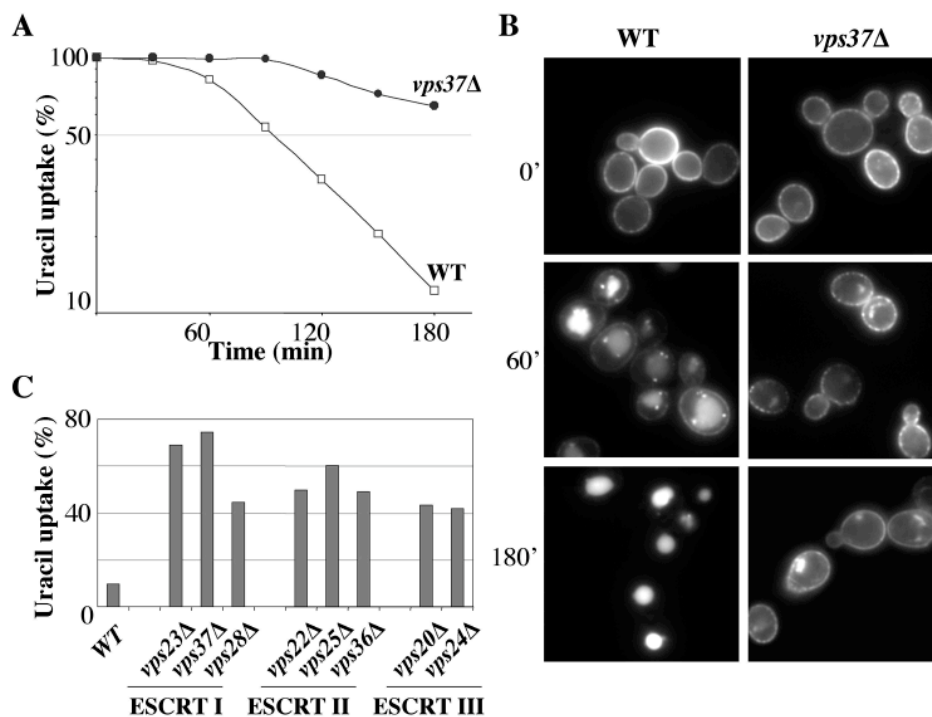


Figure 35 : Fur4p est accumulée à la membrane plasmique des mutants ESCRTs

Les souches indiquées ont été transformées avec GAL-Fur4-GFP, cultivées et la synthèse de Fur4-GFP a été induite comme décrit dans la fig. 34. Du glucose a été ajouté pour stopper la synthèse. Après 20 minutes, la rapamycine a été ajoutée pour induire l'endocytose de la perméase ($t=0$). A. L'entrée d'uracile radiomarqué a été mesurée toutes les 30 minutes pendant 180 minutes après l'ajout de rapamycine et les résultats sont exprimés en pourcentage de l'entrée à $t=0$ en échelle semi-log, WT (carré blanc) et vps37Δ (cercle noir). B. Les cellules ont été collectées aux temps indiqués après ajout de rapamycine et visualisées au microscope à fluorescence. C. Des cellules WT; vps23Δ, vps37Δ et vps28Δ (ESCRT I); vps22Δ, vps25Δ et vps36Δ (ESCRT II); vps20Δ et vps24Δ (ESCRT III) ont été traitées comme expliqué en A. Sur le graphique est représentée l'activité uracile perméase 180 minutes après l'ajout de rapamycine en pourcentage de l'activité à $t=0$ pour chaque souche.

Fur4p est recyclée vers la membrane plasmique dans les mutants ESCRTs

La stabilisation de Fur4p à la membrane plasmique des mutants ESCRTs après ajout de rapamycine est surprenante car elle suggère intuitivement un défaut d'internalisation. Cependant, la machinerie ESCRT est connue pour agir en aval dans la voie d'endocytose. Nous avons tout d'abord étudié si les complexes ESCRTs pouvaient agir à la membrane plasmique. Dans ce but, nous avons suivi la localisation d'une forme étiquetée à la GFP de Vps23p (ESCRT I). Un marquage ponctué de type endosomal a été observé avant et après ajout de rapamycine (NP). Aucune localisation à la membrane plasmique n'a été mise en évidence suggérant que cette hypothèse n'est pas la bonne. De manière alternative, la stabilisation de Fur4p après ajout de rapamycine dans les mutants déficients pour la

machinerie ESCRT pourrait s'expliquer par un dysfonctionnement dans la voie TOR qui permet la perception de la rapamycine. Pour tester cette hypothèse, nous avons vérifié l'intégrité de la voie TOR en utilisant la déphosphorylation d'une forme étiquetée HA de Npr1p comme témoin du bon fonctionnement de cette voie de signalisation. Dans la souche *WT*, en absence de rapamycine, Npr1p est sous forme phosphorylée. Elle est rapidement déphosphorylée après ajout de rapamycine (fig. 36). La cinétique de déphosphorylation est identique dans un mutant *vps23Δ*. On peut donc conclure que cette branche de la voie TOR est encore fonctionnelle dans les mutants ESCRT. Cette hypothèse ne permet donc pas d'expliquer la stabilisation apparente de Fur4p à la membrane plasmique dans ces mutants.

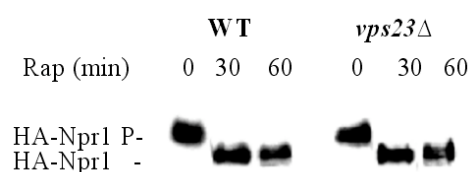


Figure 36 : Fonctionnalité de la voie TOR.

Les souches WT et vps23Δ transformées par le plasmide HA-Npr1p ont été cultivées en milieu minimum jusqu'en phase exponentielle de croissance. Puis la rapamycine a été ajoutée et des extraits protéiques ont été préparés aux temps 0, 30 et 60 minutes. La protéine HA-Npr1p a été révélée avec un anticorps anti-HA.

Un modèle alternatif pour expliquer la stabilisation de Fur4p à la membrane plasmique peut également être envisagé et est cohérent avec le lieu d'action connu pour les protéines ESCRTs : l'internalisation de la perméase induite par la rapamycine pourrait être suivie de son recyclage vers la membrane plasmique. L'équilibre entre ces deux voies conduirait à l'apparente stabilisation de la perméase à la membrane plasmique. Un test rigoureux de cette hypothèse requiert de "découpler" l'endocytose de Fur4p de son recyclage. Nous avons pensé que l'application d'un stress violent comme la carence carbonée (CS), connue pour induire une endocytose très rapide de la perméase (Volland et al. 1994a), pourrait déstabiliser cet équilibre en rendant la vitesse de recyclage négligeable par rapport à la vitesse d'endocytose.

Nous avons donc comparé le devenir de Fur4-GFP en CS dans les mutants *pep4Δ* (pour inhiber la dégradation de la perméase) et *vps37Δ*. La synthèse de Fur4p a été induite comme décrit en fig 34 dans des cellules en croissance. Comme attendu, Fur4-GFP est totalement internalisée et envoyée au lumen vacuolaire après 75min de CS dans *pep4Δ* (Fig. 37.A, 75'CS). Il est important de noter que la protéine est également internalisée efficacement dans *vps37Δ* : après 75 minutes de CS, Fur4p se trouve au niveau de compartiments intracellulaires, probablement des compartiments Classe E. Donc, les cellules *vps37Δ* ne présentent pas de défaut pour l'étape d'internalisation de l'endocytose. Nous avons alors testé le recyclage potentiel de Fur4p dans ces souches en ajoutant du glucose pour stopper le stress carbonée et suivi la localisation de la protéine en microscopie et par mesure de l'activité de la

perméase. Dans ces conditions expérimentales, la synthèse *de novo* de Fur4p reste bloquée. Dans *pep4Δ*, aucun signal ne ré-apparaît au niveau de la membrane plasmique indiquant que Fur4p ne peut pas recycler depuis le lumen de la vacuole (Fig. 37.A, 30'CA). Au contraire, nous avons observé une re-localisation rapide de Fur4-GFP vers la membrane plasmique dans les cellules *vps37Δ*. Trente minutes après l'ajout de glucose (CA), Fur4p-GFP est à la fois dans le compartiment CIE et à la membrane plasmique (Fig. 37.A, 30'CA). De manière cohérente, 50% de l'activité initiale de Fur4p est retrouvée une heure après l'ajout de glucose dans *vps37Δ* (Fig. 37.B).

Afin de savoir si cette relocalisation se faisait *via* un transport vésiculaire classique, nous avons combiné la délétion de *VPS37* avec une allèle thermosensible de Sec18p/NSF qui bloque le transport vésiculaire à 37°C (figure 38). Le recyclage de Fur4p est bloqué par l'inactivation de Sec18p à 37°C, indiquant que le recyclage de Fur4p fait intervenir un transport vésiculaire.

Dans les mutants ESCRTs, après endocytose, Fur4p s'accumule théoriquement à la membrane limitante du compartiment CIE, à partir de là, nous avons observé qu'elle pouvait recycler. Nous avons alors cherché à savoir si Fur4p pouvait recycler depuis les vésicules internes du MVB. Dans ce but, nous avons utilisé un mutant pour la RAB Ypt7p requise pour la fusion entre endosomes tardifs et vacuole. Par le même protocole que précédemment, nous avons observé que Fur4p endocytée était bloquée dans des structures intracellulaires correspondant aux MVBs dans $\Delta ypt7$ (Fig. 37.A, 75'CS). L'addition de glucose n'induit pas la redistribution de la perméase à la membrane plasmique (Fig. 37.A et B). Donc, une fois incorporée dans les vésicules des endosomes tardifs, Fur4p ne peut pas recycler même si son ciblage à la vacuole et sa dégradation sont inhibés.

Fur4p est capable de recycler quand la voie d'endocytose est bloquée au niveau de la formation des MVBs, est-elle également capable de recycler quand la voie est bloquée plus tôt, au niveau de l'endosome précoce ? Dans un mutant de la syntaxine Pep12p, le trafic entre endosomes précoces et tardif est bloqué. Après CS, Fur4p est bloquée dans des petites structures intracellulaires, vésicules ou endosomes précoces (Fig. 37.A, 75'CS). L'ajout de glucose induit un recyclage rapide de la perméase vers la membrane plasmique, comparable à celui observé dans *vps37Δ*, d'après les images de fluorescence et les mesures d'entrée d'uracile (Fig. 37.A et B).

Donc, Fur4p-GFP recycle vers la membrane plasmique si la voie d'endocytose est bloquée au niveau de l'endosome précoce ou à l'étape de formation des MVBs. Ces données constituent la première démonstration formelle du recyclage d'une perméase dans la levure, depuis, celui de Gap1p a également été montré. Nous avons alors étudié la route et la machinerie du recyclage depuis un compartiment endosomal tardif modifié dans le contexte génétique *vps* Classe E. Dans un deuxième temps, nous avons également étudié le recyclage de Fur4p depuis l'endosome précoce (voir paragraphe I.C.2.c.).

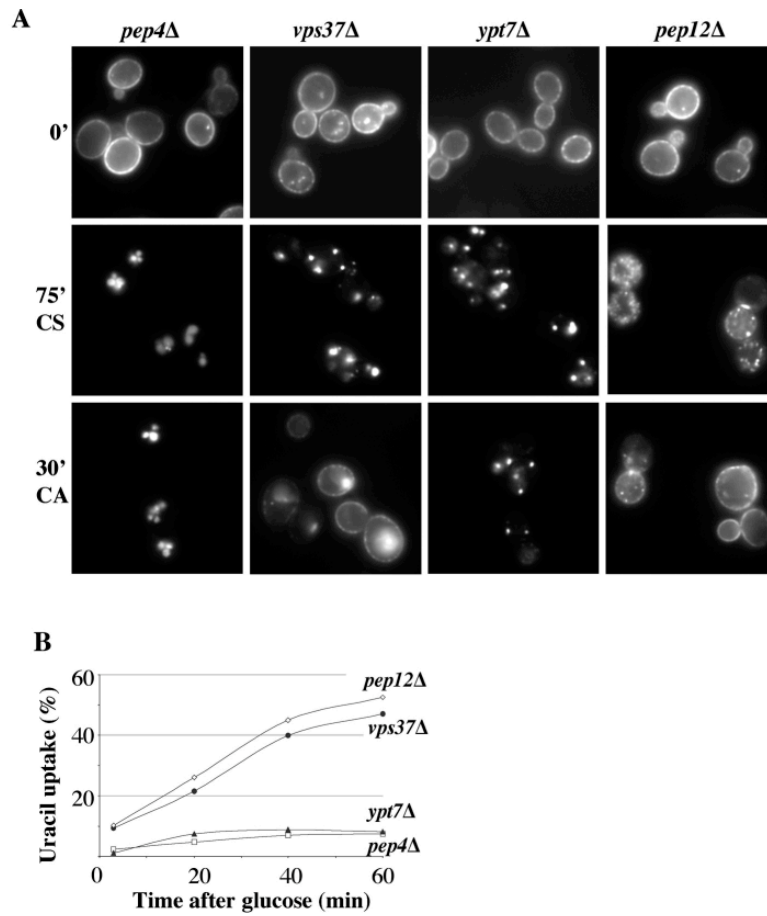


Figure 37: Fur4p est recyclée vers la membrane plasmique dans les mutants ESCRTs

Des cellules *pep4Δ* (carré blanc), *vps37Δ* (cercle noir), *ypt7Δ* (triangle noir) et *pep12Δ* (losange blanc) transformées par *GAL-Fur4-GFP* ont été cultivées à 24°C et la synthèse de *Fur4-GFP* a été induite comme décrit en Fig 34. A $t=0$, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase puis du glucose est ajouté 75 minutes après. A. les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence à $t=0$ (0'), après 75 minutes de carence en carbone (75'CS) et 30 min après ajout de carbone (30'CA). B. L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 20 minutes après ajout de glucose. Les résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'entrée initiale avant la carence.

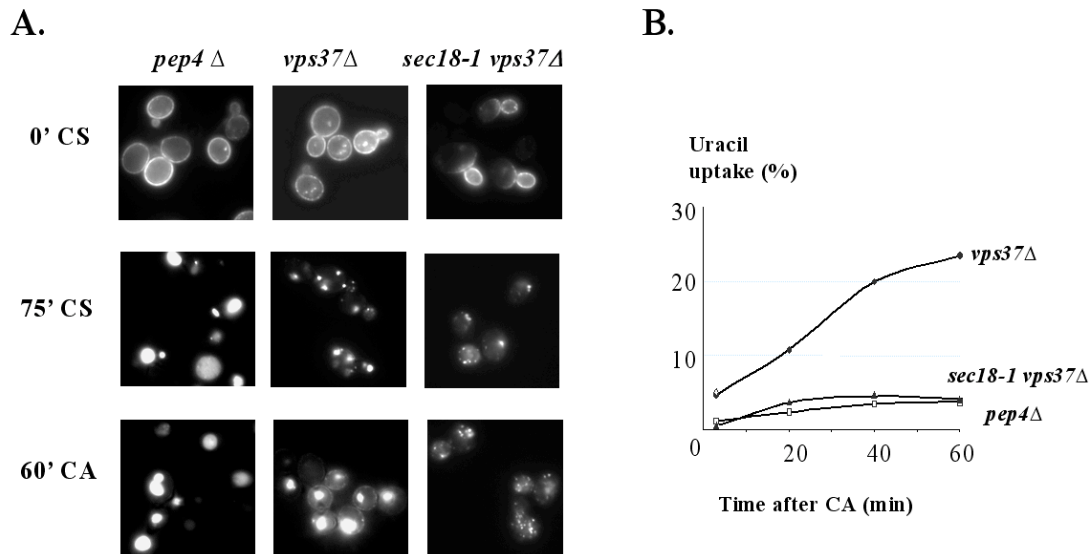


Figure 38: Le recyclage de Fur4p nécessite des fusions vésiculaires

Des cellules *pep4* Δ (carré blanc), *vps37* Δ (cercle noir) et *vps37* Δ *sec18-1* (triangle noir) transformées par *GAL-Fur4-GFP* ont été cultivées à 24°C et la synthèse de *Fur4-GFP* a été induite comme décrit en Fig 34. A $t=0$, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase. Après 60 min, les cellules sont transférées à 37°C, puis du glucose est ajouté 15 minutes après. **A.** les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence aux temps indiqués. **B.** L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 20 minutes après ajout de glucose. Les Résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'entrée initiale avant la carence. Notez que le recyclage dans *vps37* Δ est moins important à 37°C versus 24°C, probablement en raison d'une endocytose simultanée résultant du choc thermique.

La dé-ubiquitination de Fur4p n'est pas requise pour son recyclage

Dans des cellules *WT*, *Fur4p* ubiquitinée à la membrane plasmique est dé-ubiquitinée par *Doa4p* avant son ciblage dans les vésicules des MVBs (Dupré and Haguenaer-Tsapis 2001). Nous avons cherché à savoir si l'inhibition de la dé-ubiquitination de *Fur4p* bloquerait le recyclage de la perméase. Dans cet objectif, nous avons étudié le recyclage de *Fur4-GFP* dans la souche *vps24* Δ *doa4* Δ affectée pour le complexe ESCRTIII et pour *Doa4p* (Amerik et al. 2000). Malgré la perte de fonction de *Doa4p*, nous avons observé un recyclage de *Fur4-GFP* dans *vps24* Δ *doa4* Δ comparable à celui observé dans *vps37* Δ en utilisant le protocole de CS/ CA (NP). Nous avons également obtenu le même résultat après construction de la souche double mutante pour *VPS37* et *DOA4* (figure 39). Comme d'autres isopeptidases pourraient dé-ubiquitiner les cargos endocytés dans les mutants Classe E (Amerik et al. 2000), nous avons utilisé une stratégie alternative pour évaluer le rôle de la dé-ubiquitination pendant le recyclage. Alors qu'une construction dans laquelle les lysines cibles de l'ubiquitination sont mutées en arginines (*Fur4-KR*) est bloquée à la membrane plasmique (Marchal et al. 2000) (Fig. 39.B), la fusion en phase d'une ubiquitine à cette construction (Ub-*Fur4-KR*, figure 39.A) permet son

internalisation constitutive et son incorporation dans les vésicules internes des MVBs (Blondel et al. 2004). Cette ubiquitine fusionnée en phase ne peut pas être clivée par les isopeptidases, nous en avons donc étudié le recyclage de cette chimère dans un contexte Vps CIE. Les Fig. 39.C et B montrent que Ub-Fur4-KR retourne efficacement à la membrane plasmique dans *vps37Δ*. La construction Ub-Fur4-KR recycle également vers la membrane plasmique dans le mutant *pep12Δ* depuis l'endosome précoce (NP).

L'ensemble de ces résultats indique que la dé-ubiquitination de Fur4p n'est pas une étape obligatoire à son recyclage dans les cellules Classe E. Cependant, nous ne savons pas si cette dé-ubiquitination a lieu ou pas pendant le processus.

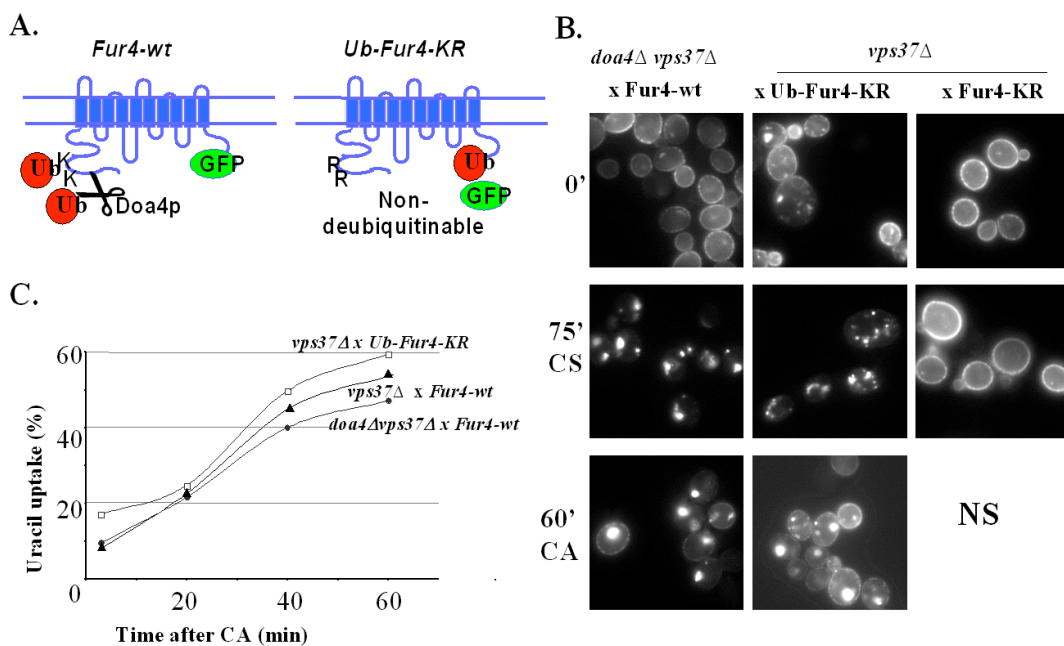


Figure 39 : La dé-ubiquitination de Fur4p n'est pas requise pour son recyclage

A. Représentation de deux variants de Fur4p utilisés au cours de cette expérience. Fur4-wt correspond à la construction utilisée dans les expériences précédentes. Les lysines cibles sont conjuguées à des molécules d'ubiquitine qui peuvent être clivées sous l'action de Doa4p. Le mutant Ub-Fur4-KR peut être endocyté mais l'ubiquitine fusionnée en phase ne peut pas être clivée. **B.** Des cellules *vps37Δ* transformées soit avec GAL-Fur4KR-GFP soit avec GAL-Ub-Fur4KR-GFP ainsi que des cellules *doa4Δ vps37Δ* transformées par GAL-Fur4-GFP (noté Fur4-wt) ont été traitées comme décrit à la figure 37. Les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence à t=0 (0'), après 75 minutes de carence en carbone (75'CS) et 30 min après ajout de carbone (30'CA). Fur4-KR reste stable à la membrane plasmique après carence carbonée, la phase de recyclage n'est donc pas réalisable (NS). **C.** L'activité uracile perméase a été mesurée dans des cellules *vps37Δ* transformées par GAL-Ub-Fur4KR-GFP (carré blanc), *vps37Δ* transformées par GAL-Fur4-GFP (noté Fur4-wt, triangle noir) ainsi que des cellules *doa4Δ vps37Δ* transformée par GAL-Fur4-GFP (cercle noir). L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 20 minutes après ajout de glucose. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'entrée initiale avant la carence.

Fur4p ne transite pas par l'appareil de Golgi pendant son retour vers la membrane plasmique

Snc1p traverse l'endosome précoce et l'appareil de Golgi au cours de sa route vers la membrane plasmique. Nous avons testé si Fur4p et Snc1p suivent la même route de recyclage dans les mutants Classe E. Tout d'abord, nous avons suivi le recyclage de GFP-Snc1p ces mutants. La distribution à l'équilibre et le niveau de phosphorylation de GFP-Snc1p reflètent l'efficacité du recyclage de cette SNARE (Lewis et al. 2000; Galan et al. 2001). Dans les cellules sauvages, GFP-Snc1p est majoritairement à la membrane plasmique et hyperphosphorylée. Dans des souches déficientes pour la fusion des vésicules issues de l'endosome précoce et destinées à l'appareil de Golgi, comme *vps51Δ* (VFT), Snc1p est située dans des structures intracellulaires sous forme non phosphorylée (Fig. 40.A). GFP-Snc1p est à la membrane et semble normalement phosphorylée dans les mutants Classe E (Fig. 40.A), indiquant que le dysfonctionnement de la machinerie ESCRT ne modifie pas son recyclage, contrairement à ce qui a été observé pour Fur4p. Ce résultat est en accord avec les données publiées montrant que la distribution de Snc1p est normale dans le mutant Vps CIE pour l'ATPase Vps4p (Lewis et al. 2000).

Nous avons comparé le recyclage des deux protéines en étudiant si la délétion de gènes codant pour des protéines impliquées dans le recyclage de GFP-Snc1p inhibait également le recyclage de Fur4-GFP. Pour cela, nous avons construit différents doubles mutants déficients pour Vps37p et pour une protéine requise pour le recyclage de Snc1p : Rcy1p (protéine à F-box), Vps51p (VFT) ou Sec14p (sortie de l'appareil de Golgi). Comme attendu, tous les double mutants sont déficients pour le recyclage de Snc1p (Fig. 40.A et NP). Nous avons alors testé la capacité de ces souches à internaliser et recycler Fur4p après ajout de rapamycine. Les cellules *vps37Δvps51Δ* et *vps37Δrcy1Δ* ont été cultivées à 30°C pendant toute l'expérience (Fig. 40.C) alors que *vps37Δsec14-1* ts a été cultivée à 24°C puis transférée à 37°C 15 min avant l'addition de rapamycine (Fig. 40.B). L'endocytose de Fur4p dans un *WT* et *vps37Δ* est plus rapide à 37°C qu'à 30°C (comparez Fig. 40.B et C). Aucun des doubles mutants ne présentent une cinétique d'entrée de l'uracile qui diffère de celle de *vps37Δ* (Fig. 40.B et C). Des résultats similaires ont été obtenus avec le protocole de suivi du recyclage par CS puis CA (NP). Donc, la machinerie impliquée dans le recyclage de Fur4p dans les mutants *vps* Classe E diffère clairement de celle du recyclage de Snc1p suggérant que la perméase ne traverse pas l'appareil de Golgi sur sa route vers la membrane plasmique.

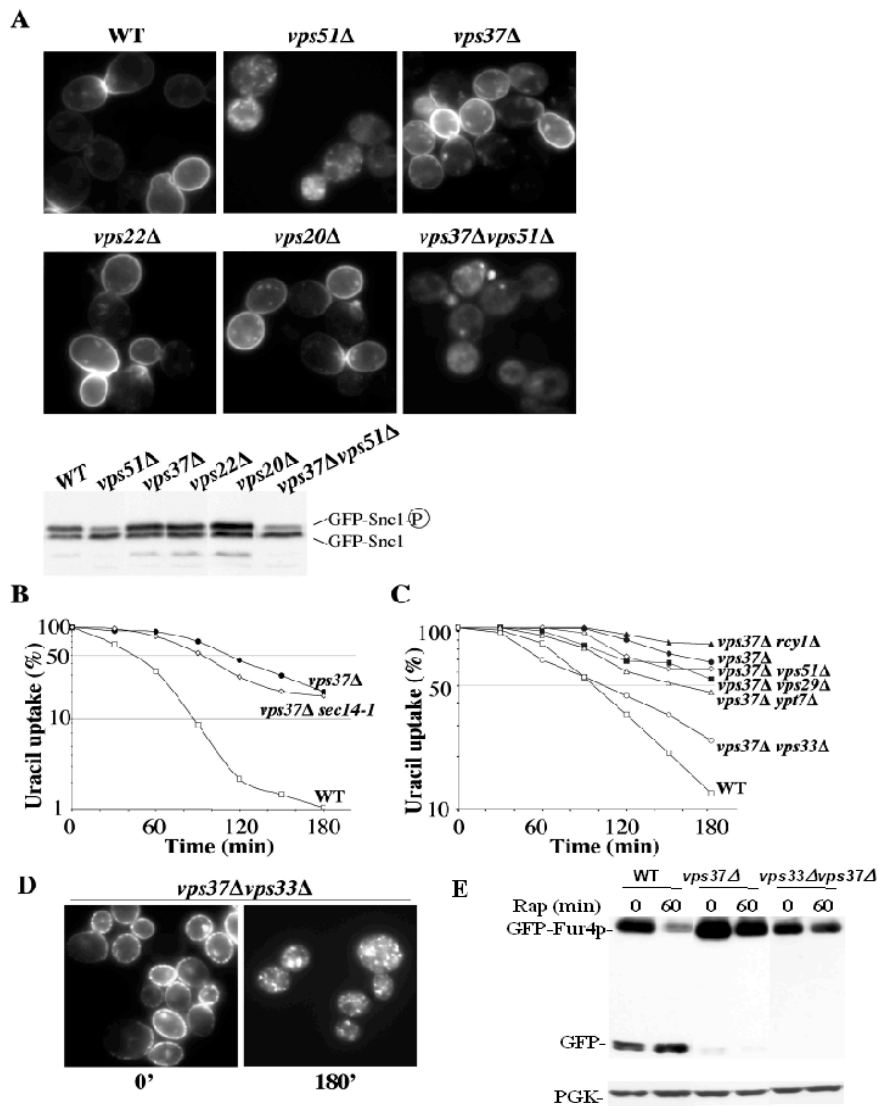


Figure 40: Fur4p et Snclp suivent des routes de recyclage différentes

A. Des levures WT, *vps51Δ* (VFT), *vps37Δ* (ESCRT I), *vps22Δ* (ESCRT II), *vps20Δ* (ESCRT III) et *vps37Δvps51Δ* (ESCRT I, VFT) transformées avec *tpi-GFP-Snc1* sont cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance. La localisation de GFP-Snc1p est suivie par microscopie à fluorescence (en haut). Des extraits protéiques sont préparés et la phosphorylation de GFP-Snc1p est suivie en western immunoblotting dans les souches indiquées (en bas). **B.** Des cellules WT (carré blanc), *vps37Δsec14-1* (losange blanc) et *vps37Δ* (cercle noir) transformées avec *GAL-Fur4-GFP* ont été cultivées à 24°C et transférées à 37° 15 min avant l'addition de la rapamycine. L'entrée d'uracile est mesurée toutes les trente min pendant 3 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'entrée à $t=0$ en échelle semi-log. **C.** Des cellules WT (carré blanc), *vps37Δ* (cercle noir), *vps37Δrcy1Δ* (triangle noir), *vps37Δypt7Δ* (triangle blanc), *vps37Δvps51Δ* (losange blanc), *vps37Δvps29Δ* (carré noir) et *vps37Δvps33Δ* (cercle blanc) transformées avec *GAL-Fur4-GFP* sont cultivées, induites et traitées avec de la rapamycine comme décrit en Fig. 3. **D.** Les cellules *vps37Δvps33Δ* ont été collectées aux temps indiqués après ajout de rapamycine et visualisées au microscope à fluorescence. Remarquez que Fur4-GFP est bloquée dans des structures intracellulaires dans des cellules *vps37Δvps33Δ* et est absent des membranes plasmiques. **E.** Des extraits protéiques ont été préparés à $t=0$ et 60' après ajout de rapamycine à partir des cellules WT, *vps37Δ* et *vps33Δvps37Δ* décrites en C. Fur4-GFP a été détectée avec un anti-GFP. La charge a été vérifiée à l'aide d'un anticorps anti-PGK1.

Le recyclage de Fur4p observé dans *vps37Δ* doit se faire à partir du compartiment CIE, qui correspondrait à un endosome tardif exacerbé. Nous avons donc étudié si la machinerie de sortie depuis l'endosome tardif était requise pour le recyclage de Fur4p. Les cargos peuvent sortir de l'endosome tardif vers le TGN de manière dépendante du rétromère, ou vers la vacuole de façon dépendante de Ypt7p et du complexe VpsCIC (Whyte and Munro 2002). Dans les cellules délétées pour *VPS37* et *VPS29* (sous-unité du rétromère), Fur4p recycle en présence de rapamycine (Fig. 40.C). Ce résultat confirme que la perméase internalisée ne passe pas par l'appareil de Golgi pendant sa route à la membrane plasmique. De manière similaire, le recyclage de Fur4p n'est pas inhibé dans *ypt7Δvps37Δ* suggérant que la perméase ne recycle pas depuis la membrane vacuolaire (Fig. 40.C). Au contraire, la délétion de *VPS33* dans les cellules *vps37Δ* inhibe partiellement le recyclage de Fur4p (Fig. 40.C). Dans $\Delta vps37\Delta vps33$, trois heures après ajout de rapamycine, Fur4p est bloquée dans des petites structures intracellulaires depuis lesquelles elle ne peut pas recycler vers la membrane plasmique mais où elle n'est pas dégradée (Fig. 40.D et E). Ce résultat implique que le complexe VpsCIC pourrait être impliqué directement ou indirectement dans le recyclage des protéines membranaires.

Défaut de recyclage général dans les mutants VpsCIC

Le complexe VpsCIC a été initialement décrit comme un acteur dans la fusion homotypique entre vacuoles et la fusion hétérotypique entre LE et vacuole. Sur la base des phénotypes similaires des mutants *vps* Classe C et de souches affectées à la fois dans le trafic entre Golgi et LE (mutants Vps classe D) et le transport LE à vacuole (mutants Vps classe B), il a été proposé que le complexe VpsCIC soit impliqué dans le trafic vers le LE (Srivastava and Jones 1998; Peterson and Emr 2001; Subramanian et al. 2004). Etant donnée cette double fonction, le défaut de recyclage dans les mutants *vps* de classe C pourrait résulter d'un blocage de la perméase dans l'endosome précoce. Pourtant, nous avons montré que Fur4p est capable de recycler depuis l'EE dans *pep12Δ* (Fig. 4). Cette contradiction apparente pourrait s'expliquer si les structures endosomales précoces dans les mutants *vps* Classe C étaient modifiées et ne permettaient pas le recyclage. Pour tester cette hypothèse, nous avons regardé le recyclage de GFP-Snc1p qui est connue pour recycler depuis l'EE dans les mutants Vps Classe C. GFP-Snc1p est bloquée dans des structures intra-cellulaires sous forme non phosphorylée dans tous les mutants du complexe VpsCIC testés (*vps33Δ*, *vps16Δ*, *vps18Δ*, *vps11Δ*) alors qu'il est principalement à la membrane plasmique dans un *WT* (Fig. 41.A et NP). Pour confirmer que le défaut de recyclage est général depuis l'endosome précoce dans les mutants *vps* classe C, nous avons quantifié le recyclage du colorant FM4-64 préalablement internalisé (Wiederkehr et al. 2000). La cinétique de recyclage du FM4-64 est ralentie dans la souche *vps33Δ* par rapport au *WT* (Fig. 41.B), montrant qu'un défaut dans la machinerie VpsCIC inhibe également le recyclage des membranes.

Donc, les cellules déficientes pour le complexe VpsCIC ont des défauts de recyclage multiples. Compte tenu des deux fonctions connues pour ce complexe, le défaut de recyclage pourrait donc résulter d'un défaut de trafic vers ou à partir du LE ou des deux défauts simultanés. De manière alternative, ces phénotypes pourraient refléter une troisième fonction encore inconnue pour ce complexe dans le transport des membranes des endosomes vers la membrane plasmique. Pour déterminer la bonne hypothèse, nous avons étudié le recyclage de Snc1p dans des cellules spécifiquement déficientes pour l'une des deux étapes : trafic vers le LE (*pep12Δ*), ou à partir du LE (*vam3Δ* et *ypt7Δ*), ou les deux (*pep12Δ vam3Δ*). Comme attendu, GFP-Snc1p est principalement à la membrane plasmique dans des cellules *pep12Δ* présentant un défaut dans le trafic EE, LE (Fig. 41.C, (Lewis et al. 2000)). De façon similaire, GFP-Snc1p est normalement recyclée vers la membrane plasmique dans des cellules déficientes pour la syntaxine vacuolaire Vam3p (Fig. 41.C) ou dans *ypt7Δ* (NP), présentant un défaut dans le transport entre LE et vacuole. Comme précédemment publié, une souche délétée simultanément pour *PEP12* et *VAM3* est une phénocopie de cellules *vps* Classe C en termes de fragmentation vacuolaire, thermosensibilité et transport des cargos vacuolaires (NP et (Peterson and Emr 2001)). De manière intéressante, le recyclage de GFP-Snc1p (Fig. 41.C) et du FM4-64 (NP) est altéré dans *pep12Δvam3Δ*, phénotype équivalent à celui des mutants *vps* Classe C (comparer Fig. 41.A et C). Ce résultat indique que le défaut de recyclage observé dans les mutants *vps* Classe C est un effet secondaire des pertes de fonction simultanées des fonctions du complexe VpsCIC dans le trafic vers et à partir du LE. Ce double défaut pourrait générer des compartiments endosomaux précoces incapables de permettre tout trafic aval des cargos vers le LE ou l'appareil de Golgi. En conclusion, même si le complexe Vps de Classe C est requis pour le recyclage de Fur4p, son rôle serait de maintenir des compartiments endosomaux fonctionnels.

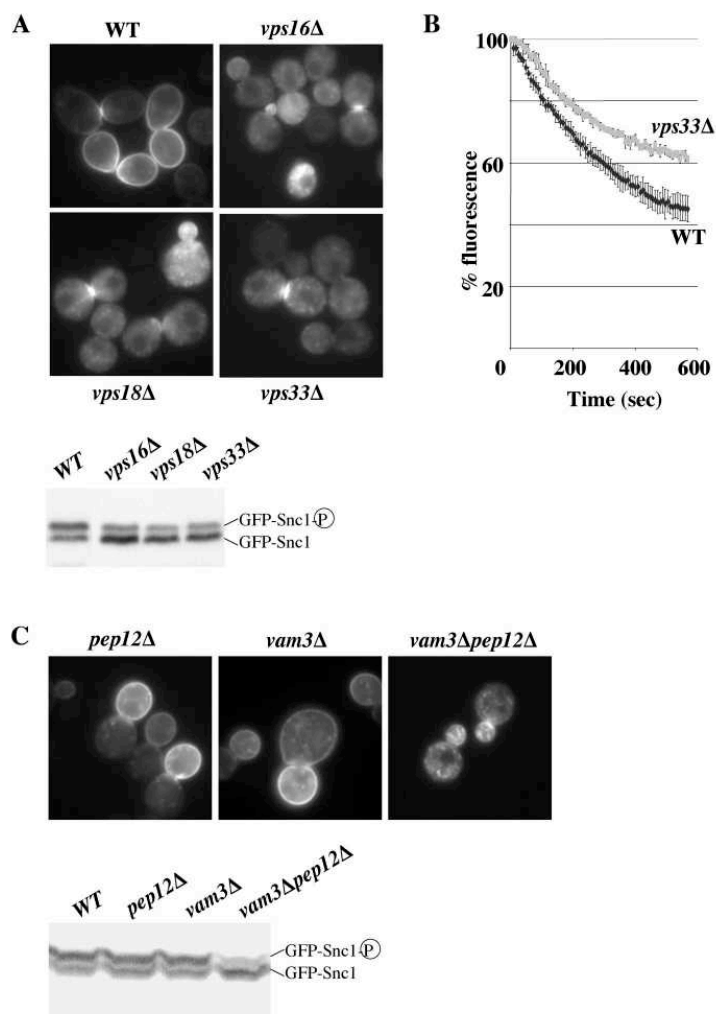


Figure 41 : Multiple défauts de recyclage dans les mutants Vps de classe C

A. Les cellules WT et les mutants *vps* de classe C, *vps16Δ*, *vps18Δ*, *vps33Δ*, transformées avec *tpi-GFP-Snc1* ont été cultivées et le recyclage de *Snc1p* a été étudié comme décrit en Fig. 40.A. *B.* La capacité des cellules WT et *vps33Δ* à recycler le colorant fluorescent FM4-64 a été quantifiée comme décrit dans les matériels et méthodes. La fluorescence a été mesurée en triplicat pour chaque souche, toutes les 6 secondes pendant 10 minutes au spectrofluorimètre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fluorescence initiale. *C.* Les mutants *pep12Δ*, *vam3Δ* et *vam3Δpep12Δ* transformés avec *tpi-GFP-Snc1* ont été cultivés et le recyclage de *GFP-Snc1p* a été analysé comme décrit en Fig. 40.A. Remarquez que le défaut de recyclage de *GFP-Snc1p* dans *vam3Δpep12Δ* est similaire à celui des mutants *vps* Classe C.

I.C.2. Identification de la machinerie impliquée dans le recyclage de Fur4p

Nous avons ensuite cherché à identifier la machinerie mise en jeu dans cette nouvelle voie de trafic empruntée par Fur4p.

a. Crible génétique

Dans la levure *S.cerevisiae*, sur les 6200 gènes prédits, environ 75% ne sont pas essentiels à la viabilité. La collection dite « k-o » des 4800 souches chacune délétées pour un des gènes de levure non-essentiels à la viabilité est disponible. Une technique (SGA, synthetic genetic array) de croisements robotisés basée sur différents marqueurs de sélection a également été mise au point (Tong et al. 2001). L'ensemble de ces outils permet des approches globales, comme des cribles de colétalité ou des cribles suppresseurs d'un phénotype facilement évaluable à large échelle et dû à un nombre limité de causes.

D'après les expériences présentées en fig 37, le recyclage accru de Fur4p dans des mutants ESCRTs provoquerait une hypersensibilité de ces souches au 5-FU (fig. 33). Nous avons supposé que, par conséquent, des levures doublement déficientes pour ESCRT et pour un élément nécessaire au recyclage de Fur4p devraient retrouver un niveau de résistance accru au 5-FU. Un crible visuel basé sur la résistance au 5-FU de souches délétées pour *VPS37* et pour l'un des gènes non-essentiels devrait donc nous permettre d'identifier la machinerie du recyclage de Fur4p.

Pour ce crible de suppression de l'hypersensibilité au 5-FU d'un mutant déficient pour ESCRT, nous avons croisé *vps37Δ* avec la « collection k-o » selon la méthode SGA. Après sélection des 4800 doubles mutants en duplicat répartis sur 26 boîtes, nous avons tout d'abord identifié les gènes dont la délétion combinée à celle de *VPS37* conduit à une létalité synthétique. En effet, ce phénotype est intéressant car la létalité conférée par la délétion simultanée de deux gènes traduit souvent l'implication des deux facteurs codés par ces gènes dans des voies parallèles d'un processus similaire essentiel à la viabilité (Tong et al. 2004). 156 souches *vps37ΔyyyΔ* sont non viables. Ce nombre très élevé s'explique par le fait que la souche *vps37Δ* est sensible aux conditions utilisées lors de la méthode SGA. Ainsi, 4 fois sur 8, une colétalité est observée à l'issue des étapes de la méthode SGA quand *vps37Δ* est croisé avec un sauvage, il y a donc un fort taux de faux positifs (C. Boone, communication personnelle). Afin de vérifier la létalité synthétique, il aurait été nécessaire de disséquer les tétrades, ce qui est long quand on s'intéresse à 156 souches candidates, nous avons donc choisi de ne pas exploiter ces données.

Nous avons testé la résistance des 4800 doubles mutants au 5-FU (5μM). Une boîte est présentée à titre d'exemple à la fig 42 A. Une analyse visuelle de la taille des colonies a été effectuée. Un seuil

arbitraire de croissance a été fixé au-dessus duquel l'hypersensibilité du mutant *vps37Δ* au 5-FU a été considérée supprimée par la seconde délétion présente. 24 souches candidates ont ainsi été isolées. La sensibilité de ces souches a alors été vérifiée par test en gouttes (NP). A l'issue de cette vérification, la résistance au 5-FU de 9 souches a été confirmée (fig. 42 B). Le recyclage de Fur4p a alors été testé directement dans ces souches par des expériences de carence carbonée/ ajout de carbone (NP et fig. 43).

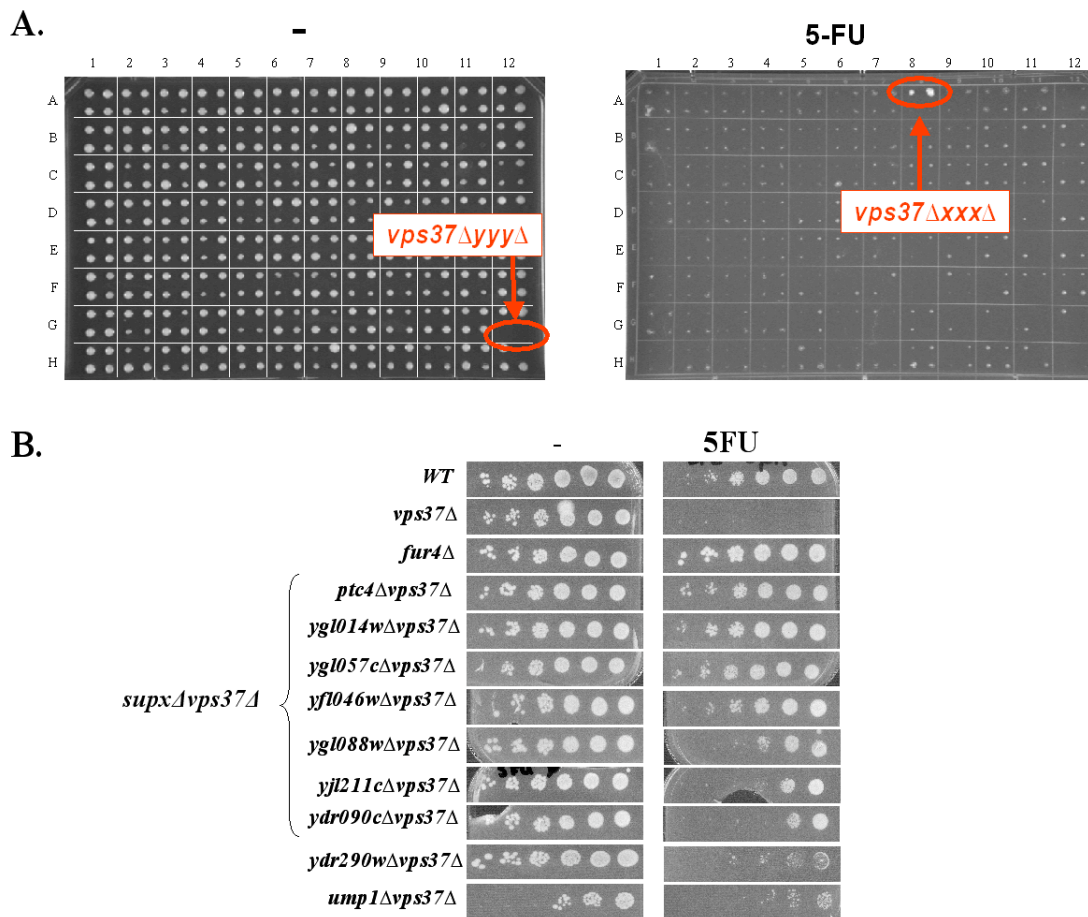


Figure 42 : Crible 5-FU

A. Exemple de boîte du crible 5-FU. Croissance des doubles mutants sur boîte sans (-) et avec 5µM 5-FU. Un exemple de souche *vps37ΔxxxΔ* résistante au 5-FU est entouré parmi les 24 isolés sur l'ensemble de la collection. Un exemple de souche *vps37ΔyyyΔ* où la délétion de YYY est colétale avec celle de VPS37 est entouré parmi les 156 présents sur l'ensemble de la collection. **B.** Les 24 souches doubles mutantes candidates ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance. Après dilution en série, elles ont été déposées sur boîte sans (-) et avec 5µM 5-FU. Sur les 24 candidats, neuf présentent une résistance accrue avérée au 5FU après tests en gouttes, les autres ne sont pas représentés.

Sur les neuf souches, 7, notées *supxΔvps37Δ* (avec *x* de 1 à 7) ont une résistance très importante au 5-FU (fig. 42 B). Ces souches présentaient un phénotype apparemment très intéressant : Fur4p rejoint le lumen vacuolaire quand les cellules sont soumises à une carence carbonée (NP). Il semble donc que le phénotype dit classe E soit supprimé dans ces souches. En utilisant différentes approches, nous avons démontré que le compartiment classe E était absent dans ces souches (FM4-64, microscopie électronique) et que les cargos de la voie *VPS* étaient normalement acheminés à la vacuole (CPY, Phm5p). Cependant, même si ces souches étaient bien haploïdes, elles avaient subi une duplication partielle de leur génome car le gène *VPS37* à son locus était bien délété mais une copie sauvage du gène existait à un autre locus dans le génome, permettant la formation normale du MVB. Ce type de duplication semble favorisé par les conditions utilisées pour l'obtention des doubles mutants par la méthode SGA (C. Kraft, communication personnelle). Même si il s'agit d'un événement rare, la sélection des souches résistantes au 5FU nous a conduit à le sélectionner préférentiellement car la présence de *VPS37* permettait le retour d'une croissance en présence de 5-FU de même niveau que celle de la souche *WT*. Nous avons donc abandonné l'étude de ces 7 doubles mutants qui étaient en définitive des faux-positifs.

Deux autres doubles mutants, *ydr290wΔvps37Δ* et *ump1Δvps37Δ*, présentent un niveau de résistance au 5-FU supérieur à la souche *vps37Δ* (fig. 42 B) et un niveau de recyclage de Fur4p réduit (fig. 43 A). Nous avons donc pu identifier par ce crible génétique deux protéines Ump1p et Ydr290w dont l'absence affecte partiellement le recyclage de Fur4p.

Ump1p et Ydr290w sont-ils des facteurs généraux du recyclage ? Afin de répondre à cette question, nous avons étudié le recyclage de Snc1p depuis l'endosome précoce dans des souches délétées pour *YDR290W* ou *UMP1* (fig 43.B). Snc1p est majoritairement à la membrane plasmique sous forme phosphorylée dans les cellules *ydr290wΔ* et *ump1Δ* comme dans des cellules sauvages. Donc, Ump1p et Ydr290w ne sont pas requises pour le recyclage de Snc1p, suggérant que ces deux facteurs pourraient intervenir spécifiquement dans le recyclage de Fur4p ou dans le recyclage depuis un compartiment endosomal tardif.

Ump1p intervient dans l'assemblage du protéasome (Ramos et al. 2004), il nous semble probable que l'effet de cette protéine sur le recyclage de Fur4p soit plutôt indirect *via* la dégradation d'une protéine intervenant dans le trafic de Fur4p par exemple. Afin de savoir si Ump1p pourrait jouer un rôle direct dans le recyclage de Fur4p, nous avons étudié la localisation d'une forme étiquetée à la GFP. Ump1p est présente dans le cytoplasme et dans le noyau (colocalisation avec le DAPI, un marqueur nucléaire, NP) renforçant l'hypothèse d'un rôle indirect (fig 43. C).

Ydr290w n'a pas de fonction connue pour l'instant et il s'agit d'une « ORF douteuse » d'après les bases de données. Les seules données disponibles indiquent que cette protéine interagirait en double hybride avec Vps2p un membre de la machinerie ESCRT suggérant un rôle direct de Ydr290w dans le recyclage de Fur4p. Toutefois, cette protéine est naturellement très peu exprimée, nous n'avons donc pas pu localiser la protéine endogène. L'étude de sa localisation et de sa fonction nécessite donc de la

sur-exprimer, mais nous avons constaté que cette surexpression est toxique rendant très difficile la suite du travail. Compte tenu de ces difficultés et des doutes sur cette ORF, nous n'avons pas continué les investigations la concernant.

Nous avons en effet décidé d'arrêter cette partie du projet pour nous concentrer sur une approche gènes candidats.

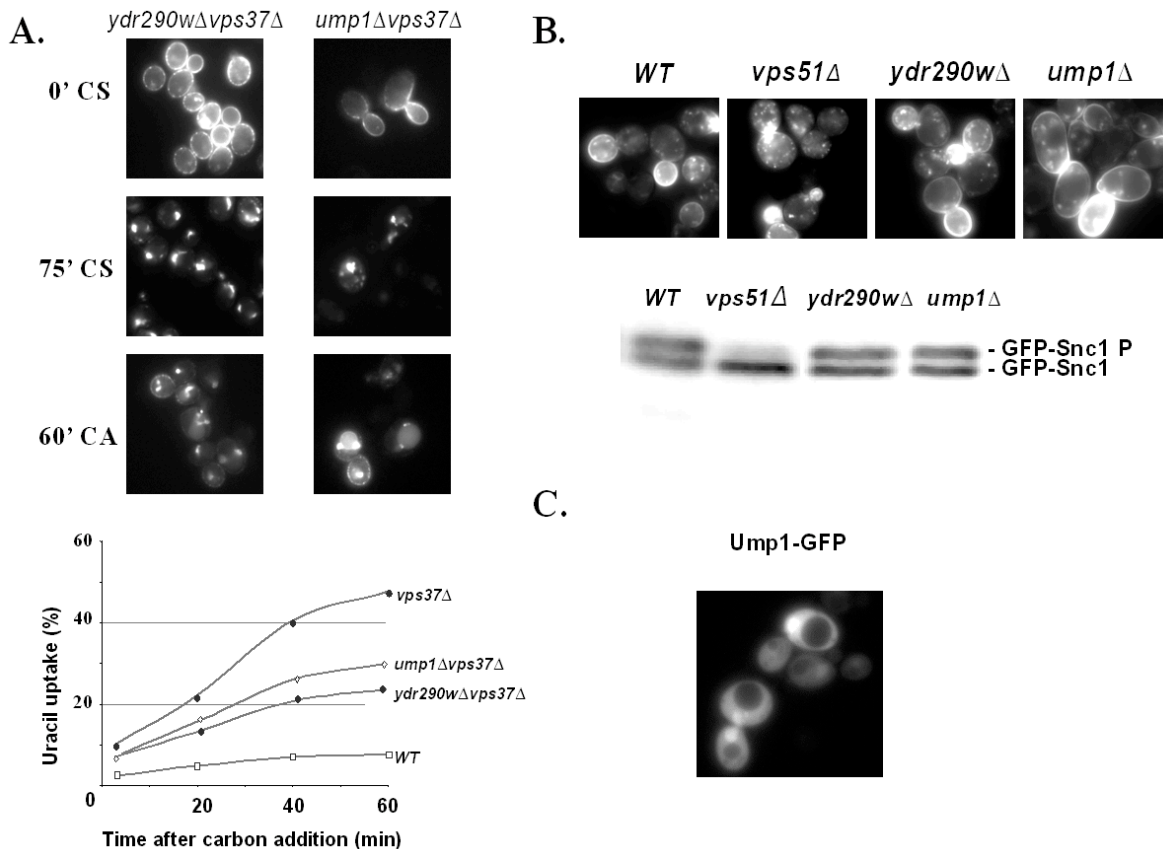


Figure 43 : Etude de Ydr290w et Ump1p

A. Des cellules WT (carré blanc), *vps37Δ* (cercle noir), *ydr290wΔvps37Δ* (losange noir) et *ump1Δvps37Δ* (losange blanc) transformées par GAL-Fur4-GFP ont été cultivées à 24°C et la synthèse de Fur4-GFP a été induite comme décrit en Fig 37. A $t=0$, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase puis du glucose est ajouté 75 minutes après. Les cellules ont été visualisées au microscope à fluorescence à $t=0$ (0'), après 75 minutes de carence en carbone (75'CS) et 60 min après ajout de carbone (60'CA). L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 20 minutes après ajout de glucose. Les résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'entrée initiale avant la carence. **B.** Les cellules WT et les mutants *vps51Δ*, *ump1Δ* et *ydr290wΔ*, transformées avec *tpi-GFP-Snc1* ont été cultivées et le recyclage de Snc1p a été étudié comme décrit en Fig. 40.A. par western blot et en fluorescence. **C.** Des cellules WT transformées par un plasmide exprimant Ump1-GFP sous contrôle du promoteur ADH ont été cultivées en milieu sélectif jusqu'en phase exponentielle de croissance et observées au microscope.

b. Approche gènes candidats :

Familles de protéines impliquées dans le trafic :

Nous nous sommes intéressés à 5 familles de protéines impliquées dans les voies de trafic en général : les adaptateurs de type GGAs, les petites GTPase de type RAB/Ypts, les nexines, les complexes d'attachement n'ayant pas encore été testés et les protéines à domaine EH. Nous avons testé le recyclage de Fur4p dans des souches doublement déficientes pour la machinerie ESCRT et chacun de ces candidats.

La levure compte 12 protéines de type RABs/Ypts. Ypt11p et 10p sont les seules RABs de levure à ne pas avoir de fonction attribuée dans les voies de trafic connues. Après construction des souches *ypt10Δvps37Δ* et *ypt11Δvps37Δ*, nous avons testé le recyclage de l'uracile perméase par une expérience de carence carbonée suivie d'ajout de glucose, identique à celle présentée en figure 37. Les résultats présentés en figure 44 indiquent que l'absence de Ypt10p ou Ypt11p n'altère pas le recyclage de Fur4p dans un contexte *vps37Δ*.

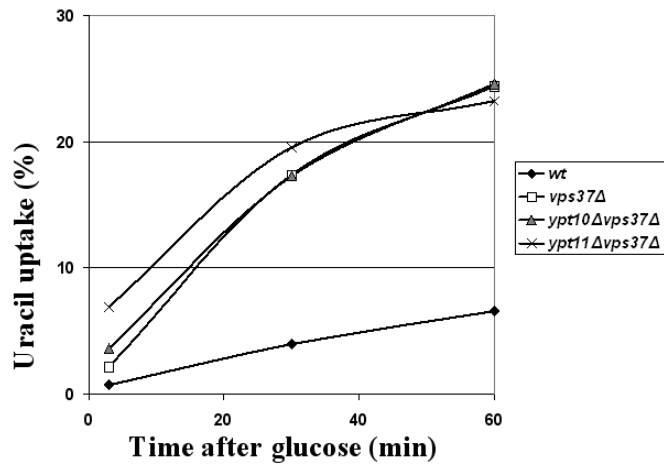
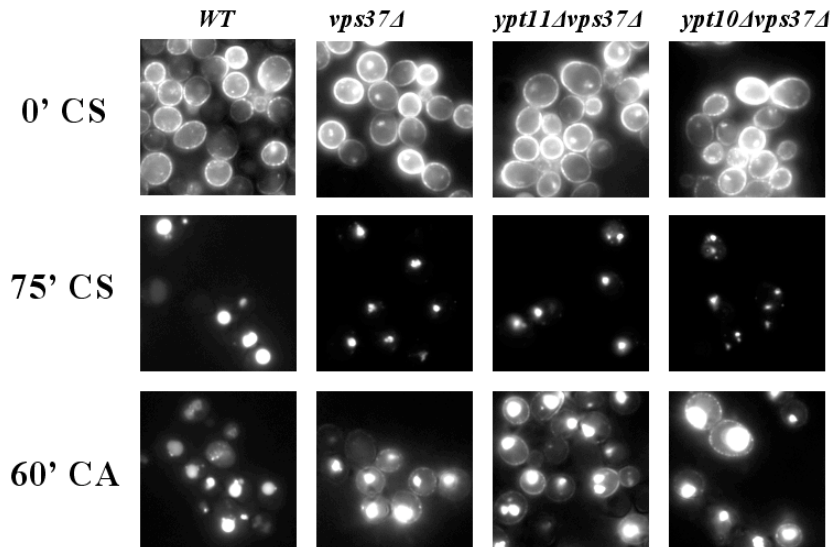


Figure 44 : Etude du rôle des RABs, Ypt10p et Ypt11p

A. Des cellules WT (losange noir), vps37Δ (carré blanc), ypt10Δvps37Δ (triangle gris) et ypt11Δvps37Δ (croix) transformées par GAL-Fur4-GFP ont été cultivées à 24°C et la synthèse de Fur4-GFP a été induite comme décrit en Fig 37. A t=0, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase puis du glucose est ajouté 75 minutes après. Les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence à t=0 (0'), après 75 minutes de carence en carbone (75'CS) et 60 min après ajout de carbone (60'CA). L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 30 minutes après ajout de glucose. Les résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'entrée initiale avant la carence.

Les Ggas, Gga1p et Gga2p sont des adaptateurs qui fonctionnent au niveau de l'appareil de Golgi et des endosomes. Nous avons étudié le recyclage de Fur4p dans les mutants *gga1Δvps37Δ* et *gga2Δvps37Δ* (fig 45). Fur4p recycle de manière identique en présence ou en absence de Gga1p ou Gga2p. Une redondance fonctionnelle ayant été décrite pour le rôle de Gga1p et Gga2p dans l'incorporation des cargos triés vers l'endosome au niveau de l'appareil de Golgi (Bonifacino and Glick 2004), il serait intéressant d'étudier les phénotypes de *gga1Δgga2Δvps37Δ*.

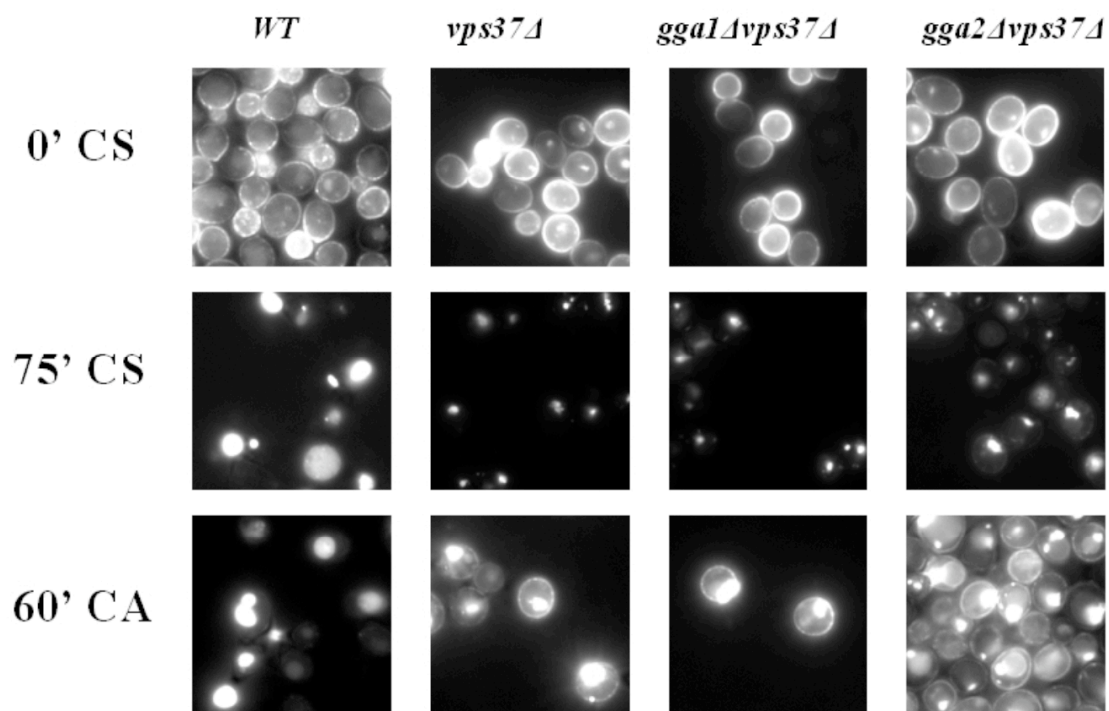


Figure 45 : Etude du rôle des Ggas, Gga1p et Gga2p

A. Des cellules WT, vps37Δ, gga1Δvps37Δ et gga2Δvps37Δ transformées par GAL-Fur4-GFP ont été cultivées à 24°C et la synthèse de Fur4-GFP a été induite comme décrit en Fig 37. A t=0, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase puis du glucose est ajouté 75 minutes après. Les cellules ont été visualisées au microscope à fluorescence à t=0 (0'), après 75 minutes de carence en carbone (75'CS) et 60 min après ajout de carbone (60'CA). Le dosage de l'activité de l'uracile perméase a également été effectué (NP).

Les nexines sont des acteurs généraux du trafic qui interagissent à la fois avec la machinerie de trafic et les cargos dont elles permettraient le tri vers la destination correcte. Il nous a donc semblé probable que des protéines de cette famille régulent le recyclage de Fur4p. La famille des nexines comporte 11 membres chez la levure, dont plusieurs n'ont pas de fonction caractérisée (Bonifacino and Rojas 2006). Vps5p et Vps17p font partie du complexe rétromère agissant à l'endosome tardif. Grd19p et Mvp1p localisent aussi aux endosomes tardifs. Les nexines Snx4p, Snx41p et Snx42p permettent le tri de Snc1p des endosomes précoces à l'appareil de Golgi. Aucune donnée fonctionnelle n'est disponible sur Ykr078w, Ypr097w, Ypt35p et Bph1p. Nous avons construit des doubles mutants pour *VPS37* et pour chacune de ces nexines. Le dosage de l'activité de l'uracile perméase pendant la phase de recyclage de Fur4p préalablement stockée au niveau du compartiment Classe E est présenté en figure 46. Aucune délétion ne bloque totalement le recyclage de Fur4p, cependant une inhibition partielle est observée en l'absence de Mvp1p, Ypr097w et Ypt35p. Au contraire, le niveau de recyclage dans *vps5Δvps37Δ* et *vps17Δvps37Δ* est identique à celui mesuré dans *vps37Δ* confirmant que le rétromère est dispensable pour le recyclage de Fur4p, ce qui avait été montré à la figure 40.

Des redondances fonctionnelles étant probables entre les nexines, il serait nécessaire de combiner les délétions afin de répondre à la question du rôle des nexines dans le recyclage de Fur4p.

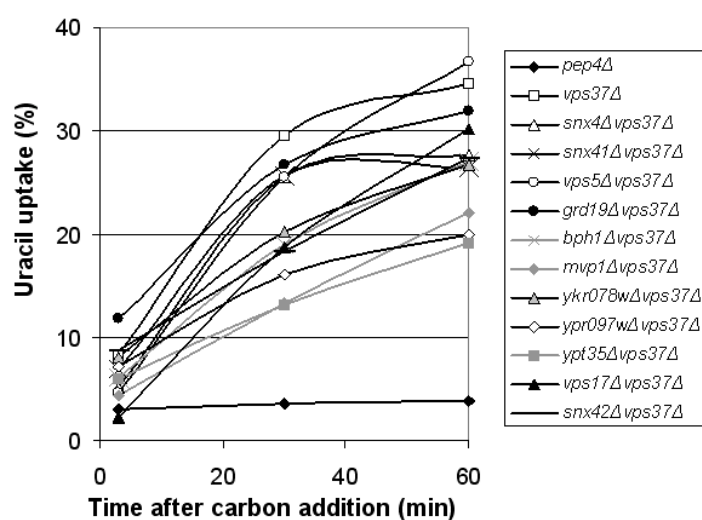


Figure 46 : Etude du rôle des nexines

Des cellules *pep4Δ* (losange noir), *vps37Δ* (carré blanc), *snx4Δvps37Δ* (triangle blanc), *snx41Δvps37Δ* (croix noire), *vps5Δvps37Δ* (cercle blanc), *grd19Δvps37Δ* (cercle noir), *bph1Δvps37Δ* (croix grise), *mvp1Δvps37Δ* (losange gris), *ykr078wΔvps37Δ* (triangle gris), *ypr097wΔvps37Δ* (losange blanc), *ypt35Δvps37Δ* (carré gris), *vps17Δvps37Δ* (triangle noir), et *snx42Δvps37Δ* (tiret noir) transformées par *GAL-Fur4-GFP* ont été cultivées à 24°C et la synthèse de Fur4-GFP a été induite comme décrit en Fig 37. A $t=0$, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase puis du glucose est ajouté 75 minutes après. Les cellules ont été visualisées au microscope à fluorescence (NP). L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 30 minutes après ajout de glucose. Les Résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'entrée initiale avant la carence.

Nous nous sommes également intéressés aux protéines à domaine EH. Les domaines EH sont des motifs d'interaction protéine-protéine d'une centaine d'acides aminés retrouvés dans des protéines impliquées dans l'endocytose ou le recyclage chez les mammifères (Santolini et al. 1999). Parmi les 5 protéines à domaines EH de levure, trois ont un rôle bien caractérisé dans l'étape d'internalisation de l'endocytose (End3p, Pan1p et Ede1p) et deux n'ont à ce jour pas de fonction attribuée dans le trafic (Irs4p et Tax4p). Ces deux protéines présentent une structure identique. Comme les protéines de la famille EHD impliquées dans le recyclage, elles ont un seul domaine EH en Cterminal. Nous avons donc testé le recyclage de Fur4p dans des souches triples mutantes pour *VPS37*, *IRS4* et *TAX4* (figure 47). Aucun défaut de recyclage n'a pu être observé dans les souches déficientes pour ces protéines. Cependant, plusieurs données expérimentales suggéraient que Irs4p et Tax4p pourraient avoir un rôle dans une autre voie de trafic : l'autophagie (voir chapitre II des résultats).

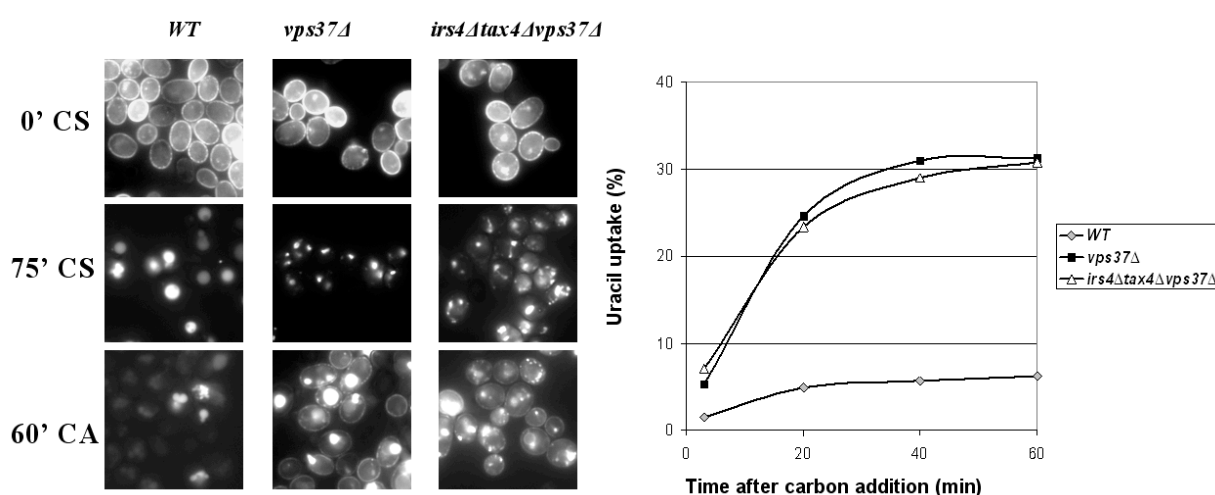


Figure 47 : Etude du rôle des protéines à domaine EH, Irs4p et Tax4p

A. Des cellules WT (losange gris), vps37Δ (carré noir), irs4Δtax4Δvps37Δ (triangle blanc) transformées par GAL-Fur4-GFP ont été cultivées à 24°C et la synthèse de Fur4-GFP a été induite comme décrit en Fig 37. A t=0, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase puis du glucose est ajouté 75 minutes après. Les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence à t=0 (0'), après 75 minutes de carence en carbone (75'CS) et 60 min après ajout de carbone (60'CA). L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 20 minutes après ajout de glucose. Les résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'entrée initiale avant la carence.

Parmi les complexes d'attachement potentiellement impliqués dans le recyclage, nous avons étudié précédemment le VFT et le complexe Vps de Classe C. L'exocyste, qui fait également partir de cette classe de protéines, permet la fusion des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique et des vésicules de recyclage issues de l'appareil de Golgi avec la membrane plasmique. Nous avons voulu savoir si ce complexe intervient également dans la fusion des vésicules de recyclage contenant Fur4p qui ne semblent pas issues de l'appareil de Golgi. Dans ce but, nous avons construit une souche délétée pour *VPS37* et exprimant une allèle thermosensible de *SEC6*. A température restrictive, le recyclage de Fur4p est bloqué dans *sec6vps37Δ*. Donc, l'étape de fusion des vésicules de recyclage de Fur4p avec la membrane plasmique nécessite également l'exocyste.

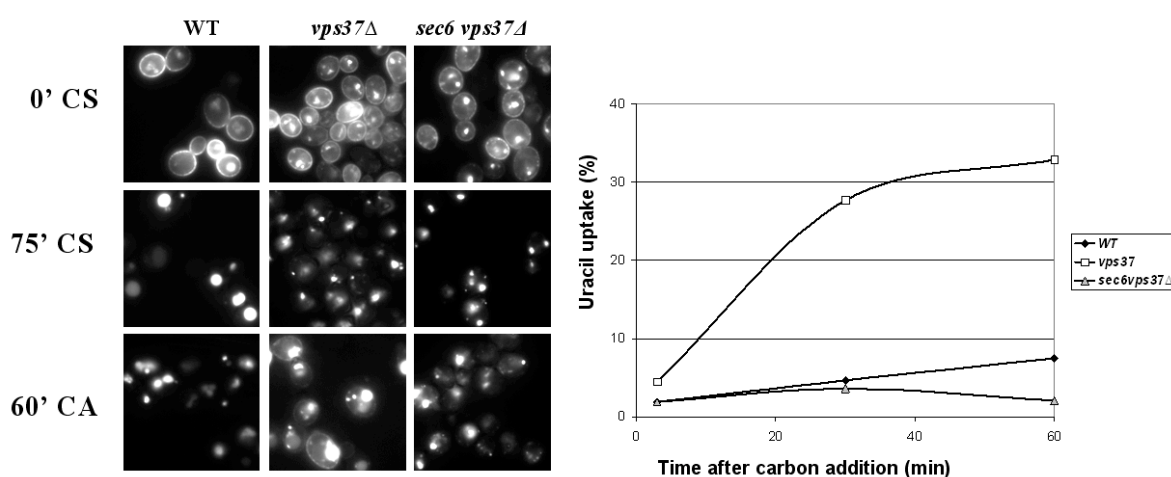


Figure 48 : Etude du rôle de l'exocyste

A. Des cellules WT (losange noir), *vps37Δ* (carré blanc), *sec6 vps37Δ* (triangle gris) transformées par *GAL-Fur4-GFP* ont été cultivées à 24°C et la synthèse de *Fur4-GFP* a été induite comme décrit en Fig 37. A $t=0$, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase. Après 60 minutes, les cellules sont transférées à 37°C puis du glucose est ajouté 15 minutes plus tard. Les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence à $t=0$ (0'), après 75 minutes de carence en carbone (75'CS) et 60 min après ajout de carbone (60'CA). L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 30 minutes après ajout de glucose. Les résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'entrée initiale avant la carence. Notez que le recyclage de *Fur4p* est plus faible à 37°C par rapport à 24°C.

Machinerie du recyclage de Chs3p et Gap1p

Au début de ce travail, seule la machinerie du recyclage de Snc1p était bien caractérisée. Au cours des dernières années, les machineries du recyclage de Gap1p et Chs3p ont fait l'objet de nombreuses publications qui ont été discutées pendant l'introduction aux chapitres III.E. et III.C.I.b. respectivement. Nous avons également étudié le rôle de ces facteurs dans le recyclage de Fur4p.

Le recyclage de la Chitine synthase Chs3p depuis le chitosome/ endosome précoce *via* l'appareil de Golgi fait intervenir Bch1p, Bch2p, Chs5p, Chs6p et Bud7p formant un nouveau type de manteau (Wang et al. 2006). Le niveau de recyclage de Fur4p dans *bch1Δvps37Δ*, *bch2Δvps37Δ*, *bud7Δvps37Δ*, *chs5Δvps37Δ*, *chs6Δvps37Δ* est similaire à celui mesuré dans *vps37Δ* (figure 49).

Donc, la machinerie du recyclage de la chitine synthase est différente de celle de Fur4p. Ce résultat était néanmoins prévisible. En effet, le recyclage de la chitine synthase emprunte une route (endosome précoce, Golgi) différente de celle de Fur4p.

Le groupe de Kaiser a publié récemment des études sur le recyclage de Gap1p dans un contexte génétique *vps classe E*, identique à celui utilisé pendant notre étude. Comme Fur4p, Gap1p s'accumule à la membrane plasmique dans ces mutants en raison d'un recyclage important. Le tri de Gap1p du compartiment classe E vers la membrane plasmique dans les mutants des complexes ESCRTs dépend de Lst4p, Lst7p et de Gtr1p et Gtr2p qui font partie d'un complexe GTPasique, le GSE (Gao and Kaiser 2006; Rubio-Teixeira and Kaiser 2006; Seaman 2006). Comme observé pour Fur4p, le recyclage de Gap1p vers la membrane plasmique ne nécessite pas les facteurs de transit depuis l'endosome tardif vers et à travers l'appareil de Golgi (Rétromère, Ypt6p qui interagit avec le VFT, Sec14p). Nous avons donc voulu savoir si le recyclage de Fur4p dépendait de Lst4p, Lst7p, Gtr1p et Gtr2p (fig. 50). Fur4p est capable de recycler dans *lst4Δvps37Δ*, *lst7Δvps37Δ*, *gtr1Δvps37Δ* et *gtr2Δvps37Δ*.

Donc, mêmes pour deux perméases recyclant depuis le compartiment classe E, des machineries spécifiques différentes semblent exister.

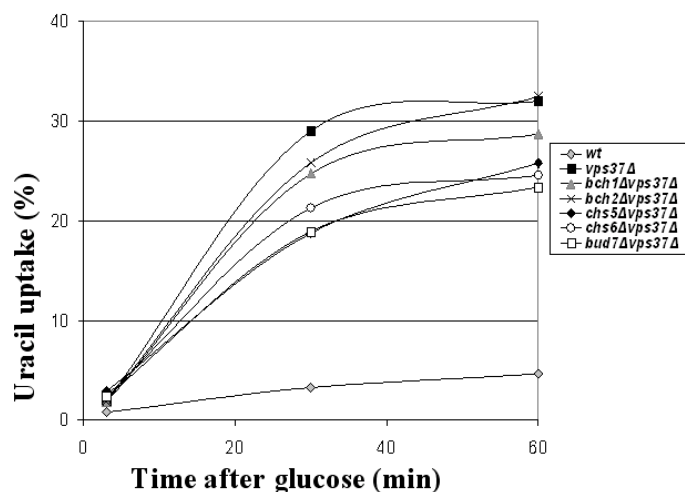
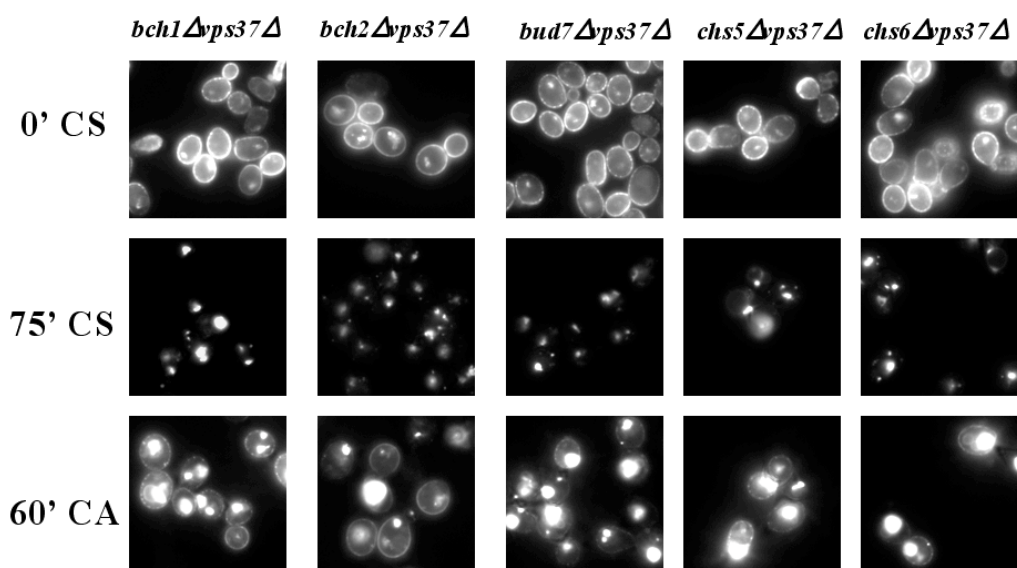


Figure 49 : Etude du rôle de la machinerie de recyclage de Chs3p

A. Des cellules WT (losange gris), *vps37Δ* (carré noir), *bch1Δvps37Δ* (triangle gris), *bch2Δvps37Δ* (croix), *chs5Δvps37Δ* (losange noir), *chs6Δvps37Δ* (cercle blanc), *bud7Δvps37Δ* (carré blanc) transformées par *GAL-Fur4-GFP* ont été cultivées à 24°C et la synthèse de *Fur4-GFP* a été induite comme décrit en Fig 37. A $t=0$, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase puis du glucose est ajouté 75 minutes après. Les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence à $t=0$ (0'), après 75 minutes de carence en carbone (75'CS) et 60 min après ajout de carbone (60'CA). L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 30 minutes après ajout de glucose. Les résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'entrée initiale avant la carence.

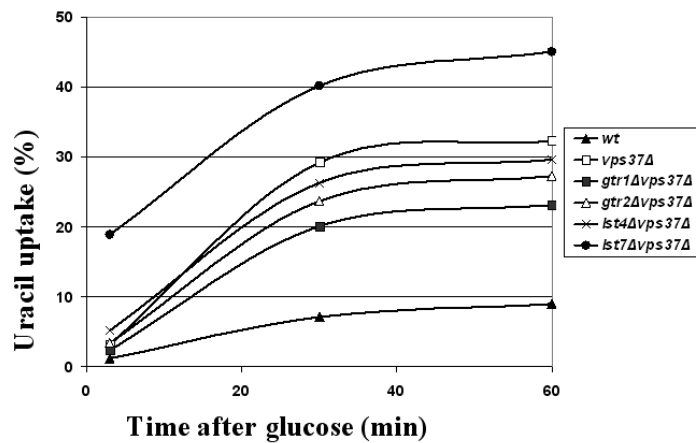
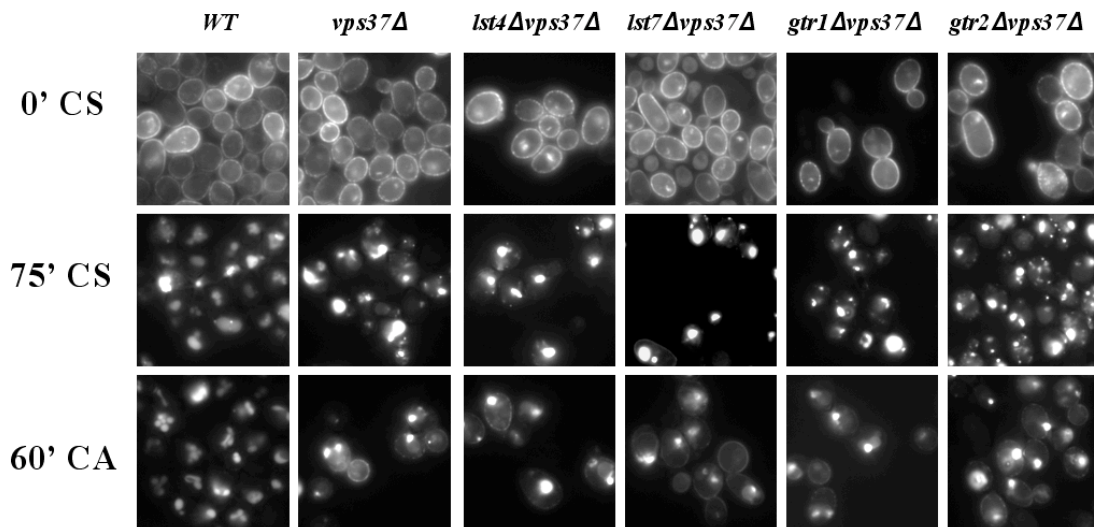


Figure 50 : Etude du rôle de la machinerie de recyclage de Gap1p

A. Des cellules WT (triangle noir), vps37Δ (carré blanc), gtr1Δvps37Δ (carré noir), gtr2Δvps37Δ (triangle blanc), Ist4Δvps37Δ (croix), Ist7Δvps37Δ (cercle noir) transformées par GAL-Fur4-GFP ont été cultivées à 24°C et la synthèse de Fur4-GFP a été induite comme décrit en Fig 37. A t=0, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase puis du glucose est ajouté 75 minutes après. Les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence à t=0 (0'), après 75 minutes de carence en carbone (75'CS) et 60 min après ajout de carbone (60'CA). L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 30 minutes après ajout de glucose. Les Résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'entrée initiale avant la carence. Notez que l'endocytose de Fur4p semble ralentie dans Ist7Δvps37Δ. L'activité de départ au moment de l'ajout de glucose est haute, le pourcentage de recyclage est similaire à celui des autres mutants.

c. *Recyclage depuis l'endosome précoce*

En parallèle, nous avons également étudié le recyclage de Fur4p quand son trafic endosomal est bloqué au niveau de l'endosome précoce ou de vésicules issues de l'endosome précoce. Dans ce but, nous avons utilisé un mutant de la SNARE Pep12p. Comme présenté en figure 37, Fur4p est efficacement recyclée vers la membrane plasmique dans les cellules *pep12Δ*.

Afin de déterminer la route du recyclage de Fur4p depuis l'endosome précoce, nous avons tenté de construire des souches délétées pour *PEP12* et pour des gènes codant des acteurs nécessaires au recyclage de l'endosome précoce à l'appareil de Golgi : Rcy1p et Vps51p. Mais, la combinaison de ces deux types de délétion s'est avérée létale pour les cellules (NP).

Plusieurs études suggèrent que les délétions de *VPS21* et *VPS8* bloqueraient le trafic des cargos endocytiques au niveau de l'endosome précoce ou dans des vésicules issues de ce compartiment qui ne peuvent pas fusionner à l'endosome tardif (Horazdovsky et al. 1996; Gerrard et al. 2000; Bowers and Stevens 2005). Vps21p/ Ypt21p est une GTPase homologue de Rab5 (Gerrard et al. 2000). Vps8p est une protéine associée aux membranes qui interagit avec Vps21p. Vps21p et Vps8p interagissent avec le complexe Vps CIC à l'étape de fusion à l'endosome tardif.

Nous avons tout d'abord comparé le recyclage de Fur4p dans les mutants *vps21Δ*, *vps8Δ* et *pep12Δ* (figure 51). Après carence carbonée, Fur4p est bloquée dans des nombreuses structures ponctuées dans les trois mutants. L'ajout de glucose induit un recyclage rapide d'environ 50% de la perméase en 60 minutes dans les cellules *pep12Δ* mais également *vps21Δ* et *vps8Δ*.

En utilisant un mutant de la GTPase Vps21p, nous avons étudié si le recyclage de Fur4p depuis un compartiment endosomal précoce faisait intervenir un passage par l'appareil de Golgi. Nous avons construit une souche déficiente pour Vps21p et pour Vps51p (VFT) et testé le recyclage de Fur4p dans ce contexte. Comme présenté en figure 51, le recyclage de Fur4p est largement diminué dans le mutant *vps21Δvps51Δ* par rapport au mutant *vps21Δ*, suggérant un passage par l'appareil de Golgi. Il est cependant à noter que dans ce mutant, les structures marquées par Fur4p en carence carbonée ne semblent pas être identiques à celles marquées dans les cellules *vps21Δ*. De plus, la croissance de ce mutant est plus lente que celle de *vps21Δ*. Ce résultat est donc à interpréter avec précaution.

Afin de confirmer que Fur4p passerait par l'appareil de Golgi, nous avons alors combiné la délétion de *VPS21* à une allèle thermosensible de *SEC14*, facteur requis pour la sortie du TGN. Après endocytose de Fur4p à température permissive, son recyclage a été étudié à température restrictive (fig. 52). Fur4p semble incapable de recycler dans *sec14 vps21Δ* confirmant que Fur4p en route vers la membrane plasmique transite par l'appareil de Golgi.

Les facteurs Vps51p et Sec14p semblent donc communs au recyclage de Fur4p et Snc1p. Lors de la fusion des vésicules de recyclage contenant Snc1p avec la membrane plasmique, l'exocyste est requis. L'est-il aussi pour le recyclage de Fur4p dans le contexte *vps21Δ* ?

Nous avons abordé cette question en étudiant le recyclage de la perméase après combinaison d'un allèle thermosensible de *SEC6* avec la délétion de *PEP12*. Les résultats présentés en figure 52 indiquent que la perte de fonction de Sec6p à température restrictive inhibe le recyclage de Fur4p.

Donc, Fur4p et Snc1p suivent la même route de recyclage depuis l'endosome précoce et utilisent une machinerie commune.

Ces résultats illustrent qu'un même cargo, Fur4p, peut suivre deux routes de recyclage différentes : l'une indépendante de l'appareil de Golgi depuis un compartiment de nature endosomale tardive et l'autre *via* l'appareil de Golgi depuis l'endosome précoce.

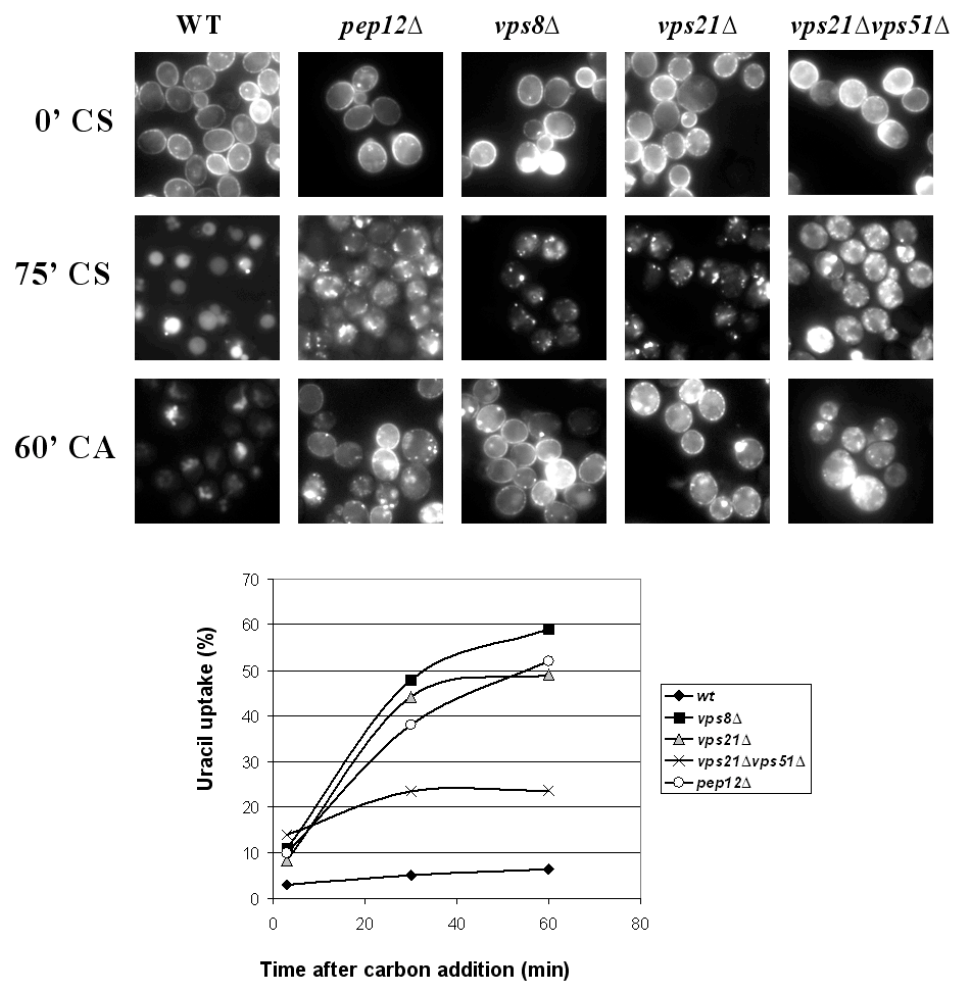


Figure 51 : Etude du recyclage depuis l'endosome précoce et du rôle du VFT

A. Des cellules WT (losange noir), *pep12*Δ (cercle blanc), *vps8*Δ (carré noir), *vps21*Δ (triangle gris), *vps51*Δ*vps21*Δ (croix) transformées par GAL-Fur4-GFP ont été cultivées à 24°C et la synthèse de Fur4-GFP a été induite comme décrit en Fig 37. A $t=0$, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase puis du glucose est ajouté 75 minutes après. Les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence à $t=0$ (0'), après 75 minutes de carence en carbone (75'CS) et 60 min après ajout de carbone (60'CA). L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 30 minutes après ajout de glucose. Les résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'entrée initiale avant la carence.

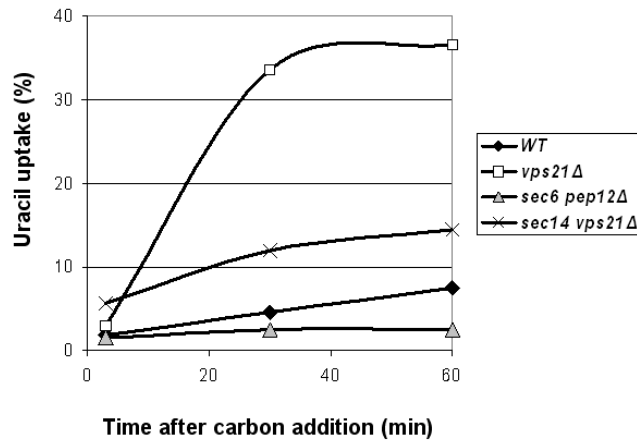
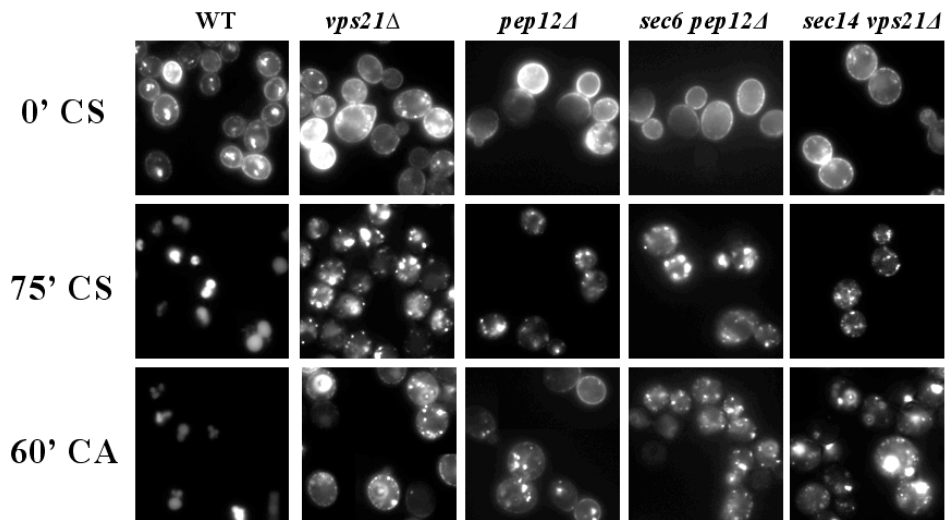


Figure 52 : Etude du rôle de Sec14p et de l'exocyste dans le recyclage depuis l'endosome précoce

A. Des cellules WT (losange noir), *pep12Δ* (NP), *vps21Δ* (carré blanc), *sec6 pep12Δ* (triangle gris), *sec14 vps21Δ* (croix) transformées par *GAL-Fur4-GFP* ont été cultivées à 24°C et la synthèse de *Fur4-GFP* a été induite comme décrit en Fig 37. A $t=0$, les cellules sont soumises à une carence en carbone (CS) pour induire l'endocytose de la perméase. Après 60 minutes, les cellules sont transférées à 37°C puis du glucose est ajouté 15 minutes plus tard. Les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence à $t=0$ (0'), après 75 minutes de carence en carbone (75'CS) et 60 min après ajout de carbone (60'CA). L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 30 minutes après ajout de glucose. Les résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'entrée initiale avant la carence. Notez que le recyclage de *Fur4p* est plus faible à 37°C par rapport à 24°C.

I.D. Discussion

Au cours de la première partie du travail ayant fait l'objet d'une publication (Bugnicourt et al. 2004), nous avons montré que l'accumulation de Fur4p à la membrane plasmique dans les mutants *vps* Classe E / ESCRTs était la conséquence d'un recyclage de la perméase. Ce recyclage ne requiert pas une dé-ubiquitination préalable de Fur4p. Sur sa route de retour vers la membrane plasmique, la perméase ne semble pas traverser l'appareil de Golgi, contrairement à Snc1p, cargo modèle du recyclage. Nous privilégions un modèle où Fur4p recyclerait directement du compartiment Classe E à la membrane plasmique. Au cours de nos efforts afin d'identifier des facteurs impliqués dans le recyclage de Fur4p, nous avons observé des phénotypes inattendus en l'absence du complexe *vps* Classe C : défaut de recyclage de Fur4p, Snc1p et du FM4-64.

Dans un 2^{ème} temps, nous avons employé une approche génétique globale basée sur l'hypersensibilité des mutants ESCRTs au 5-FU afin d'identifier la machinerie du recyclage de Fur4p. La délétion de facteurs requis pour le recyclage devait conduire à la suppression de cette hypersensibilité. Cependant, les résultats exploitables de ce crible ont été très peu nombreux pour des raisons que nous discuterons. Nous avons également mené une approche « gènes candidats » au cours de laquelle nous avons étudié l'effet de la délétion de gènes codant pour des RABs, des nexines, des Ggas, des protéines à domaine EH et des facteurs d'attachement sur le recyclage de Fur4p. Cette même approche nous a conduit également à tester si les machineries de recyclage de Gap1p et Chs3p intervenaient dans le recyclage de Fur4p. Cette approche ne nous a pas permis de mettre en évidence de nouveaux acteurs du recyclage de Fur4p, à l'exception de l'exocyste et des hypothèses seront également proposées afin d'expliquer cet échec.

Outre l'étude du recyclage de la perméase depuis le compartiment classe E qui a fait l'objet de la majeure partie des expériences menées, nous nous sommes également intéressés au recyclage de Fur4p depuis l'endosome précoce. Nous avons pu montrer qu'un blocage du trafic endosomal de Fur4p conduisait également à son recyclage vers la membrane plasmique. La route suivie au cours de ce recyclage semble similaire à celle suivies par les autres cargos recyclant à partir de cet organelle, *i.e.*, passage par l'appareil de Golgi.

Défaut d'internalisation ou recyclage accru ?

Chez la levure, les exemples de cargos accumulés à la membrane plasmique dans les mutants ESCRTs se sont récemment multipliés : Ste3p (Davis et al. 1993), Ste2-3p (Li et al. 1999), Pma1-7p (Luo and Chang 2000), Gap1p (Nikko et al. 2003; Gao and Kaiser 2006; Rubio-Teixeira and Kaiser 2006). Notre étude permet d'ajouter Fur4p à cette liste.

L'accumulation de récepteurs et de transporteurs à la membrane plasmique est classiquement interprétée comme la conséquence d'un défaut dans l'étape d'internalisation de l'endocytose. Alternativement, un tel phénotype pourrait résulter d'un recyclage actif. Nous montrons ici que l'accumulation de Fur4p à la membrane plasmique des mutants ESCRT n'est ni due à une sécrétion accrue ni à un défaut d'internalisation, mais plutôt à un recyclage important de la perméase. Ce résultat est en accord avec la démonstration que l'EGFR est efficacement recyclé vers la membrane plasmique dans les fibroblastes déficients pour tsg101/hVps23 (Babst et al. 2000).

La difficulté rencontrée pour faire la distinction entre défaut d'internalisation et recyclage accru, faute de protocole adéquat, est illustrée par plusieurs exemples publiés. Par exemple, le mutant *npi3/bro1Δ* a tout d'abord été décrit comme déficient pour la régulation négative à la membrane plasmique de la perméase générale à acides aminés Gap1p et de Fur4p (Springael et al. 2002). Puis, il a été démontré que la stabilisation de Gap1p à la membrane plasmique des cellules *bro1Δ* est perdue dans *bro1Δypt6Δ*, suggérant que Gap1p est efficacement internalisée et recyclée dans le mutant *bro1Δ* et que son retour à la membrane plasmique dépend de Ypt6p (Nikko et al. 2003).

Les études concernant Snc1p présentent le même écueil. En effet, une modification de sa distribution à l'équilibre peut résulter d'un défaut de sécrétion, d'une endocytose accélérée ou d'une absence de recyclage. Afin de discriminer partiellement entre ces hypothèses, une forme mutante de Snc1p dont l'internalisation est bloquée a été construite (Lewis et al. 2000).

Dans ce cadre, l'utilisation de promoteurs régulables permettant d'étudier le devenir d'une population de protéine en s'affranchissant de toute néosynthèse est un avantage. Au cours de cette étude, nous avons donc choisi d'exprimer Fur4p sous le contrôle du promoteur GAL. De plus, la vérification des défauts de recyclage nécessite un essai cinétique qui permette de découpler les phases d'endocytose et de recyclage des cargos. Notre protocole pour suivre le recyclage de Fur4p, basé sur la disponibilité du carbone, répond à ce critère. Dans un 1^{er} temps un stockage de l'essentiel des molécules de Fur4p dans le compartiment Classe E a été induit par endocytose. Dans un 2^{ème} temps, le recyclage éventuel de ce pool intracellulaire vers la membrane plasmique est suivi. Cette approche permet une quantification du pool de Fur4p recyclé (dosage de l'activité de la perméase à uracile) ainsi qu'un suivi de la localisation intracellulaire de la protéine (microscopie à fluorescence). Ce protocole nous a permis de montrer que la perméase est dégradée dans la vacuole dans les cellules *WT* alors qu'elle est recyclée vers la membrane plasmique dans *vps37Δ* (Fig. 53).

Si ce protocole présente donc un certain nombre d'avantages pour l'étude du recyclage, il convient néanmoins d'y apporter quelques précautions expérimentales ainsi que dans l'interprétation des résultats. Tout d'abord, au cours de notre étude, nous avons utilisé deux protocoles pour suivre le recyclage de Fur4p dans les cellules déficientes pour la machinerie ESCRT : l'ajout de rapamycine ou la modification de la disponibilité en glucose. A 1^{ère} vue, ces deux protocoles nous semblaient équivalents dans la mesure où ils conduisent à une stabilisation de Fur4p à la membrane plasmique

dans les cellules *vps37Δ*. Cependant, il est nécessaire de préciser que certains mutants (*pep12Δ*, *vps33Δ*) ne présentent pas des phénotypes complètement transposables d'un protocole à l'autre. Ce résultat pourrait être expliqué par une différence de sensibilité des deux essais ou des effets secondaires dus à la rapamycine par exemple. En outre, pour une même souche pour laquelle le recyclage est mesuré plusieurs fois de suite sur des cultures différentes avec le protocole de carence en carbone suivi d'ajout de carbone, nous avons mesuré une certaine variabilité. Cette dernière peut s'expliquer par le fait que pendant la phase de recyclage, une endocytose constitutive de Fur4p s'opère. Or, celle-ci est très sensible à l'état physiologique des cellules et notamment leur stade de croissance.

Une voie directe de recyclage du compartiment Classe E à la membrane plasmique

Un blocage dans la voie d'endocytose au niveau de la formation du MVB (dans les mutants ESCRTs) conduit au recyclage de Fur4p. Est-ce que la perméase recycle dans les cellules sauvages ? Dans nos expériences, nous avons observé une très légère augmentation de l'activité de transport d'uracile après ajout du glucose (voir fig 37). Bien que nous ne puissions pas exclure que dans certaines conditions, Fur4p pourrait recycler massivement dans les cellules sauvages, nous pensons que la majorité de la perméase est normalement envoyée à la vacuole pour dégradation quand la voie d'endocytose est fonctionnelle.

Dans les cellules déficientes pour la machinerie ESCRT, le recyclage se fait probablement depuis le compartiment classe E ou depuis la membrane de la vacuole. Dans les cellules de mammifères, il a été démontré que les lysosomes peuvent fusionner avec la membrane plasmique (Andrews 2002). De manière similaire, chez *S. cerevisiae*, Nikko et al. ont proposé que Gap1p recyclerait depuis la membrane de la vacuole car le recyclage de Gap1p observé dans les cellules *bro1Δ* est inhibé en l'absence de la syntaxine vacuolaire Vam3p (Nikko et al. 2003). Nous pensons qu'il est peu probable que le recyclage de Fur4p se fasse depuis la membrane de la vacuole puisque le recyclage dans le mutant *vps37Δypt7Δ* (où la fusion à la vacuole est bloqué) est comparable à celui dans les cellules *vps37Δ*. Notre modèle est celui d'un recyclage depuis le compartiment Classe E.

De plus, le recyclage de Fur4p dans les mutants *vps* Classe E n'est pas affecté par des mutations bloquant le trafic vers l'appareil de Golgi ou à partir de ce compartiment (*rcy1Δ*, *vps51Δ*, *vps29Δ*, *sec14-1*). Ce résultat indique que, contrairement à Snc1p, Fur4p ne passe certainement pas par l'appareil de Golgi (Fig. 53). Ces données ont constitué la 1^{ère} démonstration d'un recyclage direct à partir de compartiments endosomaux vers la membrane plasmique chez la levure. Ils sont en accord avec l'observation que les mutants *vps* Classe E sont bloqués pour le transport rétrograde des protéines résidentes du TGN depuis le compartiment Classe E (Piper et al. 1995; Bilodeau et al. 2002). De plus, nous montrons que ce recyclage fait intervenir des fusions vésiculaires dépendantes de Sec18p.

Tri au niveau du compartiment classe E et ubiquitine

L'ubiquitination est requise pour l'internalisation de Fur4p. Sur sa route vers la vacuole, Fur4p est dé-ubiquitinée par Doa4p avant son entrée dans le MVB (Dupré and Haguenaer-Tsapis 2001). Nous avons cherché à savoir si Fur4p a besoin d'être dé-ubiquitinée avant son recyclage à la membrane plasmique dans les mutants *vps* Classe E. Nous ne savons pas si Fur4p est dé-ubiquitinée pendant cette phase *in vivo*, mais nous avons montré que bloquer sa dé-ubiquitination (dans le mutant *doa4Δ* ou en utilisant des variants de Fur4p qui ne peuvent pas être dé-ubiquitinés) n'inhibait pas son recyclage. De manière similaire, le recyclage, dépendant du substrat, d'une forme tronquée de Ste3-Δ365 n'est pas régulé par son ubiquitination (Chen and Davis 2002). Il a donc été proposé que le recyclage serait une voie par défaut, c'est-à-dire qu'elle ne nécessiterait pas de signal spécifique. Au contraire, la dégradation vacuolaire précédée d'une entrée du cargo à l'intérieur des vésicules du MVB nécessite une conjugaison de la protéine à l'ubiquitine, signal de tri vers la voie de dégradation.

Rôle du complexe Vps classe C

Nous avons observé un défaut de recyclage des cargos Snc1p et Fur4p et un ralentissement général du recyclage (FM4-64) dans les mutants *vps* Classe C. Ces phénotypes résultent probablement de la double fonction de ce complexe dans le transport vers et à partir de l'endosome tardif puisque les cellules *vam3Δpep12Δ* présentent les mêmes défauts de recyclage. Une explication simple pour ce défaut de recyclage de Fur4p dans les doubles mutants déficients pour les complexes VpsCIC et VpsCIE serait que la perméase ne puisse pas atteindre le compartiment Classe E d'où elle recycle normalement. Cependant, cette hypothèse nous semble très peu probable car nous avons montré que Fur4p peut aussi recycler depuis l'endosome précoce dans un mutant *pep12Δ*. Une autre alternative serait que le compartiment Classe E soit absent dans les doubles mutants VpsCIC-VpsCIE, en accord avec les résultats publiés par Subramanian et al. et basés sur une étude de l'endocytose du FM4-64 (Subramanian et al. 2004). De plus, les structures endosomales dans les cellules déficientes pour le complexe Vps Classe C, correspondant théoriquement à des endosomes précoces, ne sont probablement pas fonctionnels puisque les recyclages de Snc1p et FM4-64 sont aussi bloqués dans ces cellules. Notre modèle serait donc que les cargos endocytés, destinés ou non à être recyclés, seraient accumulés dans des structures endosomales précoces non fonctionnelles dans les mutants Vps Classe C (Fig. 53).

De manière étonnante, Gap1p peut rejoindre la membrane plasmique dans les mutants *vps* Classe C (Rubio-Teixeira and Kaiser 2006). Rubio et al ont étudié le trafic de Gap1p de l'appareil de Golgi aux endosomes tardifs avant son arrivée à la membrane plasmique alors que nous avons étudié le recyclage de Fur4p après son endocytose. Fur4p serait bloquée dans l'endosome précoce dans les mutants *vps* de classe C pendant les phases d'endocytose et de recyclage dans nos expériences. Au contraire, compte tenue de la fonction du complexe Vps Classe C dans le trafic de l'appareil de Golgi vers l'endosome

tardif, Gap1p doit être bloquée dans l'appareil de Golgi dans les mutants *vps* de classe C dans les conditions utilisées par Rubio et al.. Depuis l'appareil de Golgi, Gap1p peut être re-localisée vers la membrane plasmique en l'absence du complexe Vps de classe C.

Les composants du complexe Vps Classe C ont récemment été identifiés chez la drosophile, les plantes et les mammifères, suggérant que ce complexe est largement conservé chez les eucaryotes (Sevrioukov et al. 1999; Rojo et al. 2003; Suzuki et al. 2003). La plupart des études sont centrées autour de Vps33a et Vps33b, les deux paralogues mammifères de la protéine de levure SM (Sec1/Munc18), Vps33p. Plusieurs phénotypes associés à la perte de fonction de Vps33a et Vps33b ne semblent pas en accord avec la fonction classique du complexe Vps Classe C au niveau des lysosomes. Par exemple, des souris déficientes pour Vps33a, modèle pour l'étude du syndrome Hermansky-Pudlak, présentent une hypo-pigmentation mais de manière surprenante, pas de défauts dans les fonctions lysosomales (Suzuki et al. 2003). De plus, il a été récemment publié que des mutations dans hVps33b sont à l'origine d'une maladie nommée ARC (arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis) (Gissen et al. 2004). Chez ces patients, plusieurs protéines normalement situées uniquement à la membrane apicale des cellules polarisées sont bloquées à l'intérieur des cellules (Devonald et al. 2003; Gissen et al. 2004). En prenant en compte nos données, il est tentant de spéculer que cette mauvaise localisation puisse résulter, au moins en partie, d'un défaut dans une forme particulière de recyclage (la transcytose).

En résumé, nos résultats montrent que plusieurs voies de recyclage existent également chez *S. cerevisiae*. Dans les cellules de mammifères, cette diversité est bien établie (Maxfield and McGraw 2004). De plus, nos données obtenues chez la levure permettent de donner une nouvelle lecture aux changements de distribution des protéines de membrane plasmique observées dans les cellules déficientes pour les complexes Vps Classe C et ESCRTs chez les eucaryotes supérieurs.

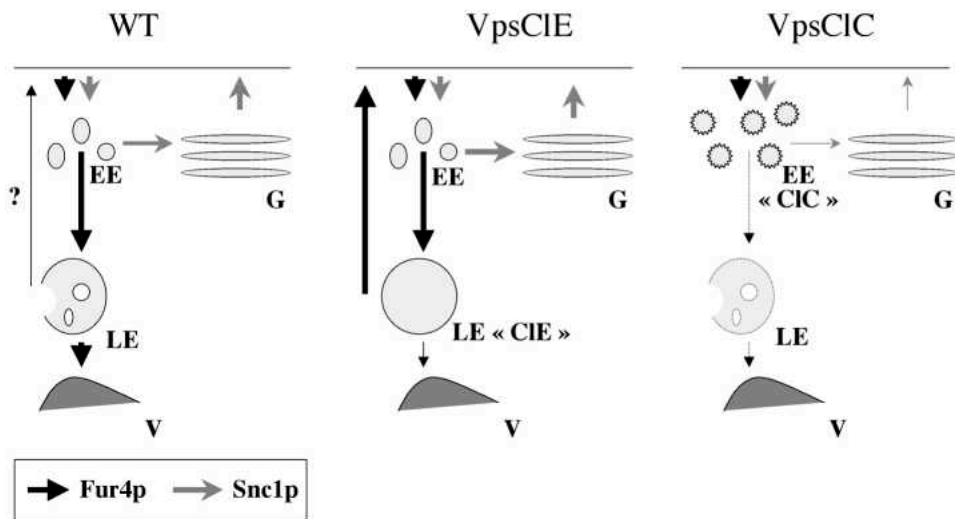


Figure 53: Modèle

*Fur4p (flèche noire) et Snc1p (flèche grise) sont recyclées selon des voies différentes. La largeur de la flèche reflète l'importance du trafic. **Schéma de gauche**, dans les cellules wt: Fur4p suit la voie d'endocytose à travers les endosomes précoces (EE), les endosomes tardifs (LE) et est dégradée dans la vacuole (V), un très petit pourcentage pourrait recycler (?). Snc1p recycle constitutivement entre EE, Golgi (G) et membrane plasmique (PM). **Schéma du centre**, dans les mutants Vps Classe E: Après endocytose, Fur4p recycle depuis le compartiment classe E vers la PM. Le recyclage de Snc1p n'est pas affecté. **Schéma de droite**, dans les mutants Vps Classe C: Après endocytose, Fur4p et Snc1p sont bloquées dans un compartiment endosomal précoce modifié (EE «CIC») depuis lequel elles ne peuvent pas recycler vers la PM.*

Recyclage depuis l'endosome précoce

Nous avons aussi démontré un recyclage efficace de Fur4p dans les cellules *pep12Δ*, *vps21Δ*, et *vps8Δ*. Ce recyclage est de nature vésiculaire, nécessitant Sec18p (NP). Nous ne savons pas si ce recyclage se fait directement depuis l'endosome précoce ou depuis des vésicules endocytiques issues de ce compartiment.

Il est probable que Gap1p soit stabilisée à la membrane plasmique dans les cellules *pep12Δ* compte tenu de la grande sensibilité de la souche à la drogue ADCB (transportée par Gap1p) (Rubio-Teixeira and Kaiser 2006). Cependant, d'après Nikko et al, Gap1p ne recycle pas dans ce mutant (Nikko et al. 2003). En outre, il a pu être montré qu'un mutant de l'ATPase de membrane plasmique Pma1-7, normalement envoyé à la vacuole, ainsi que Ste3p, sont trouvés à la membrane plasmique dans le mutant *vps8Δ* (Luo and Chang 2000). La route empruntée par Pma1-7 depuis l'endosome précoce n'a pas été étudiée mais les auteurs proposent qu'un transport direct de l'endosome précoce à la membrane plasmique existerait. Le cargo Ste6p recycle également vers la membrane plasmique dans les mutants *vps8Δ*, *pep12Δ* et *vps21Δ* au lieu d'être dégradé (Krsmanovic et al. 2005).

Nous avons voulu tester si cette deuxième voie de recyclage empruntée par Fur4p était également indépendante de l'appareil de Golgi en construisant des cellules doubles mutantes pour *PEP12* et pour des gènes codant des protéines impliquées dans le transport de l'endosome précoce vers l'appareil de Golgi (*RCY1*, *VPS51*). Cependant, ces mutants ne sont pas viables. De manière similaire, la délétion de *YPT6* (codant pour une RAB nécessaire pour la fusion à l'appareil de Golgi) est synthétique-létale avec plusieurs mutants déficients pour le recyclage de Snc1p, comme *gyp1Δ* (Lafourcade et al. 2004). De plus, les doubles mutants *rcy1Δtlg1Δ* sont non viables (Wiederkehr et al. 2000). L'ensemble de ces co-létalités suggère que le recyclage à travers l'appareil de Golgi pourrait être un processus essentiel à la viabilité et qu'il se ferait au moins le long de deux routes. Chez les mammifères aussi, le recyclage est souvent assuré par plusieurs voies pour un même cargo.

Nous nous sommes alors intéressés au recyclage de Fur4p dans un mutant *vps21Δ* supposé bloquer le trafic au même niveau que *pep12Δ*. Vps21p agit en amont de Vps27p, avant la convergence des voies d'endocytose et VPS. La protéine est associée à des membranes et marque de petites structures similaires à celles marquées par Pep12p (Gerrard et al. 2000). Il faut préciser néanmoins que la délétion de *VPS21* n'est pas co-létale avec celle des facteurs de trafic à travers l'appareil de Golgi, suggérant que la protéine qu'il code n'intervient pas exactement au même niveau que Pep12p ou que Pep12p a une fonction supplémentaire.

Nos expériences montrent que la délétion de facteurs impliqués dans le trafic de l'endosome précoce vers Golgi (Vps51p) ou à travers l'appareil de Golgi (Sec14p) bloque le recyclage de Fur4p dans un contexte *vps21Δ*. Donc, Fur4p suit deux routes de recyclage différentes : une indépendante de

l'appareil de Golgi depuis un compartiment de nature endosomale tardive et un recyclage par l'appareil de Golgi depuis l'endosome précoce comme Snc1p.

Fusion des vésicules de recyclage avec la membrane plasmique

Nous montrons que l'étape finale de fusion à la membrane plasmique de Fur4p dépend de l'exocyste (Sec6p) quelque soit l'organite d'origine du recyclage (endosome tardif ou précoce) et la route (directe ou *via* l'appareil de Golgi). L'exocyste est également nécessaire au recyclage d'autres cargos (Snc1p,...) (Lewis et al. 2000).

Chez la levure, deux voies de sécrétion transportant des vésicules de densité différentes ont été décrites : une directe depuis le TGN (vésicules légères) et une passant par un compartiment intermédiaire de nature endosomale (vésicules lourdes) (Harsay and Schekman 2002). Les deux voies nécessitent l'exocyste pour la fusion à la membrane plasmique. Il se pourrait que la voie de recyclage directe de Fur4p vers la membrane plasmique depuis les endosomes tardifs fasse intervenir la même machinerie que la voie de sécrétion passant par les endosomes mais celle-ci n'a pas été définie à part l'exocyste. Il serait intéressant de mesurer la densité des vésicules de recyclage contenant Fur4p et de la comparer à celles des vésicules lourdes de sécrétion .

Ces différents résultats permettent de penser que l'exocyste est un facteur général de fusion à la membrane plasmique de vésicules de nature différente. Une nuance doit être apportée ici : Losko et al ont montré que la sécrétion de Ste6p est dépendante de Sec1p qui interagit avec le complexe SNAREs à la membrane plasmique et avec l'exocyste. Cependant, son recyclage semble indépendant de Sec1p suggérant l'existence d'un processus alternatif de fusion à la membrane plasmique ; processus qui n'a été décrit pour aucun autre cargo (Losko et al. 2001).

Bilan du crible

La capacité de Fur4p à transporter des analogues toxiques de l'uracile nous a permis de développer une approche globale afin de trouver de nouveaux composants de la machinerie de recyclage. Nous sommes partis du postulat que des levures doublement déficientes pour la machinerie ESCRT et pour un élément nécessaire au recyclage de Fur4p devraient retrouver un niveau de résistance accru au 5-FU. Ce phénotype répond au critère de base des cribles : il est facilement évaluable à une large échelle. De plus, un retour de croissance permet de limiter le nombre de faux-positifs, contrairement à une perte de croissance. Cependant, la résistance au 5-FU pourrait avoir des causes indépendantes du recyclage de Fur4p, par exemple une présence accrue d'excréteurs de drogues à la membrane plasmique ou une dérégulation de voies de signalisation. Les mutants du complexe « exosome » de maturation des ARN ribosomiques sont également sensibles au 5-FU (Lum et al. 2004)

Au cours de ce test visuel, il est nécessaire de prendre en compte la croissance sur milieu sans drogue : une croissance plus rapide pouvant conduire à la sélection de souches qui ne sont pas réellement plus résistantes au 5-FU. Au contraire, un nombre important de souches ont été perdues pendant les étapes de construction des doubles mutants par croisement (environ 400 souches) ou à la dernière étape (supposés co-létaux avec *VPS37*, 156 souches). Pour l'ensemble de ces souches, la résistance au 5-FU n'a pas pu être évaluée. Comme précisé précédemment, outre la co-létalité réelle, la survie de la souche *vps37Δ* sur les milieux utilisés lors de ce croisement robotisé est diminuée, ce qui est probablement à l'origine du nombre important de souches non viables. Pour cette raison, nous n'avons pas pu remplir notre 1^{er} objectif au cours de ce crible : mettre en évidence les interactions génétiques entre *VPS37* et les gènes non essentiels. Classiquement, des interactions génétiques sont observées entre deux gènes s'ils codent pour des protéines impliquées dans des voies parallèles redondantes d'un processus essentiel.

Nous nous sommes donc concentrés sur le 2^{ème} objectif, identifier les candidats dans le recyclage de Fur4p. Sur les 24 souches candidates isolées pour leur résistance au 5-FU, 9 ont été confirmées. Toutes présentaient un niveau de recyclage de Fur4p différent de celui mesuré dans les cellules *vps37Δ*. Cependant, pour 7 d'entre elles, cet effet sur le recyclage était tout à fait trivial. En effet, la présence d'une copie sauvage de *VPS37* dans le génome à un locus différent explique le retour d'une résistance au 5-FU équivalente à celle d'une souche sauvage. Il s'agissait donc de faux-positifs.

Nous avons étudié davantage les deux souches restantes : *ydr290wΔvps37Δ* et *ump1Δvps37Δ*. Nous avons pu montrer que l'absence d'Ump1p et Ydr290w affecte partiellement le recyclage de Fur4p mais pas celui de Snc1p.

Une interaction en double hybride entre Ydr290w et Vps2p avait été décrite (Ito et al. 2001), mais elle ne semble pas avoir été confirmée et a été supprimée des bases de données. De plus, l'ORF a depuis été annotée comme douteuse. *YDR290W* est sur le brin complémentaire du gène *RTT103*, codant pour un facteur de terminaison de la transcription. Nous n'avons pas trouvé le double mutant *rtt103Δvps37Δ* au cours du crible mais nous ne pouvons pas exclure que les phénotypes observés dans *ydr290wΔvps37Δ* soient en réalité soit dû à la déficience de *RTT103*. Compte tenu du rôle connu de Rtt103p, nous avons considéré peu probable qu'elle ait un rôle direct dans le recyclage de Fur4p, nous n'avons donc pas continué cette étude.

Ump1p intervenant dans l'assemblage du protéasome (Ramos et al. 2004), notre modèle est que Ump1p jouerait un rôle indirect sur le recyclage de Fur4p *via* la dégradation d'une protéine intervenant dans son recyclage. Cependant, un rôle direct du protéasome dans le recyclage de Fur4p pourrait aussi être envisagé. La plupart des sous unités du protéasome sont essentielles à la viabilité et n'ont donc pas été testées pendant ce crible, mais il serait intéressant de regarder l'impact de leurs pertes de fonction sur le recyclage de la perméase. De plus, plusieurs études ont pointé un rôle de la dégradation protéasomale dans l'endocytose. Par exemple, chez les mammifères, le protéasome est requis pour l'internalisation du récepteur de l'hormone de croissance pour des raisons encore mal

comprises (Govers et al. 1999) (Strous and Govers 1999). Chez la levure, il a été montré que la fusion à la vacuole requière une ubiquitination de Ypt7p et sa dégradation par le protéasome (Kleijnen et al. 2007). Les auteurs proposent que la dégradation des Rab/Ypt par le système ubiquitine-protéasome pourrait intervenir dans la fusion membranaire à d'autres étapes du trafic. D'autres liens entre recyclage et ubiquitine existent mais ils semblent indépendant du protéasome. Par exemple, le complexe SCF E3 ligase contenant la protéine à F-box Rcy1p et Skp1p est requis pour le recyclage de Snc1p (Wiederkehr et al. 2000; Galan et al. 2001).

Le niveau d'ubiquitination de Ste6p régulerait négativement son recyclage (Krsmanovic et al. 2005). De plus, l'ubiquitine isopeptidase Ubp1p interviendrait au cours du recyclage de Ste6p, en régulant le niveau d'ubiquitination de la machinerie de recyclage (Schmitz et al. 2005). Y a t'il un lien général entre ubiquitine et recyclage ? Cette question reste pour l'instant ouverte.

Enfin, rappelons que ce crible ne nous a pas permis d'étudier le rôle éventuel des protéines codées par les 1400 gènes essentiels à la viabilité dans le recyclage de Fur4p. Nous avons montré que l'exocyste (essentiel à la viabilité à cause de son rôle dans la dernière étape de sécrétion) intervenait également dans la fusion des vésicules de recyclage à la membrane plasmique. De même, nos résultats suggèrent que Sec18p est requis pour les étapes de fusion vésiculaire pendant le recyclage. D'autres gènes essentiels sont potentiellement impliqués dans le recyclage de Fur4p. Aucun outil n'existait au moment où nous avons réalisé le crible afin d'étudier les gènes essentiels par des approches globales. Depuis, une collection de souches où chaque gène essentiel est placé sous contrôle d'un promoteur répressible a été construite et est compatible avec les cribles génétiques automatisés (Mnaimneh et al. 2004; Davierwala et al. 2005).

Bilan de l'approche candidats

Au cours de cette approche, nous avons montré que la délétion de gènes codant pour des protéines des familles des RABs, des nexines, des Ggas et des protéines à domaine EH n'inhibait pas, ou très partiellement, le recyclage de Fur4p. Nous avons fixé la limite haute dans les doubles mutants à 50% du niveau de recyclage de Fur4p dans les cellules *vps37Δ* pour nous y intéresser davantage.

En outre, nous avons montré que les machineries de recyclage de Gap1p et Chs3p différaient de celle de Fur4p.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'absence de résultat au cours du crible 5-FU et de l'approche candidats. Tout d'abord, il est possible qu'une redondance fonctionnelle existe entre certains de ces facteurs cellulaires, par exemple pour les Gga ou les nexines. Ainsi, il aurait été intéressant de combiner certaines délétions, comme nous l'avons fait pour les protéines à domaine EH, et d'étudier le recyclage en l'absence simultanée de plusieurs facteurs.

Une deuxième hypothèse est envisageable. Fur4p est capable de recycler en suivant différentes voies d'après nos études : depuis l'endosome précoce, elle transite par l'appareil de Golgi alors qu'elle semble recycler directement vers la membrane plasmique depuis le compartiment classe E. D'autres voies pourraient également exister. Il est possible que quand la voie de recyclage directe à partir du compartiment classe E est bloquée, Fur4p soit capable de retourner à l'endosome précoce et de recycler *via* l'appareil de Golgi. Le résultat apparent de cette expérience serait un recyclage normal de Fur4p, même en l'absence de la voie directe. Une telle « souplesse/ adaptabilité/ versatilité » semble exister chez les eucaryotes supérieurs. Par exemple, le récepteur à la transferrine peut recycler alternativement par deux voies. Si l'une est bloquée, l'autre pourrait être régulée positivement dans certaines conditions (Maxfield and McGraw 2004). Dans ce contexte, l'approche utilisation de mutants que nous avons abondamment pratiquée est inopérante.

Enfin, nous pouvons formuler une 3^{ème} hypothèse : les gènes codant pour la machinerie de recyclage pourraient être essentiels à la viabilité, or, nous avons uniquement testé les gènes non essentiels.

Existence de différentes voies de recyclage chez la levure

Au cours des cinq dernières années, la connaissance sur le recyclage dans la levure a beaucoup progressé. Ainsi, les études basées principalement sur 5 cargos (Ste6p, Chs3p, Snc1p, Gap1p et Fur4p) ont permis de montrer que différentes voies existaient chez la levure et d'en identifier, au moins partiellement, la machinerie. Les routes suivies par ces cargos au cours de leur recyclage sont représentées sur la Fig. 54. Ste6p, Snc1p et Chs3p transitent entre membrane plasmique, endosome précoce et Golgi en utilisant une machinerie commune, ce recyclage à lieu dans les cellules sauvages. De plus, dans un contexte déficient pour AP1, une voie alternative de recyclage de Chs3p se mettrait en place, directement à partir de l'endosome précoce. Une telle voie n'a jamais été décrite pour aucun autre cargo ou dans des souches sauvages. Pourtant, cette voie est quantitativement très importante chez les eucaryotes supérieurs.

Il semblerait que l'équilibre entre dégradation et recyclage soit régulé différemment pour Fur4p et Snc1p. En effet, la SNARE Snc1p recycle dans des cellules sauvages afin de permettre plusieurs fusions vésiculaires successives alors que Fur4p n'est recyclée qu'en cas de blocage de la voie d'endocytose. Nous avons donc étudié le recyclage de Fur4p dans des mutants *vps* Classe E. Le recyclage de Gap1p a été étudié dans ces mêmes mutants (Nikko et al. 2003; Gao and Kaiser 2006; Rubio-Teixeira and Kaiser 2006). La première étude suggérait que la protéine Gap1p recyclerait depuis la membrane de la vacuole en passant par l'appareil de Golgi dans un mutant *bro1Δ* de manière dépendante de Vam3p, Vam7p, Ypt6p, Vps52p et Tlg1p. Selon les deux études les plus récentes, le recyclage de Gap1p, comme celui de Fur4p, semble indépendant des facteurs de transit par l'appareil de Golgi (rétromère, Ypt6p, VFT) et des facteurs de fusion à la vacuole (Vam3p). Néanmoins, nous ne

pouvons pas exclure que, lors de leur recyclage, Gap1p et Fur4p passent quand même par l'appareil de Golgi mais de manière indépendante des facteurs testés.

Nous ne savons pas la raison de la contradiction entre les études menées sur Gap1p notamment concernant l'importance des facteurs de trafic à l'appareil de Golgi. Cependant, les phénotypes observés dans les cellules délétées pour *BRO1* sont différents de ceux des autres mutants ESCRTs : l'activité de Gap1p y est beaucoup plus importante (Rubio-Teixeira and Kaiser 2006) et le retour de Vps10p du MVB vers l'appareil de Golgi n'y est pas affecté, suggérant que dans ce mutant, le rétromère reste fonctionnel (Raymond et al. 1992; Odorizzi et al. 2003). Un modèle permettant de réconcilier l'ensemble des données serait que dans ce mutant uniquement, deux voies de recyclage se mettent en place : celle depuis la membrane de la vacuole et passant par l'appareil de Golgi (Nikko et al. 2003) et celle depuis le compartiment classe E directement vers la membrane plasmique (Rubio-Teixeira and Kaiser 2006). Nous n'avons pas étudié le recyclage de Fur4p dans le mutant *bro1Δ*.

Néanmoins, même s'il semblerait que dans la majorité des mutants ESCRTs, les deux perméases recyclent vers la membrane plasmique sans passer par l'appareil de Golgi, nos expériences montrent que les machineries de leur recyclage sont différentes. Ceci indique qu'au moins deux voies différentes de recyclage direct du compartiment classe E à la membrane plasmique existeraient.

Lst4p, Lst7p et le complexe GSE semblent spécifiques à Gap1p et n'interviennent pas dans le recyclage du FM4-64 ou dans le trafic de Vps10p de l'endosome tardif à l'appareil de Golgi. Le complexe GSE interagit directement avec Gap1p et les auteurs proposent qu'il servirait de manteau sur les vésicules de recyclage formées à l'endosome tardif. Ce manteau ne semble pas participer au recyclage de Fur4p. la fonction moléculaire de Lst4p et Lst7p n'a pas été élucidée mais il a été observé que des mutations dans *LST4* et *LST7* réduisent l'activité de Gap1p en conduisant à un tri de Gap1p vers la vacuole quelque soit la source d'azote. Dans les doubles mutants pour ESCRTs et *LST4*, Gap1p s'accumule dans le compartiment classe E au lieu de rejoindre la membrane plasmique. Donc, Lst4p et Lst7p interviendraient dans la perception de l'azote dans le milieu et réguleraient le recyclage de Gap1p. On devrait être capable d'identifier des protéines assurant les mêmes fonctions pour Fur4p : perception du stress et/ou du substrat et protéines de manteau. De façon intéressante, le trafic de Fur4p est également régulé par la présence de l'uracile, suggérant l'existence d'une machinerie de perception du substrat et de tri de Fur4p. Nous n'avons pas utilisé ce protocole (ajout d'uracile) car il ne permet pas de découpler totalement l'endocytose et le recyclage.

Enfin, un recyclage de Pma1-7p a été décrit dans les mutants *vps* Classe E (Luo and Chang 2000). Comme ce recyclage est moins efficace que le recyclage de ce même cargo dans les cellules *vps8Δ*, les auteurs proposent que le recyclage de ce cargo depuis le compartiment classe E nécessiterait un rétro-transport vers l'endosome précoce puis une étape de recyclage direct vers la membrane plasmique. Nous ne pouvons pas exclure que la voie de recyclage de Fur4p dans les mutants *vps* de classe E soit identique. Si ce retour du compartiment classe E à l'endosome précoce a lieu, la différence des résultats obtenus entre *vps37Δvps51Δ* et *vps21Δvps51Δ* suggèrent cependant que les routes suivies sont

tout de même différentes. Pour cette raison, cette hypothèse d'un retour vers l'endosome précoce nous semble peu probable.

En effet, Fur4p est également capable de recycler depuis l'endosome précoce quand le trafic en aval est bloqué. Mais, dans ce cas-là, Fur4p suit la même voie que Snc1p, par l'appareil de Golgi. Pma1-7p et Ste6p sont également recyclées depuis l'endosome précoce dans des mutants *vps8Δ*, *pep12Δ* et *vps21Δ* qui bloquent le trafic en aval. Cependant, les cargos Fur4p et Pma1-7p ont un comportement divergent de Ste6p. En effet, Fur4p et Pma1-7 peuvent recycler indifféremment depuis l'endosome précoce et le compartiment de classe E alors que Ste6p n'est pas capable de retourner vers la membrane plasmique après avoir dépassé l'endosome précoce (Luo and Chang 2000) (Krsmanovic et al. 2005). Au contraire, le recyclage de Snc1p n'est pas modifié dans les mutants *pep12Δ* ou *vps* de classe E par rapport au *WT*. Pourtant, on pense que Snc1p et de Ste6p suivent la même voie de recyclage entre endosome précoce, Golgi et membrane plasmique. Ce résultat implique que la fraction de Ste6p destinée à être dégradée peut être re-mobilisée vers la membrane plasmique en cas de blocage de la voie à l'endosome précoce.

L'ensemble de ces résultats illustre la complexité du recyclage en terme de multiplicité des routes suivies et de régulation différentielle. Une telle complexité n'était pas envisagée il y a encore quelques années et on pouvait régulièrement lire, qu'une seule voie de recyclage existait dans la levure : entre endosome précoce, Golgi et membrane plasmique. On peut s'attendre à ce que les futures études, sur d'autres cargos, montrent l'existence de nouvelles voies. Les notions de redondance et de souplesse / adaptabilité / versatilité des voies ajoutent une dimension de complexité supplémentaire pour l'étude du recyclage.

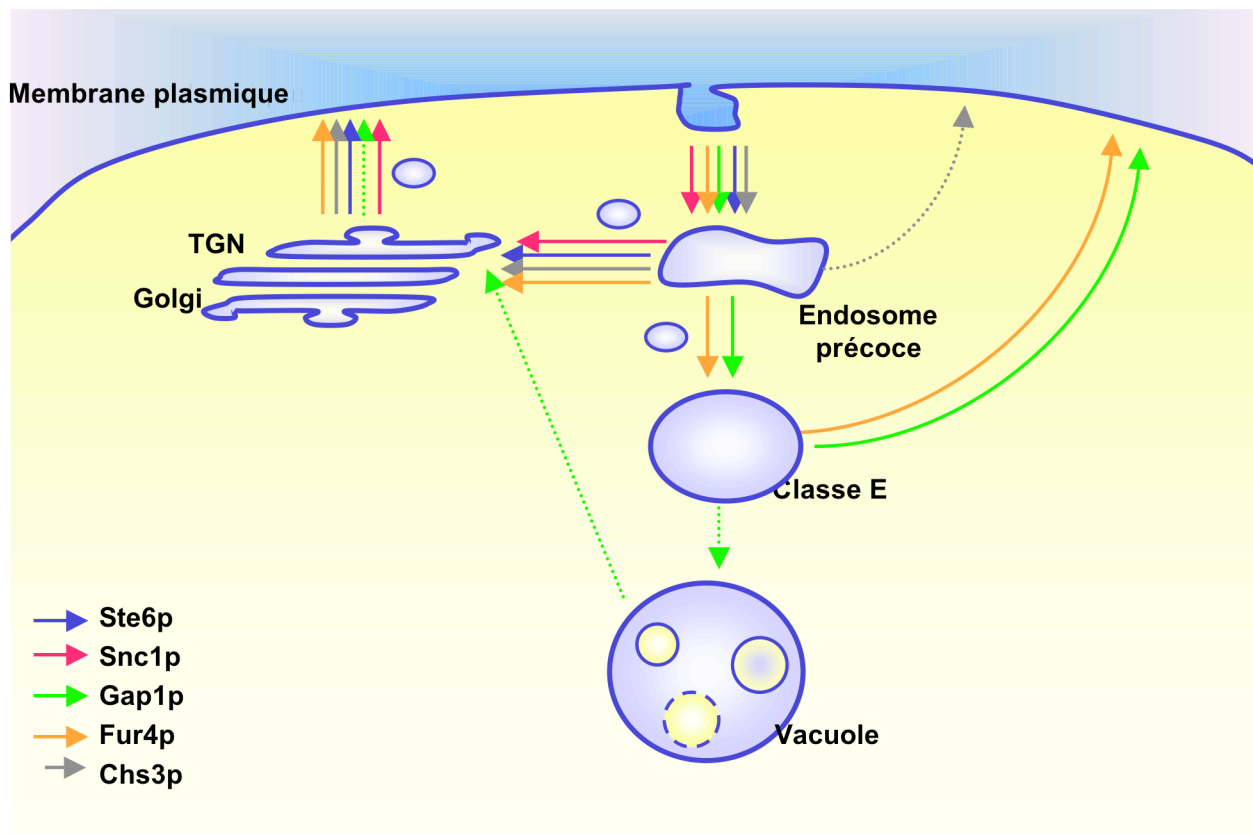


Figure 54 : Les voies de recyclage dans le levure, modèle global et comparaison des cargos

Ste6p, Snc1p et Chs3p voyagent entre membrane plasmique, endosome précoce et Golgi en utilisant une machinerie commune. De plus, dans un mutant déficient pour AP-1, une voie alternative de recyclage de Chs3p se mettrait en place, directement à partir de l'endosome précoce. Dans les mutants vps Classe E, Fur4p et Gap1p recycleraient sans passer par l'appareil de Golgi. Concernant Gap1p, une étude suggère que la protéine recyclerait depuis la membrane de la vacuole en passant par l'appareil de Golgi. Fur4p est également capable de recycler depuis l'endosome précoce quand le trafic en aval est bloqué. Dans ce cas-là, Fur4p suit la même voie que Snc1p, par l'appareil de Golgi.

II. L'autophagie chez la levure, identification de deux nouveaux acteurs :

II.A. Introduction

Le domaine EH (EPS15 homology domain) est un domaine d'interaction protéine-protéine. Les protéines à domaine EH sont classiquement impliquées dans l'endocytose ou le recyclage (Miliaras and Wendland 2004) (voir chapitre II.C.1.c. et II.B.3. de l'introduction). Nous nous sommes intéressés à Irs4p-Tax4p qui n'ont pas de fonction attribuée dans le trafic vésiculaire. Les seules données publiées sur ces protéines les désignent comme des activateurs d'Inp51p (la synaptojanine) (Morales-Johansson et al. 2004). Les deux protéines présentent une structure similaire avec un domaine EH en C terminal suggérant une possible redondance fonctionnelle, nous avons donc construit une souche délétée pour Irs4p et Tax4p. Nous avons montré que Irs4p et Tax4p ne jouaient pas de rôle dans l'endocytose et le recyclage, les différenciant des autres membres de la famille des protéines à domaine EH.

En outre, nous avons démontré qu'Irs4p est phosphorylée en réponse à une carence nutritive déclenchant l'autophagie. Ces données nous ont amenées à tester l'implication d'Irs4p-Tax4p dans l'autophagie.

Grâce à une combinaison d'approches génétiques, biochimiques et de biologie cellulaire, nous avons pu montrer que Irs4p et Tax4p interviennent de façon redondante au cours de l'autophagie et interagissent physiquement avec la machinerie d'autophagie (publication 2 en annexe).

Les souches déficientes pour l'autophagie présentent un défaut de viabilité lorsqu'elles sont soumises à une carence nutritive. En condition de carence azotée, la souche *irs4Δtax4Δ* a une viabilité très affectée comparable à celle observée dans des mutants d'autophagie. A contrario, les simples délétants *irs4Δ* ou *tax4Δ* ont une viabilité similaire à la souche *WT* suggérant que les deux protéines à domaine EH sont fonctionnellement redondantes et expliquant pourquoi elles n'ont pas été trouvées dans les cribles généraux d'autophagie.

Nous avons également étudié quantitativement les différents types d'autophagie dans les cellules *irs4Δtax4Δ*. Ainsi, nous avons montré que Irs4p et Tax4p interviennent dans l'autophagie non sélective de fractions de cytoplasme ainsi que dans la pexophagie, dégradation sélective des peroxysomes. Leur absence conduit à un ralentissement de ces deux voies. Par contre, la voie sélective de transport CVT (cytoplasme-to-vacuole) permettant la maturation de l'aminopeptidase I (Ape1p) n'est pas retardée dans *irs4Δtax4Δ*.

Une souche délétée pour Inp51p, le seul partenaire connu de ces protéines, ne présente aucune altération de l'autophagie et de la pexophagie indiquant que le rôle d'Irs4p et Tax4p dans l'autophagie est indépendant de leur fonction activatrice d'Inp51p.

Grâce à une étude en microscopie électronique, nous avons montré que la souche double mutante présente moins de corps d'autophagie dans les vacuoles après induction de l'autophagie par rapport aux cellules sauvages, expliquant les phénotypes observés. Un délai dans l'apparition des corps d'autophagie est observé, mais le même nombre de vésicules semble finalement atteint après une carence plus longue.

Nous avons montré qu'Irs4p et Tax4p sont partiellement localisées au PAS, structure Pré-autophagosomale, où est nucléée la vésicule d'autophagie.

Les domaines EH reconnaissent sélectivement les tri peptides de type NPF. Parmi les protéines Atg de levure, seule Atg11p présente un NPF. Atg11p est un adaptateur central qui permet la localisation au PAS de plusieurs protéines Atg avec lesquelles elle interagit. Nous avons pu montrer qu'Atg11p interagit *in vivo* avec Irs4p.

L'ensemble de ces données suggèrent que Irs4p et Tax4p joueraient un rôle direct, encore à élucider, dans l'autophagie. Les fonctions associées aux protéines à domaine EH étaient jusqu'à maintenant restreintes à l'endocytose. Nos résultats impliquent donc ces protéines dans une tout autre voie de trafic, l'autophagie.

En parallèle, nous nous sommes intéressés à une propriété inattendue d'Irs4p et Tax4p. Nous avons observé que la sur-expression de ces protéines conduisait à l'apparition de longues structures tubulaires très particulières. Nous nous sommes demandé quelle était la nature de ces structures. Il est à noter que ce type de structures n'a été décrit que pour la protéine Sup35p chez la levure. En effet, cette protéine prion forme des tubules lorsqu'elle est sur-exprimée (Ganusova et al. 2006). Nous cherchons donc à savoir si Irs4p et Tax4p pourraient être de nouveaux prions.

II.B. Matériel et méthodes

Certains protocoles utilisés lors de cette étude ont fait l'objet d'une description au I.B et ne seront pas décrits à nouveau (recyclage de Fur4p et Snc1p, manipulations génétiques, microscopie...).

Construction des souches de levure

Les souches utilisées sont énumérées dans le tableau 8. Les manipulations génétiques ont été effectuées comme décrit en I.B. des résultats. Les délétions et les étiquetages de gènes au locus par la GFP, GST ou Myc ont été effectuées selon la méthode de Longtine et al. (Longtine et al. 1998). Les souches yJMG1102, yJMG1104, yJMG1106 ont été construites par délétion de *PHO13* et conversion de *PHO8* en *PHO8Δ60* par amplification du plasmide pJMG370 avec les oligonucléotides T3 et T7. La souche yJMG1012 a été obtenue par intégration de pJMG346 (ADH-Vps51, URA3, digéré par l'enzyme Sac1) au locus ADH1 dans la souche yJMG982.

souche	génotype	Source
BY4741	<i>WT, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG938	<i>tax4::kanMX4, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG373	<i>irs4::kanMX4, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ1</i>	Euroscarf
yJMG405	<i>vps30::kanMX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG1034	<i>atg1::kanMX4, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG937	<i>inp51::kanMX4, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG503	<i>pep4::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG1023	<i>atg11::kanMX, Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG1013	<i>irs4::KAN, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ1, pJMG346 (ADH-Vps51 on URA3) cut with SacI integrated at the ADHI locus</i>	Cette étude
yJMG1074	<i>atg1::kanMX, PEP4::HIS3MX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0,</i>	Cette étude
yJMG1075	<i>tax4::KAN, irs4::KAN, pep4::HIS; leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0, lys2Δ0, pJMG346 (ADH-Vps51 on URA3) cut with SacI integrated at the ADHI locus,</i>	Cette étude
yJMG390	<i>irs4::end-irs4-13myc-His5 Sp, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG982	<i>tax4::KAN, irs4::KAN, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0, lys2Δ0</i>	Cette étude
yJMG1012	<i>tax4::KAN, irs4::KAN, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0, lys2Δ0, pJMG346 (ADH-Vps51 on URA3) cut with SacI integrated at the ADHI locus</i>	Cette étude
yJMG1102	<i>PHO8::PHO8Δ60, PHO13::NAT, HIS3MX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG1104	<i>atg1::KAN PHO8::PHO8Δ60, PHO13::NAT, HIS3MX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG1106	<i>tax4::KAN, irs4::KAN, PHO8::PHO8Δ60, PHO13::NAT, HIS3MX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0, lys2Δ0, pJMG346 (ADH-Vps51 on URA3) cut with SacI integrated at the ADHI locus</i>	Cette étude
yJMG1157	<i>tax4::KAN, irs4::KAN, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0, lys2Δ0, pJMG346 (ADH-Vps51 on URA3) cut with SacI integrated at the ADHI locus; URA3::HIS</i>	Cette étude
yJMG1065	<i>atg11::end-Atg11-Myc, HIS3, irs4::GAL-GST-Irs4, KAN, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG1028	<i>atg8::kanMX4 leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
yJMG1068	<i>atg11::end-Atg11ΔCter-Myc, HIS3, irs4::GAL-GST-Irs4, KAN, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG1061	<i>atg11::end-Atg11ΔNPF-Myc, HIS3, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG392	<i>irs4::end-irs4-GFP-His5 Sp, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG355	<i>his3-, ura3-, trp1-, leu2-, pFRH38</i>	Laboratoire Tsapis
yJMG1142	<i>atg8::Gal-GFP-atg8-His5 Sp, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG1144	<i>tax4::KAN, irs4::KAN, pJMG346 (ADH-Vps51 on URA3) cut with SacI integrated at the ADHI locus, atg8::Gal-GFP-atg8-His5 Sp, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0, lys2Δ0</i>	Cette étude
yJMG1075	<i>tax4::KAN, irs4::KAN, pep4::HIS; leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0, lys2Δ0, pJMG346 (ADH-Vps51 on URA3) cut with SacI integrated at the ADHI locus</i>	Cette étude
yJMG1074	<i>atg1::kanMX, pep4::HIS3MX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude
yJMG1071	<i>inp51::kanMX, pep4::HIS3MX, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Cette étude

Tableau 8 : Souches de levure

Construction des plasmides

Les plasmides sont décrits dans le tableau 9.

pJMG346 a été construit en introduisant ADH-VPS51 digéré avec KpnI et SacI dans pRS306 (INT-URA3). pJMG358 a été obtenu par digestion de end-ECFP-Atg8 dans pRS314 (Suzuki et al. 2001) avec SalI et SacI et ligation dans pRS315 (CEN-LEU2) digéré avec les mêmes enzymes. Pour obtenir pJMG423, *TAX4* a été amplifié par PCR et introduit dans pRS416-ADH-GFP (CEN-URA3) digéré avec SpeI et XmaI. Pour construire pJMG172, *IRS4* a été amplifié par PCR sur ADN génomique, coupé avec NotI et ApaI et ligué dans pRS415-ADH-GFP (CEN-LEU2). Pour construire pJMG317, *TAX4* a été amplifié par PCR sur ADN génomique, digéré par XhoI et XmaI et ligué dans pRS423-GAL-Cherry (2 μ , HIS3). pJMG312 a été construit en introduisant *TAX4* dans pRS413GPD-d Tomato (CEN, HIS3).

ATG11 et *ATG11 Δ NPF* ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique, digérés par BamHI-XhoI et clonés dans le vecteur double hybride pEG203 ("DNA-binding domain"). *IRS4*, *TAX4* et *ATG19* ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique, digérés respectivement par NcoI-ApaI, NcoI-XhoI et EcoRI-XhoI, puis clonés dans le vecteur double hybride pJG4-6 ("Activation domain").

Plasmide	caractéristiques	Source
pJMG247	p416-GPD (CEN, URA3)	(Mumberg et al. 1995)
pJMG346	ADH-VPS51 (int, URA3)	Cette étude
pFL38-gFP	GAL-FUR4-GFP, URA3, CEN	Laboratoire Tsapis
pJMG172	ADH-GFP-IRS4 (CEN, LEU2)	Cette étude
pJMG317	GAL-Cherry-TAX4 (2 μ , HIS3)	Cette étude
pJMG423	ADH-TAX4-GFP (CEN, URA3)	Cette étude
pJMG312	GPD-Tomato-TAX4 (CEN, HIS3)	Cette étude
pJMG350	APEI-RFP (CEN, HIS3)	Laboratoire Thumm
pJMG358	CFP-ATG8 (CEN, LEU2)	Cette étude
pJMG370	pPHO8 Δ 60-cyt-His5Sp	Reggiori
pJMG19	GAL-GST (2 μ , URA3)	Laboratoire Kishi
pJMG176	TPI-GFP-SNC1 (CEN, LEU2)	(Lewis et al. 2000)
pJMG435	RFP-SKL (CEN, URA3)	Laboratoire Rachubinski
pJMG462	tpi-SNA3-GFP (CEN, URA3)	(Reggiori and Pelham 2001)
pJMG438	Cu-GFP-ATG8 (CEN, LEU2)	Reggiori
pJMG351	MET25-GFP-ATG9 (CEN, URA3)	(Lang et al. 2000)
pJMG181	tpi-GFP-PHM5 (CEN, URA3)	(Reggiori and Pelham 2001)
pJMG331	MET25-GFP-FAB1 (CEN, URA3)	Laboratoire Dove
pJMG282	ADH-GFP-VPS23 (CEN, LEU2)	Cette étude
pJMG158	tpi-GFP-TLG1 (CEN, LEU2)	Laboratoire Pelham
pJMG442	AD-Atg11FL (2 hybrid)	Cette étude
pJMG443	AD-Atg11 Δ npf (2 hybrid)	Cette étude
pJMG444	DNA-BD-Tax4FL (2 hybrid)	Cette étude
pJMG446	DNA-BD-Atg19FL (2 hybrid)	Cette étude
pJMG460	DNA-BD-Irs4FL (2 hybrid)	Cette étude
pJMG368	GAL-SUP35NM-DsRed (CEN, URA3)	(Ganusova et al. 2006)
pJMG292	GPD-GFP-Tax4 (CEN, LEU2)	Cette étude
PJMG170	GPD-GFP-Irs4 (CEN-LEU2)	Cette étude

Tableau 9 : Plasmides

Milieux de culture

Les cellules ont été cultivées à 30 °C en milieu riche (YPD) : 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose ou en milieu synthétique, SD ou SGal ou SRaf : 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose ou 2% galactose ou 2% raffinose respectivement ainsi que les acides aminés nécessaires. Afin d'induire l'autophagie, un milieu carencé en azote (SD-N) a été utilisé : 0.17% yeast nitrogen base without amino acids et sulfate d'ammonium, 2% glucose. Alternativement, 0.5µg/ml final de rapamycine (RAP, Sigma) a été additionnée au milieu de culture.

Anticorps et western blots

Les protocoles de préparation des extraits protéiques, les gels SDS-PAGE et le transfert sur membrane de nitrocellulose ont été décrits au I.B.. La quantification a été effectuée avec Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Les anticorps dirigés contre la GFP (monoclonal, Roche), PGK (monoclonal, Roche), Myc (9E10, monoclonal, Upstate), GST (polyclonal, Santa cruz) ont été utilisés comme recommandés par les fabricants. La maturation de la CPY est suivie avec un anticorps anti-CPY monoclonal (Molecular probes) afin de détecter les formes p1 (RE), p2 (Golgi) et m (vacuole). Le sérum anti-ApeIp a été fourni par M. Mazon qui en a décrit l'utilisation (Silles et al. 2000). L'anticorps anti-Fox3p a été fourni par D. Klionsky (Hutchins et al. 1999). L'anticorps anti-Atg8p provient du laboratoire de Y. Ohsumi (Kirisako et al. 1999).

Tests de la voie Vps

Des cellules transformées par GFP-Phm5p ou Sna3-GFP cultivées en milieu sélectif jusqu'en phase exponentielle de croissance (0.5-0.7 unités DO/ml) ont été observées au microscope à fluorescence.

Traitement par la phosphatase alcaline

Le traitement a été effectué comme précédemment décrit (Volland et al. 1992). Les cellules ont été incubées à 37°C pendant une heure en présence de phosphatase (CIP, Sigma). Les protéines ont été précipitées avec 10% acide trichloroacétique et resuspendues en tampon Laemli.

Mesure de la survie cellulaire

- **En milieu liquide SD-N:**

Les cellules ont été cultivées jusqu'à une unité DO₆₀₀/ml en milieu SD, lavées deux fois avec de l'eau distillée et resuspendues dans du milieu SD-N. Après 0, 1, 2, 3 et 4 jours, des aliquots ont été prélevés, dilués et étalés sur des boîtes YPD puis les colonies ont été comptées.

- **Tests en gouttes sur boîte, en présence de rapamycine:**

Les levures sont cultivées jusqu'en phase exponentielle et testées pour leur sensibilité à la rapamycine (RAP, sigma). Après dilution en série, elles sont déposées sur des boîtes YPD sans ou avec 3nM RAP.

Mesure de l'autophagie non sélective

- **Dosage de l'activité Pho8Δ60 :**

L'activité enzymatique de Pho8Δ60 a été mesurée dans des cellules délétées pour *PHO13* et exprimant *PHO8Δ60* à la place de *PHO8*. Le protocole suivi a été décrit précédemment (Noda et al. 1995). Les modifications suivantes ont été apportées. Les cellules ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle, lavées deux fois à l'eau puis resuspendues en SD-N. Des cellules correspondant à 5 unités DO₆₀₀ ont été prélevées à chaque temps et lavées à l'eau. Les cellules ont été resuspendues dans 1ml de tampon d'essai (250 mM Tris/HCl, pH 9.0, 10 mM MgSO₄, 10 μM ZnSO₄) avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche) et du PMSF (Sigma). Puis, les cellules ont été cassées avec un broyeur sous pression "One Shot cell extractor" (Constant Systems, Warwick, U.K.). Après centrifugation, 50 μl de surnageant ont été ajoutés à 0.5 ml de tampon d'essai et 50 μl naphthylphosphate potassium 55 mM. Après une incubation de 15 min à 30°C, la réaction a été stoppée par ajout de 0.5 ml de glycine/NaOH (pH 11.0) 2M. Le produit de réaction catalysé par Pho8Δ60 a été quantifié en mesurant l'intensité de fluorescence (excitation à 345 nm et émission à 472 nm). La concentration protéique a été déterminée par un essai "Dc protein assay" (Bio-Rad).

- **Dégradation de CFP-Atg8p et GFP-Atg8p**

Des cellules transformées par un plasmide centromérique exprimant CFP-Atg8p (pJMG358) ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance, récoltées, lavées deux fois à l'eau et resuspendues en SD-N. Des aliquots ont été collectés après 0, une et deux heures. Des extraits protéiques ont été préparés et une détection anti-GFP a été effectuée.

Les cellules exprimant GAL-GFP-Atg8p au locus ont été cultivées en SD+ raffinose. Après induction de la synthèse de GFP-Atg8p pendant 20 minutes par ajout de galactose, la synthèse est stoppée par ajout de glucose pendant 5 minutes. Les cellules sont lavées et transférées en milieu SD-N et des extraits protéiques sont préparés aux temps 0, 30, 60, 90 et 120'. Une immunodétection de la GFP est effectuée.

Microscopie électronique

La préparation des échantillons pour la microscopie électronique a été effectuée comme décrit précédemment (Kaiser and Schekman 1990). Brièvement, des cellules en phase exponentielle de croissance ont été fixées au permanganate, déshydratées et incluses dans de la résine spurs. Les

sections ont été coupées avec un couteau en diamant et contrastées avec de l'acétate d'uranyle et du Loodcitra. Elles ont été visualisées sous un microscope électronique Leica.

Pulse-chase ApeI

Une analyse en pulse-chase de la maturation de ApeI a été effectuée comme décrit précédemment (Silles et al. 2000) avec les modifications indiquées dans (Avaro et al. 2002). Les cellules ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance en milieu minimum et concentrées jusqu'à 5 unités DO₆₀₀/ml. Après 15 min d'incubation, les cellules ont été marquées pendant 5 min avec 150 µCi [35S]-Promix (Amersham biosciences) par ml de culture. Une chasse par un excès d'un mélange de méthionine et de cystéine (10mM) a alors été effectuée. Des aliquots de 0.3ml ont été prélevés après 0, 1h et 2 heures de chasse. ApeIp a été immunoprécipitée avec du sérum anti-ApeIp en présence de protéine A-Sépharose (sigma) à 4°C pendant une nuit. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et la radioactivité de prApeI et mApeI a été détectée par autoradiographie.

Mesure de la pexophagie

La pexophagie a été mesurée comme précédemment décrit (Hutchins et al. 1999). Des cellules non transformées ou transformées avec RFP-SKL (pJMG435) ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance en milieu YPD et diluées en SGd (0.67% YNB without amino acids, 50 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, 50 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, 3% glycerol, 0.1% glucose, pH 5.5, acides aminés appropriés) pendant 12 h. Puis du 10x YP (concentration finale : 1% yeast extract et 2% peptone) a été ajouté et l'incubation a été poursuivie pendant 4 heures. Après lavage avec de l'eau, les cellules ont été resuspendues en milieu YTO (0.67% YNB without amino acids, 0.1% Tween-40, 0.1 % oleic acid, acides aminés appropriés) et incubées à 30°C pendant 19 heures pour induire la prolifération des peroxysomes. Les cellules ont enfin été mises en milieu SD-N (t=0) et incubées à 30°C. La dégradation des peroxysomes a été suivie aux temps 0 h, 1h30, 3h, 4h30 et 7h, par microscopie à fluorescence et par précipitation avec 10% acide trichloroacétique et immuno-détection contre Fox3p.

Double hybride

Les doubles hybrides ont été effectués comme décrit précédemment dans des souches de levure de contexte génétique W303 contenant le reporteur LacZ sur le plasmide pSH18.34. Les plasmides dérivés de pEG203 exprimant le domaine de liaison à l'ADN (DBD), LexA et les plasmides pJG4-6 – contenant les fusions au domaine d'activation transcriptionnel (AD), B42 ont été utilisés (Ausubel et al. 1991; Gyuris et al. 1993). Les résultats sont exprimés en unités Miller et sont les moyennes de trois expériences indépendantes +/- l'écart type.

GST pull down *in vivo*

Le protocole utilisé a été décrit précédemment (Galan and Peter 1999). Des cellules yJMG1065 (Atg11-Myc GAL-GST-Irs4p cells), yJMG1068 (Atg11 Δ Cter-Myc GAL-GST-Irs4p) et yJMG1061 (Atg11-Myc) transformées par un plasmide vide GAL-GST ont été cultivées en milieu S Raf jusqu'en phase exponentielle. Du galactose (2% final) a alors été ajouté. Après 90 minutes d'incubation, 60 unités DO₆₀₀ ont été culottées et resuspendues dans du tampon PBS froid (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM Na₂HPO₄; 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.3) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche) et du PMSF (Sigma). Les cellules ont été lysées avec un extracteur "One Shot cell extractor" (Constant Systems, Warwick, U.K.). La concentration protéique a été déterminée par un essai "Dc protein assay" (Bio-Rad). Les lysats contiennent environ 8 mg/ml de protéines totales. Les débris cellulaires ont été éliminés des lysats par centrifugation pendant 4 minutes à 500g. Puis, les lysats ont été incubés sur roue en présence de 30 μ L de billes Glutathion-Sepharose 4B (Amersham) pendant une heure à 4°C. Les billes ont été lavées quatre fois avec du PBS. Les protéines attachées ont alors été éluées avec du tampon Laemli. Après SDS PAGE, l'immunodétection a été effectuée avec de l'anticorps anti-GST pour contrôler la présence de GST-Irs4p ou de GST et de l'anticorps anti-Myc pour détecter Atg11-Myc ou Atg11 Δ Cter-Myc.

II.C. Résultats

II.C.1. Caractérisation de la fonction de Irs4p et Tax4p dans l'autophagie

La majorité des résultats présentés dans cette partie concernent l'autophagie. Ils font l'objet d'un manuscrit soumis à publication (annexe 2). Certains résultats complémentaires concernant les propriétés de Irs4p et Tax4p seront discutés au chapitre II.C.2.

ARTICLE 2 (annexe 2)

**Irs4p/Tax4p : two yeast EH domain
proteins involved in autophagy.**

*Irs4p/Tax4p : deux protéines à domaine EH de levure
impliquées dans l'autophagie.*

Amandine Bugnicourt¹, Muriel Mari², Fulvio Reggiori², Rosine Haguenaer Tsapis¹, Jean-Marc Galan¹

¹Institut Jacques Monod-CNRS/ Universités Paris 6 & 7

2 place Jussieu

75251 PARIS Cedex 05

France

² Department of Cell Biology and Institute of Biomembranes

University Medical Center Utrecht

3584 CX Utrecht

The Netherlands

Running title: EH proteins and autophagy

Key words: EH proteins, cytoplasm to vacuole pathway, bulk autophagy, pexophagy, Irs4p, Tax4p, Atg11p.

Irs4p et Tax4p n'ont pas de fonction dans l'endocytose et le recyclage

Dans le but d'étudier la fonction potentielle de Irs4p et Tax4p dans le trafic, nous avons construit une souche délétée pour *IRS4* et *TAX4* (yJMG982) car Irs4p et Tax4p ont des structures similaires. De plus, elles ont été montrées comme redondantes pour leur fonction régulatrice sur Inp51p (Morales-Johansson et al. 2004). En raison de l'organisation similaire d'Irs4p, Tax4p avec les protéines EHD de mammifère (un domaine EH en Cter), nous avons tout d'abord testé si Irs4p/Tax4p étaient impliquées dans le recyclage. Comme étudié lors du chapitre I.C.2.b., Irs4p et Tax4p n'interviennent pas dans le recyclage de Fur4p depuis le compartiment endosomal tardif modifié (Classe E) dans *vps37Δ* puisque aucune différence n'a été observée entre *irs4Δtax4Δvps37Δ* et *vps37Δ* (voir figure 47).

Nous avons également étudié le recyclage depuis l'endosome précoce. Pour cela, nous avons transformé des cellules *WT* et yJMG982 avec un plasmide exprimant GFP-Snc1p. Snc1p est une SNARE de membrane plasmique qui voyage entre endosomes précoces, Golgi et membrane plasmique (Galan et al. 2001). Comme mentionné précédemment, dans une souche *wt*, GFP-Snc1p est à la membrane plasmique sous forme hyperphosphorylée (fig. 55.A). Dans des souches déficientes pour le recyclage de Snc1p, comme *vps51Δ*, GFP-Snc1p s'accumule dans des structures internes sous forme non phosphorylée. Dans yJMG982, GFP-Snc1p est majoritairement intracellulaire et non phosphorylée (Fig. 55.A), ce qui pourrait indiquer un défaut de recyclage. Cependant en vérifiant la position du gène codant pour Irs4p, nous avons vu qu'il était sur le chromosome XI à proximité du promoteur de *Vps51p* sur le brin opposé (fig. 55.B).

Comme *Vps51p* fait partie du complexe GARP/VFT requis pour la fusion des vésicules endosomales précoces au TGN (Siniosoglou and Pelham 2002), un complexe important pour le recyclage de plusieurs cargos incluant Snc1p, cette proximité nous a alerté. Pour savoir si le défaut de recyclage observé pour Snc1p dans yJMG982 est la conséquence de la délétion d'*IRS4* et *TAX4* ou la conséquence de la disruption du promoteur de *VPS51*, nous avons construit un plasmide intégratif portant *VPS51* et nous l'avons introduit au locus d'*ADHI*. Comme montrée en fig. 55.A, l'expression de *Vps51p* au locus *ADH* restaure un phénotype sauvage pour Snc1p dans yJMG982 alors que le plasmide vide ne le restaure pas. Le phénotype observé dans yJMG982 est donc probablement la conséquence d'un défaut d'expression de *VPS51*. Ainsi, Irs4p et Tax4p ne sont pas nécessaires pour le recyclage de Snc1p. Afin d'éviter des erreurs d'interprétation concernant les phénotypes réellement causés par les délétions d'*IRS4* et *TAX4*, nous avons utilisé la souche yJMG1012 où *IRS4* et *TAX4* sont délétés et où l'expression de *Vps51p* est maintenue par son intégration au locus *ADHI* pendant tout le travail. Cette souche sera appelée *irs4Δtax4Δ* (yJMG1012) dans le reste du manuscrit.

Donc, Irs4p et Tax4p ne semblent pas être acteurs dans les deux routes de recyclage connues : endosomes précoces, Golgi, membrane plasmique, ni dans celle directement de l'endosome tardif vers

la membrane plasmique. Leur fonction est donc différente de celle des protéines EHD présentant également un seul domaine EH en C-terminal.

Comme un défaut d'endocytose a été décrit pour Fur4p dans les souches délétées pour *EDE1*, *END3* et *PANI* (Gagny et al. 2000), nous avons étudié si c'était également le cas dans la souche *irs4Δtax4Δ*. Nous avons utilisé une souche sauvage comme témoin. Comme précédemment, l'expression de la fusion Fur4-GFP sous contrôle du promoteur GAL a permis d'observer l'acheminement de la protéine à la membrane plasmique des souches *irs4Δtax4Δ* et *WT*. La synthèse de Fur4-GFP a été déclenchée par ajout de galactose pendant deux heures puis du glucose a été introduit pour la stopper suivi d'une incubation de 20 minutes (t=0). A t=0, de la cycloheximide a été ajoutée. Nous avons mesuré l'entrée d'uracile et suivi la localisation de Fur4-GFP par microscopie à fluorescence aux temps 0, 30, 60, 90, 120 et 150 minutes (Fig. 55.C). La majeure partie de Fur4p est à la membrane plasmique à t=0. Dans la souche *WT*, Fur4p est rapidement internalisée (comme mis en évidence par la baisse dans l'activité uracile perméase) et dirigée au lumen vacuolaire (fluorescence). Les cinétiques sont identiques dans *irs4Δtax4Δ* et le *WT* suggérant qu'il n'y a pas de défaut d'endocytose de la perméase à uracile dans les cellules *irs4Δtax4Δ*.

Nous avons également testé si Irs4p et Tax4p pouvaient agir le long de la voie *vps*. Nous avons vérifié cette voie par un test de maturation de la CPY et en suivant le trafic de Sna3-GFP et GFP-Phm5p qui sont dirigées à la vacuole *via* la voie *vps*. Dans un mutant de la voie *VPS*, la maturation de la CPY est déficiente. Dans un mutant classe E, Phm5-GFP est bloquée dans le compartiment classe E et à la membrane de la vacuole et GFP-Sna3p se trouve dans le compartiment classe E (fig. 55.D). Nous avons trouvé des phénotypes similaires dans *WT* et *irs4Δtax4Δ* pour ces trois cargos, avec une très légère différence tout de même pour la CPY (fig. 55.D).

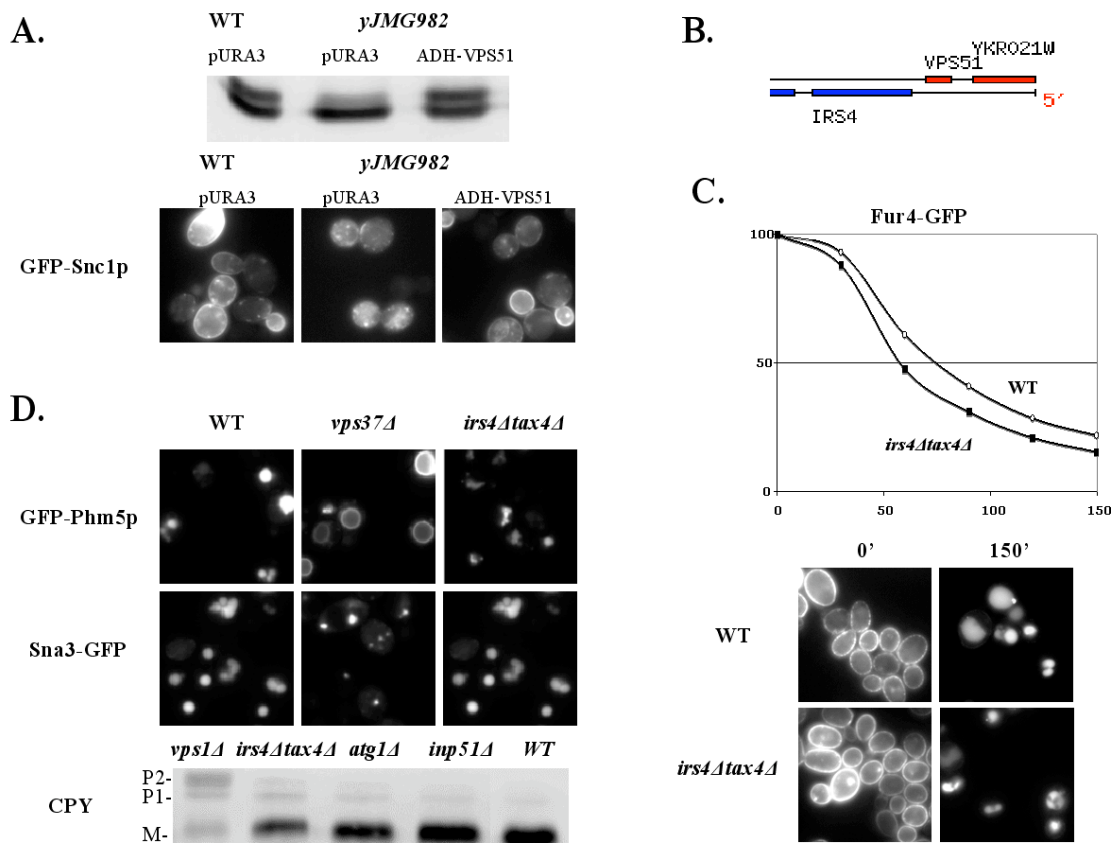


Figure 55 : Irs4p et Tax4p n'interviennent pas au cours de l'endocytose, de la voie vps et du recyclage.

A. Des levures WT, *irs4Δtax4Δ* (γ JMG982, non complétée pour *Vps51p*) transformées avec un plasmide vide (pURA3) et des levures *irs4Δtax4Δ* +ADHVPS51 (γ JMG1012) ont été transformées avec *tpi-GFP-Snc1* et cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance. Des extraits protéiques ont été préparés et la phosphorylation de GFP-Snc1p a été vérifiée par western immunoblotting (en haut). La distribution sub-cellulaire de GFP-Snc1p a été suivie par microscopie à fluorescence (en bas). **B.** Carte partielle du chromosome XI, adaptée de SGD, <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/ORFMAP/ORFmap?dbid=S000001727>. **C.** Des cellules WT (carré noir) et *irs4Δtax4Δ* (cercle blanc) transformées avec GAL-Fur4-GFP ont été cultivées. La synthèse de Fur4-GFP a été induite par ajout de Galactose pendant 90 minutes. Du glucose a été ajouté pour bloquer la synthèse de Fur4-GFP. Après 20 minutes d'incubation, de la cycloheximide a été ajoutée pour induire l'endocytose de la perméase ($t=0$). L'entrée d'uracile a été mesurée toutes les 30 minutes après l'ajout de cycloheximide pendant 3 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'entrée à $t=0$. Les cellules ont été collectées aux temps indiqués après ajout de cycloheximide et visualisées au microscope à fluorescence. **D.** Des cellules WT, *vps37Δ* et *irs4Δtax4Δ* transformées par Sna3-GFP ou GFP-Phm5p ont été cultivées en milieu minimum et observées au microscope à fluorescence. Des cellules WT, *vps1Δ*, *atg1Δ*, *inp51Δ* et *irs4Δtax4Δ* ont été cultivées jusqu'à un DO de 2 en milieu YPD. Des extraits protéiques ont été préparés. Après SDS PAGE, l'immuno-détection de la CPY a été effectuée avec l'anti-CPY. p1 : au niveau du RE, p2 au niveau de l'appareil de Golgi et m au niveau de la vacuole.

Afin de nous aider à découvrir la fonction de ces deux protéines, nous avons étudié leur localisation. End3p, Pan1p et Ede1p fusionnées à la GFP sont localisées au niveau des patches d'actine corticaux. Aucune localisation n'a été publiée pour les deux autres protéines à domaine EH : Irs4p et Tax4p. Nous avons étiqueté Irs4p en C-terminal avec la GFP au locus chromosomique. Irs4-GFP localise au niveau de points cytoplasmiques (fig. 56.A). Comme les niveaux endogènes d'expression d'Irs4p et Tax4p sont très faibles, nous avons construit des plasmides exprimant GFP-Irs4p ou Tax4-GFP sous le contrôle du promoteur constitutif ADH1. Ces constructions confirment qu'Irs4p et Tax4p localisent dans des structures intracellulaires peu nombreuses (fig. 56.A). En co-exprimant GFP-Irs4p et Cherry-Tax4p dans les mêmes cellules, nous avons observé que les deux protéines co-localisent dans les mêmes structures (fig. 56.B). Donc, Irs4p et Tax4p ont une localisation qui diverge de celle des autres protéines de levure portant des domaines EH en Nterminal.

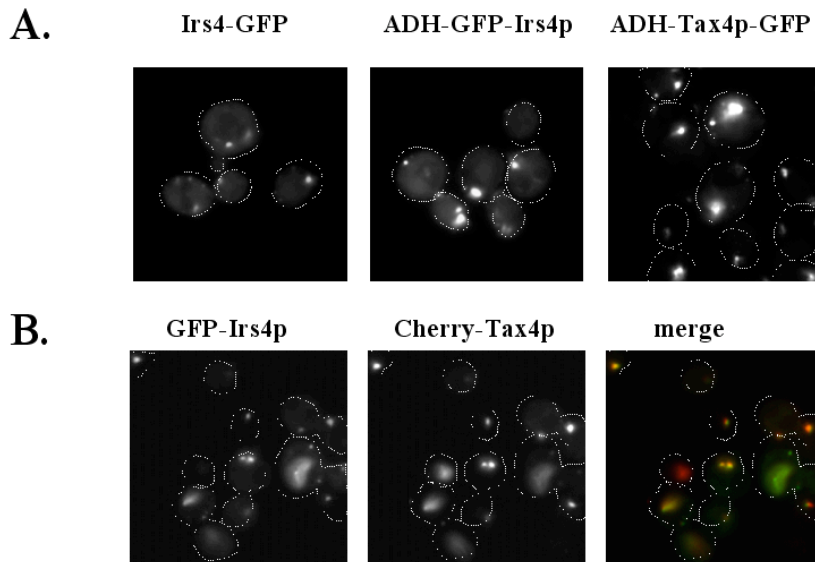


Figure 56: Irs4p et Tax4p localisent dans des structures cytoplasmiques peu nombreuses.

A. Des cellules WT transformées avec ADH-GFP-Irs4p ou ADH-Tax4p-GFP ou des cellules Irs4-GFP ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance en milieu minimum. La localisation d'Irs4p/Tax4p a été visualisée au microscope à épifluorescence. B. Des cellules WT transformées avec ADH-GFP-Irs4p et GAL-Cherry-Tax4p ont été cultivées en milieu minimum avec raffinose puis la synthèse de Cherry-Tax4p a été induite par ajout de galactose pendant 90 min.

Nous avons comparé la localisation d'Irs4p et Tax4p avec des marqueurs de différents compartiments intracellulaires. Nous n'avons trouvé aucune co-localisation avec des marqueurs du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi (GFP-Tlg1p), de la membrane plasmique, des endosomes précoces, de la vacuole et de la mitochondrie (figure 57 A et NP).

En outre, nous avons montré une co-localisation partielle de Tomato-Tax4p avec des marqueurs supposés endosomaux tardifs : GFP-Fab1p, Vps23-GFP dans des cellules *WT* ainsi qu'avec du FM4-

64 endocyté dans des mutants *vps* de classe E (figure 57 et NP), suggérant qu'une fraction de ces protéines à domaine EH localisent dans des endosomes tardifs.

En parallèle, nous avons testé si Irs4p et Tax4p localisaient au niveau de la structure pré-autophagosomale (PAS), les résultats seront présentés à la figure 63 A.

Nous avons également trouvé qu'une fraction de Tax4-GFP se situe au niveau du noyau (colocalisation avec du DAPI, NP) lorsqu'il est exprimé sous contrôle d'un promoteur de faible intensité (figure 57 B). Outre ce marquage nucléaire, ces images montrent qu'une autre population de Tax4-GFP localise au sein de structures ponctuées cytoplasmiques. Après ajout de rapamycine, nous avons observé une modification de cette localisation au profit de la population située dans les structures ponctuées cytoplasmiques. A plus haut niveau d'expression, aucun marquage nucléaire n'est observé.

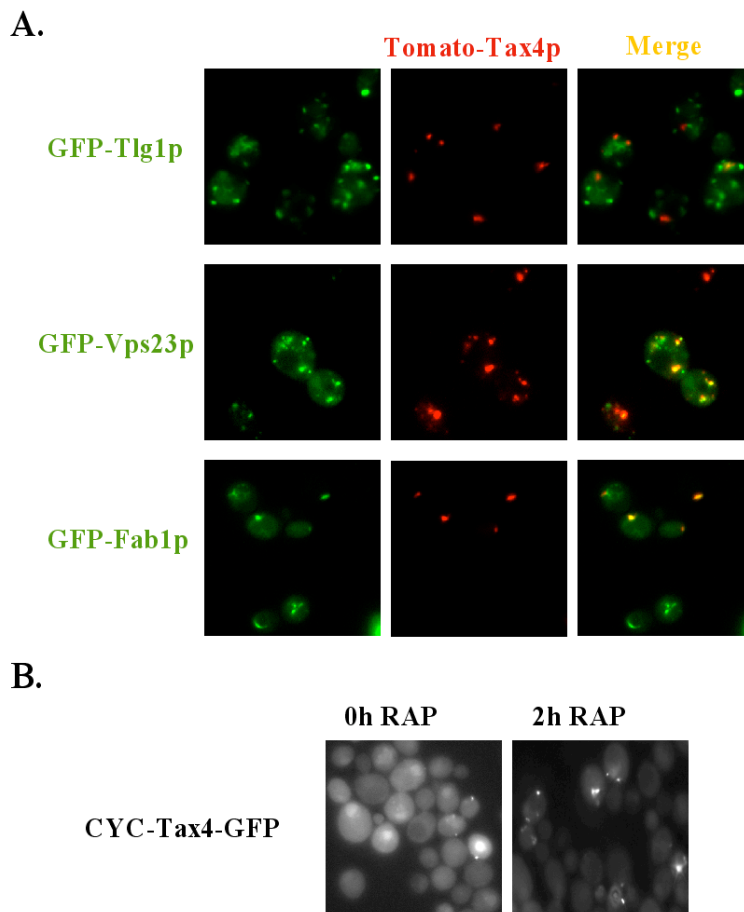


Figure 57 : Nature des structures marquées par Irs4p et Tax4p.

A. Des cellules WT ont été co-transformées avec un plasmide exprimant Tomato-Tax4p sous contrôle du promoteur GPD et un plasmide GFP-Tlg1p ou GFP-Vps23p ou GFP-Fab1p. Elles ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance et observées au microscope. B. Des cellules WT transformées avec CYC-Tax4-GFP ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance et observées au microscope avant et deux heures après ajout de rapamycine (0.2µg/ml).

Comme notre étude en microscopie n'a pas permis de déterminer avec précision la localisation de la totalité des deux protéines à domaine EH, nous avons donc décidé d'utiliser une autre stratégie afin de nous aider à découvrir le rôle d'Irs4p et Tax4p. Nous avons recherché des conditions qui modifieraient la stabilité ou le profil électrophorétique de ces protéines. Pour cette approche, nous avons construit une version d'Irs4p étiquetée avec Myc au locus. De manière intéressante, nous avons trouvé qu'Irs4-Myc apparaissait sous forme d'un doublet après immunoblot et détection par un anticorps anti-Myc (fig. 58.A) alors que Tax4-Myc se présente sous forme d'une simple bande. Afin de découvrir la nature de la modification sur Irs4p, nous avons vérifié le profil après traitement à la phosphatase alcaline (CIP) (fig. 58.B). Dans ces conditions, la bande de migration lente disparaît partiellement au profit de la bande migration rapide, indiquant qu'Irs4p est modifiée par phosphorylation. Nous ne pouvons pas exclure qu'un deuxième type de modification s'y ajoute.

Nous avons alors testé si cette phosphorylation d'Irs4p était régulée dans différentes conditions de croissance. Nous avons trouvé que la phosphorylation était légèrement augmentée en YNB par rapport au YPD et en phase stationnaire par rapport à la phase exponentielle (NP). De façon intéressante, Irs4p est rapidement phosphorylée en réponse à la rapamycine, en moins de trente minutes (fig. 58.C). La phosphorylation reste stable même après un long traitement (120'). En conclusion, Irs4p est modifiée par phosphorylation en réponse à la rapamycine. La rapamycine, qui mime la carence azotée, est connue pour induire l'autophagie. Ceci nous a donc conduit à tester si la fonction d'Irs4p et Tax4p pouvait être reliée à l'autophagie.

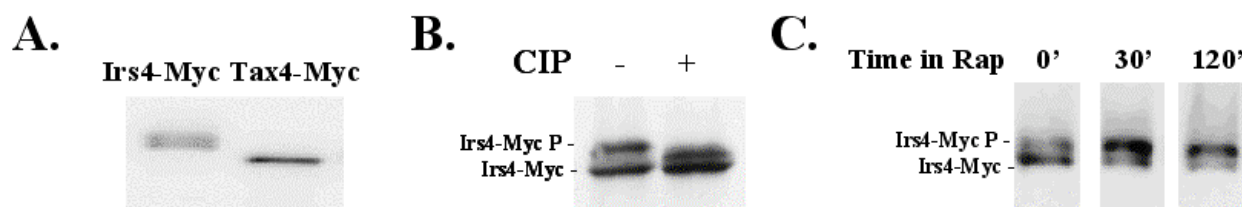


Figure 58: Irs4p est une phosphoprotéine phosphorylée en présence de Rapamycine.

A. Des cellules Irs4-Myc et Tax4-Myc ont été cultivées en YPD jusqu'en phase exponentielle de croissance, puis des extraits protéiques ont été réalisés. Après SDS-PAGE, une immunodétection anti-Myc a été effectuée. B. Les cellules Irs4-Myc décrites en A. ont été traitées avec ou sans phosphatase alcaline (CIP). C. Les cellules Irs4-Myc ont été cultivées en YPD jusqu'en phase exponentielle de croissance et traitées avec ou sans Rapamycine (RAP) pendant 0', 30' ou 120'.

L'autophagie non sélective est retardée par l'absence d'Irs4p et Tax4p

Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, l'autophagie est une voie de dégradation induite par des conditions défavorables pour la cellule, comme la carence azotée (NS) qui peut être mimée par une drogue, la rapamycine dont la voie TOR (target of rapamycin) est la cible.

Nous avons donc tout d'abord testé la croissance de souches *irs4Δ* (complémentée pour Vps51p), *tax4Δ* et *irs4Δtax4Δ* en présence de rapamycine en incluant la souche *WT* et le mutant *atg11Δ* comme témoins négatif et positif de sensibilité respectivement (fig. 59). La résistance des souches *irs4Δ* et *tax4Δ* à la rapamycine est comparable à celle du sauvage. Au contraire, *irs4Δtax4Δ* et *atg11Δ* ont une croissance beaucoup plus faible. Cette sensibilité à la rapamycine suggère un défaut de survie dans les conditions induisant l'autophagie.

Nous avons également étudié cette même question en suivant la survie des cellules en NS. En effet, la perte de viabilité en NS a été utilisée comme outil de divers cribles d'identification de mutants déficients pour l'autophagie (Tsukada and Ohsumi 1993). Nous avons déterminé le taux de survie de cellules *irs4Δ* (complémentée pour l'expression de Vps51p), *tax4Δ* et *irs4Δtax4Δ* en NS en incluant la souche *WT* et les mutants d'autophagie *atg6Δ* (*vps30Δ*) et *atg1Δ* comme souches témoins. Les cellules ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle en milieu riche puis transférées en SD-N. Après 0, 1, 2, 3 et 4 jours, des aliquots ont été prélevés, dilués et étalés sur des boîtes YPD. Les colonies ont alors été comptées. Les souches *WT*, *irs4Δ*, *tax4Δ* et *inp51Δ* (fig. 59 A et NP) ont un taux de survie élevé. Au contraire, le mutant *atg1Δ* meurt en deux jours. Les souches *vps30Δ* et *irs4Δtax4Δ* sont également très sensibles à la NS avec une perte de viabilité quasi-totale après quatre jours.

En conclusion, la souche *irs4Δtax4Δ* est sensible à la rapamycine ainsi qu'à la NS alors que les simples mutants *irs4Δ* et *tax4Δ* ne le sont pas, suggérant une redondance fonctionnelle des deux protéines. De plus, comme *inp51Δ* n'est pas sensible à la carence, nous concluons que le rôle d'Irs4p et Tax4p dans la survie en carence est indépendant de leur action sur Inp51p. La double délétion de *IRS4* et *TAX4* est une phénotypie de celle de *INP51* pour le niveau de PI(4,5)P2 (Morales-Johansson et al. 2004) mais pas pour la survie en NS. Comme cette sensibilité à la carence pourrait provenir d'un défaut d'autophagie, nous avons voulu tester cette hypothèse directement. Il est à noter que dans certains cas, des défauts de viabilité sont observés dans des mutants de la voie *VPS*, *vps4Δ*, *vps5Δ*, *vps27Δ*, et *vps29Δ* (Reggiori et al. 2003), ce qui ne semble pas être le cas pour le mutant *irs4Δtax4Δ* pour lequel nous avons montré la fonctionnalité de la voie *vps* (figure 55.D.). Au contraire, les mutants d'autophagie comme *atg1Δ* présentent un profil normal de maturation de la CPY (fig 55.D) tout en étant hypersensible à la NS (fig. 59.B.) ; nous décrivons des phénotypes équivalents dans les cellules *irs4Δtax4Δ*. Nous avons alors étudié l'autophagie par différentes approches.

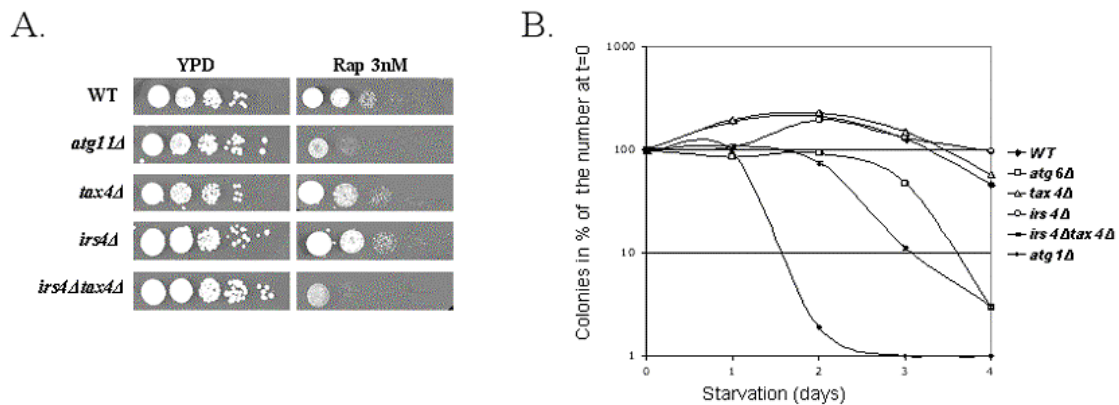


Figure 59: Les cellules *irs4Δtax4Δ* sont hypersensibles aux conditions induisant l'autophagie.

A. Les levures *WT*, *atg1Δ*, *tax4Δ*, *irs4Δ* (complémentée pour *Vps51p*) et *irs4Δtax4Δ* ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle. Après dilution en série, des aliquots ont été déposés sur des boîtes YPD sans ou avec 3nM RAP. **B.** Des cellules *WT* (losange noir), *atg1Δ* (cercle blanc), *tax4Δ* (triangle blanc), *atg6Δ* (carré blanc), *irs4Δ* (complémentée pour *Vps51p*, losange blanc) et *irs4Δtax4Δ* (croix) ont été cultivées jusqu'à 1 Unité DO_{600}/ml en SD, lavées deux fois avec de l'eau et resuspendues en SD-N. Après 0, 1, 2, 3 et 4 jours, des aliquots ont été prélevés, dilués et étalés sur des boîtes YPD. Les colonies ont alors été comptées. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de colonies à $t=0$ en échelle semi-log.

Dans le but de tester la voie d'autophagie, nous avons tout d'abord utilisé le test classique de l'activité de Pho8Δ60. La phosphatase alcaline (Pho8p) déléetée de son segment trans-membranaire (notée Pho8Δ60) est cytoplasmique et constitue un cargo de l'autophagie. Après l'arrivée à la vacuole du corps d'autophagie et sa dégradation, Pho8Δ60p est maturée sous sa forme enzymatique active. On peut mesurer son activité qui est proportionnelle au taux d'autophagie (Noda et al. 1995). Nous avons construit des souches déléetées pour *PHO13* (une autre phosphatase qui peut fausser l'activité mesurée) et où *PHO8* est remplacée par *PHO8Δ60*. Nous avons cultivé les levures *pho8Δ60pho13Δ*, *pho8Δ60pho13Δatg1Δ*, *pho8Δ60pho13Δirs4Δtax4Δ* et mesuré l'activité enzymatique de Pho8Δ60p comme décrit dans les matériels et méthodes de ce chapitre (fig. 60.A.). Comme attendu, alors que dans la souche *pho8Δ60pho13Δ*, l'activité augmente rapidement en SD-N, l'activité dans *pho8Δ60pho13Δatg1Δ* reste stable. Dans les cellules *pho8Δ60pho13Δirs4Δtax4Δ*, l'activité reste inchangée pendant les 90 premières minutes puis atteint le même niveau que dans la souche *pho8Δ60pho13Δ* après 4 heures. Il y a donc un retard dans le processus d'autophagie dans *pho8Δ60pho13Δirs4Δtax4Δ* mais pas un blocage total.

La capacité autophagique des cellules peut également être quantifiée par le test de dégradation de CFP-Atg8p. En effet, CFP-Atg8p est associée aux membranes externes et internes de l'autophagosome (Suzuki et al. 2001). Après fermeture de la vésicule, la fraction d'Atg8p associée à la membrane interne est transportée à la vacuole où le corps d'autophagie et CFP-Atg8p sont dégradés (Kirisako et

al. 1999). Donc, la quantité de CFP libre résistante aux protéases vacuolaires générée est corrélée à la vitesse d'autophagie. Nous avons étudié la vitesse de dégradation de CFP-Atg8p dans les cellules *WT*, *atg1Δ*, *irs4Δtax4Δ* et *inp51Δ*. Des cellules en phase exponentielle de croissance sont transférées en SD-N. Des extraits protéiques sont préparés au temps 0', 60' et 120'. Un anticorps anti-GFP est utilisé pour suivre à la fois la disparition de CFP-Atg8p et l'apparition du produit de dégradation, la CFP (fig. 60.B.). Comme attendu, CFP-Atg8 est stable dans *atg1Δ* alors que la majorité de CFP-Atg8 a disparu après deux heures en carence dans les cellules *WT* et *inp51Δ*. Nous avons également vérifié le profil de dégradation de CFP-Atg8p dans les souches *irs4Δ* (complémentée pour *Vps51p*) et *tax4Δ* et trouvé un phénotype sauvage pour ces simples mutants (NP). Au contraire, un retard important dans l'apparition de la bande de CFP est observé dans *irs4Δtax4Δ*. Donc, l'autophagie est inhibée dans les cellules *irs4Δtax4Δ*, mais pas dans *inp51Δ*.

Le niveau d'expression de CFP-Atg8p semble cependant plus faible dans le mutant *irs4Δtax4Δ* par rapport au *WT*. Nous avons étudié l'effet de la sur-expression d'Atg8p sur le défaut de survie en carence de *irs4Δtax4Δ* (fig. 60.D). De manière intéressante, la sur-expression d'Atg8p supprime le défaut de survie de *irs4Δtax4Δ* mais également partiellement celui de *atg1Δ*, cet effet suppresseur semble donc général.

L'expression de *ATG8* est induite en conditions de carence. Nous avons alors posé la question de savoir si le défaut d'autophagie observé était la conséquence d'une plus faible induction de Atg8p dans les cellules *irs4Δtax4Δ*. Pour cela, nous avons utilisé des souches délétées pour *PEP4* afin d'inhiber la dégradation de Atg8p et de suivre uniquement son induction en SD-N. En utilisant un anticorps dirigé contre Atg8p, nous avons trouvé que l'induction de Atg8p en carence était identique dans les cellules *pep4Δ* et *irs4Δtax4Δpep4Δ* (fig. 60 E).

Nous avons construit des souches où *ATG8* est remplacé par GAL-GFP-ATG8 au locus. Après induction de la synthèse de GFP-Atg8p pendant 20 minutes, les cellules ont été transférées en milieu SD-N (fig. 60.C). Cette expérience confirme le retard dans la disparition de la bande GFP-Atg8p au profit de la bande GFP libre dans des conditions où les niveaux protéiques sont équivalents. Donc, le défaut d'autophagie observé dans n'est pas la conséquence d'un niveau différent de la protéine Atg8p. De plus, en condition végétative ; nous avons observé que GFP-Atg8p était normalement acheminée au PAS dans les cellules *irs4Δtax4Δ* (NP). Le défaut d'autophagie observé dans *irs4Δtax4Δ* n'est donc pas la conséquence d'une délocalisation ou d'un retard d'acheminement de Atg8p au PAS mais bien un retard dans le trafic autophagosomal de Atg8p vers la vacuole, probablement dû à un ralentissement dans la formation des autophagosomes.

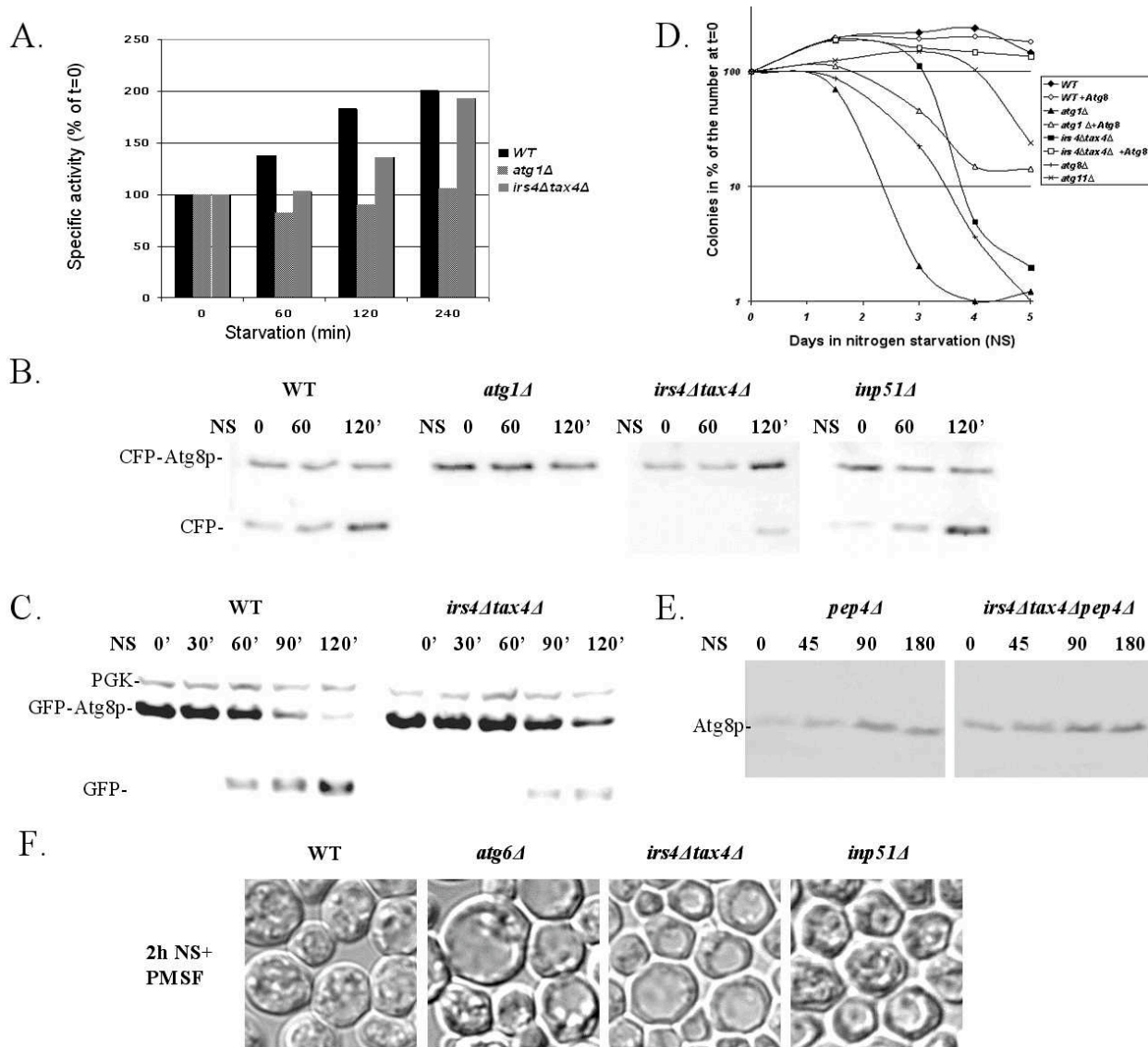


Figure 60 : L'autophagie non sélective est retardée en l'absence de Irs4p et Tax4p.

A. Des cellules WT, *pho13Δpho8Δ60* (noir), *atg1Δ pho13Δpho8Δ60* (gris hachuré) et *irs4Δtax4Δ pho13Δpho8Δ60* (gris foncé) ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle, lavées deux fois et resuspendues en SD-N. L'équivalent de 5 unités DO_{600} de cellules a été prélevé aux temps 0, 60, 120 et 240 min. L'activité *Pho8Δ60* a été mesurée comme décrit dans les matériels et méthodes. Le produit de la réaction a été quantifié en mesurant la fluorescence et la quantité de protéines a été déterminée pour calculer l'activité spécifique. Les résultats sont exprimés comme un pourcentage de l'activité à $t=0$ pour chaque souche. **B.** Des cellules en phase exponentielle de croissance WT, *atg1Δ*, *inp51Δ* et *irs4Δtax4Δ* transformées par CFP-Atg8p ont été lavées deux fois et transférées en SD-N. Des extraits protéiques ont été préparés aux temps 0', 60' et 120'. L'anticorps anti-GFP permet de suivre la disparition de CFP-Atg8p et l'apparition du produit de dégradation, la CFP. **C.** Les cellules WT, GAL-GFP-Atg8p et *irs4Δtax4Δ*, GAL-GFP-Atg8p ont été cultivées en raffinose. Après induction de la synthèse de GFP-Atg8p pendant 20 minutes, la synthèse est stoppée par ajout de glucose. Les cellules ont été transférées en milieu SD-N et des extraits protéiques sont préparés aux temps 0, 30, 60, 90 et 120'. **D.** Des cellules WT (losange noir), WT transformées par pCu-GFP-Atg8p (losange blanc), *atg1Δ* (triangle noir), *atg1Δ x pCu-GFP-Atg8p* (triangle blanc), *irs4Δtax4Δ* (carré noir), *irs4Δtax4Δ x pCu-GFP-Atg8p* (carré blanc), *atg8Δ* (croix), *atg11Δ* (étoile) ont été traitées comme à la fig.59. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de colonies à $t=0$ en échelle semi-log. **E.** Des cellules *pep4Δ* et *irs4Δtax4Δpep4Δ* ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle et soumises à une NS. Des extraits protéiques ont été préparés aux temps indiqués après NS et la quantité d'Atg8p présente a été détectée avec un anticorps anti-Atg8p après SDS-PAGE. **F.** Des cellules en phase exponentielle de croissance WT, *atg1Δ*, *inp51Δ* et *irs4Δtax4Δ* ont été lavées deux fois et transférée en SD-N pendant deux heures en présence de PMSF puis observées au microscope au filtre Nomarski.

Associé à ce défaut d'autophagie transitoire, on s'attend à observer moins de corps d'autophagie dans les vacuoles de *irs4Δtax4Δ* si on inhibe l'activité des protéases les dégradant. Pour tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord observé en contraste de phase des cellules WT, *atg6Δ*, *inp51Δ* et *irs4Δtax4Δ* deux heures après transfert en milieu carencé en présence de PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) qui inhibe l'activité des protéases vacuolaires. Les résultats présentés en figure 60.F montrent des vacuoles d'aspect granuleux dans les souches WT et *inp51Δ* tandis que les vacuoles de *atg6Δ* et de *irs4Δtax4Δ* sont d'aspect régulier. Ces images suggèrent un nombre restreint de corps d'autophagie dans la souche *irs4Δtax4Δ*. Afin de disposer d'un essai plus fiable et quantitatif, nous avons construit des souches délétées pour *ATG1* ou *INP51* ou *IRS4* et *TAX4* et dans tous les cas pour *PEP4*, codant la principale protéase vacuolaire impliquée dans la dégradation des corps d'autophagie. Les cellules ont été cultivées en YPD, lavées deux fois et transférées en SD-N et la présence de corps d'autophagie a été étudiée par microscopie électronique.

Lors d'une première tentative, nous avons étudié le nombre de corps d'autophagie présents dans les vacuoles 6 heures après passage en SD-N (fig 61.A.). Les cellules ont été traitées pour la microscopie électronique, voir le détail du protocole dans la partie matériel et méthodes de ce chapitre. Comme déjà publié, les vacuoles de *atg1Δpep4Δ* ne contiennent aucun corps d'autophagie même après une longue carence. Au contraire, les vacuoles de *pep4Δ*, *inp51Δpep4Δ* et *irs4Δtax4Δpep4Δ* sont remplies de corps d'autophagie (fig 61.A.). Ce résultat semble contradictoire par rapport aux défauts d'autophagie observés dans *irs4Δtax4Δ* avec divers cargos (fig 60). Cependant, nous avons observés que ces défauts étaient transitoires, nous avons donc effectué dans un deuxième temps une étude cinétique de l'apparition des corps d'autophagie. Pour cela, des aliquots ont été prélevés après 0', 30', 1 heure, 2 heures et 4 heures en milieu carencé dans les souches *pep4Δ* et *irs4Δtax4Δpep4Δ*. Un exemple d'image aux temps 0', 30', 60', 120' et 4 heures est montré (fig. 61.B.). On peut noter que les corps d'autophagie sont regroupés au centre du lumen avant de remplir toute la vacuole. Soixante coupes (correspondant à des cellules où le noyau et une large vacuole sont visibles) de chaque type cellulaire ont été sélectionnées et les corps d'autophagie y ont été comptés (fig. 61.C.). En moyenne, deux corps d'autophagie sont présents dans chaque cellule *pep4Δ* après 60 minutes d'induction de l'autophagie alors qu'on n'en observe que très rarement dans les vacuoles de *irs4Δtax4Δpep4Δ*. Après 4 heures en SD-N, un moyenne de 7 corps d'autophagie sont visibles par vacuole des souches *pep4Δ* et *irs4Δtax4Δpep4Δ*. En parallèle, la taille des corps d'autophagie a été examinée. Les corps d'autophagie dans les cellules déficientes pour Irs4p, Tax4p et Pep4p semblent de taille comparable à ceux des cellules *pep4Δ* (NP).

En conclusion de cette seconde partie, les résultats de la microscopie électronique semblent en accord avec ceux des tests de l'activité Pho8Δ60p et de la dégradation d'Atg8p et confirment un retard dans la mise en place du processus d'autophagie dans les cellules *irs4Δtax4Δ* par rapport à des cellules sauvages.

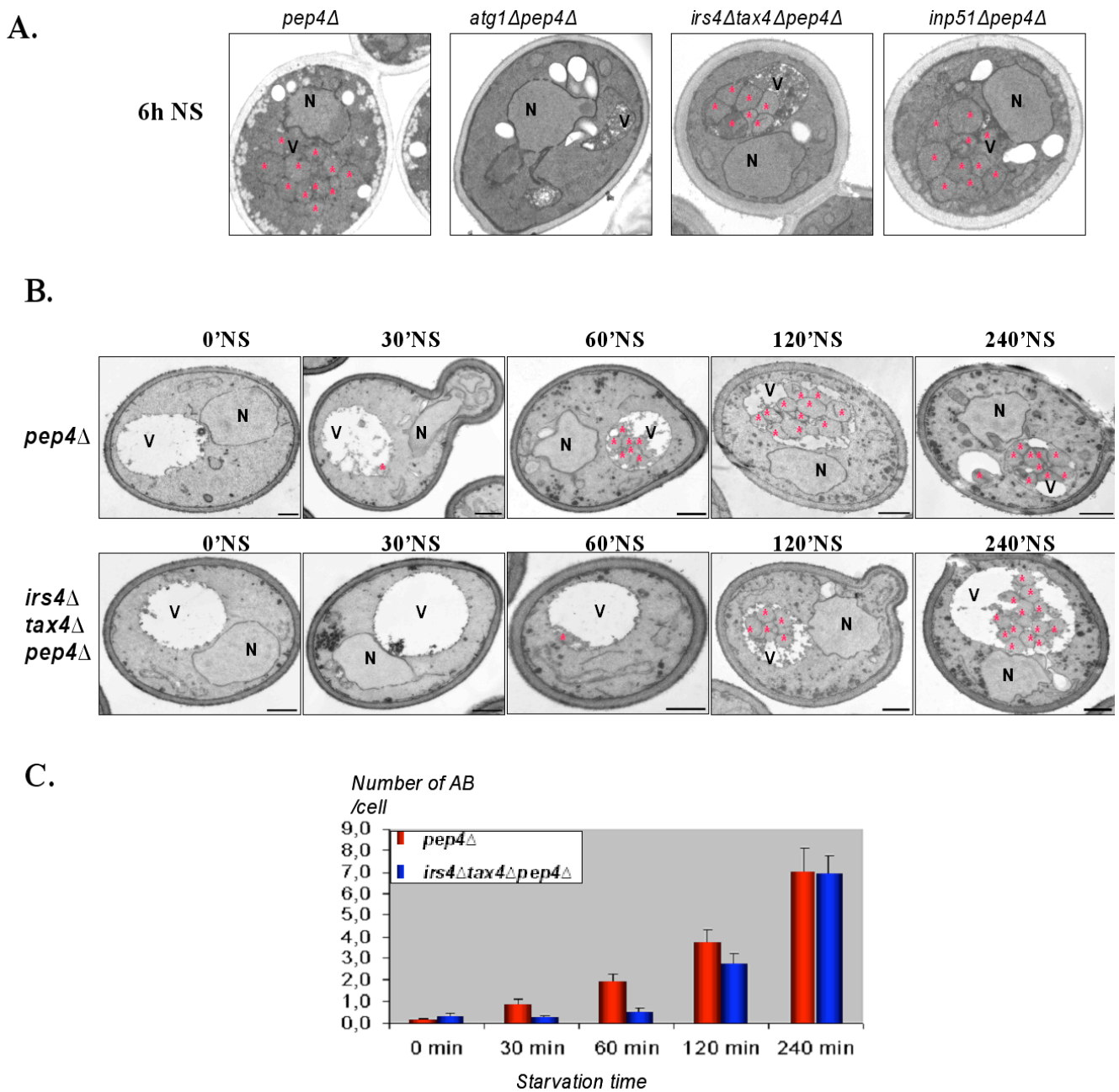


Figure 61: Etude de la présence de corps d'autophagie dans les vacuoles par microscopie électronique

A. Des cellules *pep4Δ*, *atg1Δpep4Δ*, *inp51Δpep4Δ* et *irs4Δtax4Δpep4Δ* ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle, lavées deux fois et resuspendues en SD-N. Après 6 heures d'incubation, elles ont été traitées pour la microscopie électronique. Un profil représentatif de chaque type cellulaire est présenté. **B.** Des cellules *pep4Δ* et *irs4Δtax4Δpep4Δ* ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle, lavées deux fois et resuspendues en SD-N. Aux temps 0, 30, 60, 120 et 240 min, des échantillons ont été prélevés et traités pour la microscopie électronique comme décrit dans les matériels et méthodes. Un exemple est montré pour chaque souche. **C.** La quantification des corps d'autophagie a été effectuée sur 60 cellules de chaque type cellulaire à chaque temps dans les cellules *pep4Δ* et *irs4Δtax4Δpep4Δ* décrites en B.. N: noyau ; V: vacuole ; *: corps d'autophagie ; Barre d'échelle : 500 nm.

La voie CVT est fonctionnelle dans les cellules déficientes pour Irs4p et Tax4p

Le défaut d'autophagie non sélective observé dans *irs4Δtax4Δ* est-il spécifique à cette voie ou commun à toutes les voies mêmes sélectives (*i.e.* CVT et pexophagie) qui ont des machineries partiellement similaires ?

Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord vérifié la fonctionnalité de la voie CVT (cytoplasm to vacuole targeting) active en milieu riche et qui est spécifique de l'aminopeptidase I (ApeI_p). Le précurseur de cette protéine (prApeI) cytosolique est emmené à la vacuole par la voie CVT où le pro-peptide est clivé, ce qui génère la forme mature (mApeI) (Leber et al. 2001). Ce clivage donne lieu à une modification du poids moléculaire que l'on peut suivre en analyse par pulse-chase, voir détail du protocole dans la section matériel et méthode. Comme publié, prApeI est maturée en moins d'une heure dans des cellules sauvages alors qu'aucune maturation n'est observée dans les cellules *atg1Δ* (fig. 62.A). Dans *irs4Δtax4Δ* et *inp51Δ*, ApeI_p est également maturée en une heure (fig. 62.A). Donc, la voie CVT n'est pas affectée par l'absence de Irs4p et Tax4p. Ce résultat a été confirmé en suivant par microscopie à fluorescence la localisation vacuolaire de ApeI-RFP dans les différentes souches (NP).

Irs4p et Tax4p sont nécessaires pour la pexophagie

La pexophagie ou dégradation sélective des peroxyosomes peut également être suivie chez *S.cerevisiae* (Hutchins et al. 1999). La prolifération des peroxyosomes est induite par une croissance des cellules en présence d'acide oléique. Leur dégradation est alors induite par transfert dans un milieu carencé SD-N. Nous avons étudié cette voie en suivant RFP-SKL (signal d'adressage au peroxyosome fusionné à la RFP) en microscopie à fluorescence et la dégradation de Fox3p, thiolase située dans la matrice peroxyosomale par immunoblot. La pexophagie a été induite dans les cellules *WT*, *atg1Δ*, *irs4Δtax4Δ* et *inp51Δ* transformées avec RFP-SKL et cultivées comme indiqué dans les matériels et méthodes. La dégradation des peroxyosomes a été suivie aux temps 0h, 1h30, 3h, 4h30 et 7h (fig. 62.B à gauche et NP) en fluorescence et par préparation d'extraits protéiques. L'apparition de fluorescence dans les vacuoles est difficile à quantifier, nous avons donc compté le nombre de peroxyosomes restant sur 25 cellules de chaque type cellulaire à chaque temps (fig. 62.B, à droite). Dans toutes les souches, une moyenne de 7-8 peroxyosomes cytoplasmiques par cellule sont observés à t=0. Dans les cellules *WT* et *inp51Δ*, la majorité des lumens vacuolaires sont marqués par la RFP après 90 minutes et les cytoplasmes contiennent moins de deux peroxyosomes chacun. Dans *atg1Δ*, aucun marquage vacuolaire n'apparaît et le nombre de peroxyosomes cytoplasmiques reste stable. Dans *irs4Δtax4Δ*, le marquage vacuolaire ne devient visible qu'après 3 heures et environ 6 peroxyosomes cytoplasmiques sont visibles dans chaque cellule au temps 90 minutes (fig. 62.B et NP).

Une autre méthode pour quantifier la pexophagie est le suivi de la dégradation de Fox3p (3-ketoacyl-CoA thiolase) en western blot par un anticorps anti-Fox3p. A partir de ces mêmes cellules, nous avons donc préparé des extraits protéiques. Dans les cellules *WT* et *inp51Δ*, Fox3p est totalement dégradée en 420' alors que la protéine est stable dans *atg1Δ*. Dans les cellules doubles mutantes *irs4Δtax4Δ*, le niveau diminue mais moins vite que dans le *WT* (fig. 62.C). Donc, les deux essais suggèrent que la dégradation autophagique des peroxysomes est également affectée en l'absence de Irs4p et Tax4p, à un niveau comparable à ce que nous avons observé pour l'autophagie non sélective. Comme pour l'autophagie, le défaut de pexophagie observé dans *irs4Δtax4Δ* semble indépendant de Inp51p car la souche délétée présente un phénotype sauvage.

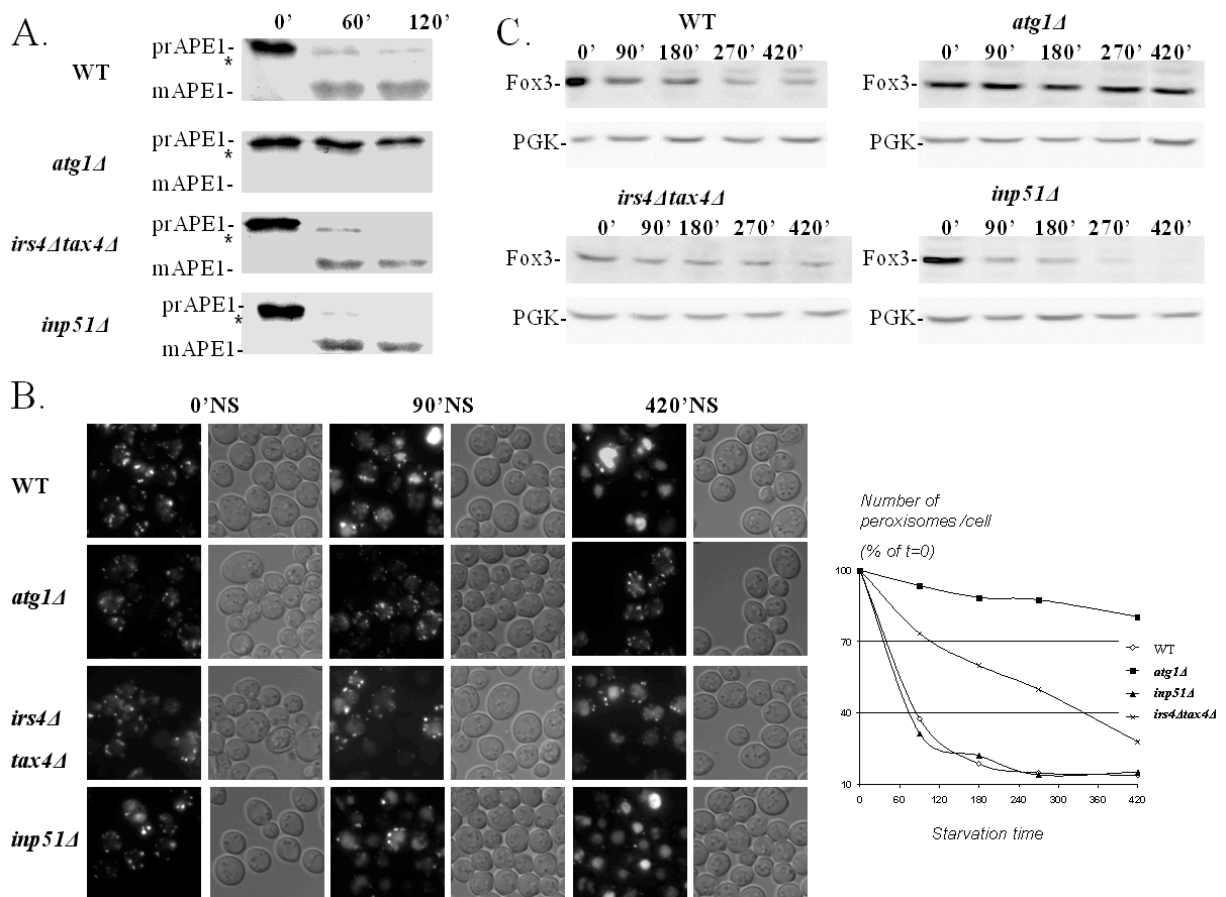


Figure 62 : Irs4p et Tax4p sont nécessaires pour une pexophagie efficace mais pas pour la voie CVT

A. Des cellules en phase exponentielle de croissance *WT*, *atg1Δ* et *irs4Δtax4Δ* ont été utilisées pour réaliser une analyse de la maturation de Ape1p en pulse-chase (voir matériel et méthodes) après 0, 1 et 2 heures de chasse. Le gel autoradiographique est présenté. * : bande aspécifique, prApe1 (61KDa), mApe1 (50KDa). *B.* Des cellules en phase exponentielle de croissance *WT*, *atg1Δ*, *inp51Δ* et *irs4Δtax4Δ* transformées avec RFP-SKL ont été cultivées dans les conditions induisant la prolifération des peroxysomes (voir matériel et méthodes). Les cellules ont alors été transférées en SD-N. la dégradation des peroxysomes a été suivie au microscope à fluorescence aux temps 0 h, 1h30, 3h, 4h30 et 7h. Le nombre de peroxysomes restant a été calculé sur 25 cellules de chaque type à chaque temps. Le résultat est exprimé en pourcentage du nombre de peroxysomes à t=0. *C.* Des extraits protéiques ont été préparés à partir des cellules décrites en B au temps indiqués. La dégradation de Fox3p a été suivie en western blot avec un anticorps anti-Fox3p. La protéine PGK1 est utilisée comme témoin de charge.

L'ensemble de ces résultats montre un défaut d'autophagie et de pexophagie dans le mutant *irs4Δtax4Δ*. Cependant, les défauts dans la souche *irs4Δtax4Δ* sont moins sévères que ceux qui sont décrits pour les mutants d'autophagie classiques. Pour essayer de savoir si Irs4p et Tax4p ont une fonction dans l'autophagie ou si leur impact est indirect, nous avons étudié davantage leur localisation et leurs interactions potentielles avec les protéines de la machinerie d'autophagie.

Irs4p et Tax4p se localisent au PAS et interagissent avec Atg11p

Notre premier objectif a donc été de savoir si les structures marquées par Irs4p et Tax4p pouvaient correspondre à la structure pré-autophagosomale (PAS) où la majorité des Atg sont envoyées au moins temporairement et où les vésicules d'autophagie seraient formées (Suzuki et al. 2001). Atg9-GFP est un marqueur du PAS en carence. Des cellules *WT* ont été co-transformées avec Atg9-GFP et mCherry-Tax4p. La localisation des protéines a été observée en phase exponentielle et après trois heures en présence de rapamycine pour induire l'autophagie. Une colocalisation très partielle a été observée en phase exponentielle (NP), mais la colocalisation semble accrue après induction de l'autophagie (fig. 63.A). Donc, Irs4p et Tax4p localisent partiellement au PAS.

En parallèle, nous avons étudié la présence de tripeptides NPF dans les séquences des protéines Atg. Seules Atg20p/ Snx42p et Atg11p contiennent un motif NPF. Atg11p est un acteur de la voie CVT et de la pexophagie (Kim et al. 2001; Reggiori and Klionsky 2005). Cette protéine adaptatrice permet la localisation de plusieurs Atg au PAS (voir chapitre IV.B.2. de l'introduction) (Yorimitsu and Klionsky 2005), Irs4p et Tax4p peuvent-elles être ajoutées à cette liste ?

Après construction des souches nécessaires, nous avons étudié cette interaction en double hybride, comme décrit dans la section matériels et méthodes. Les résultats sont résumés en fig. 63.B., Atg19p (contrôle positif), Irs4p ou Tax4p sont capables d'interagir avec Atg11p. Cette interaction est réduite quand Atg11p est délétée de son domaine Cter contenant le NPF. Irs4p et Tax4p interagiraient donc avec Atg11p, l'interaction se fait probablement entre le domaine NPF et le domaine EH.

Nous avons également étudié cette interaction *in vivo* par des expériences de GST pull-down avec GST-Irs4p et Atg11-Myc ou Atg11ΔCter-Myc (fig. 63.C). Le détail du protocole est donné dans les matériels et méthodes. Des cellules sur-exprimant GST-Irs4p sous contrôle d'un promoteur GAL sont utilisées car l'anticorps anti-GST ne permet pas de détecter la forme endogène, au contraire de Atg11-Myc dont l'expression à niveau endogène est suffisante. Il est important de préciser qu'Irs4p et Tax4p sont très sensibles à la protéolyse et sont majoritairement dégradées pendant l'expérience (NP).

GST-Irs4p est capable d'entraîner Atg11-Myc alors la GST seule ne le peut pas (lignes 1 et 2). L'interaction est majoritairement perdue quand le domaine Cter de Atg11p est absent (lignes 2 et 3). Cette expérience confirme l'interaction entre Atg11p et Irs4p *in vivo* et l'importance du domaine NPF pour cette interaction. Cependant, nous avons trouvé que les phénotypes d'une souche Atg11ΔCter

(contenant le motif NPF) en termes de survie en présence de rapamycine étaient différents de ceux de la souche *irs4Δtax4Δ* (NP).

Les résultats de cette dernière partie suggèrent un rôle direct de Irs4p et Tax4p dans l'autophagie puisqu'elles se localisent partiellement au PAS et semblent interagir avec Atg11p.

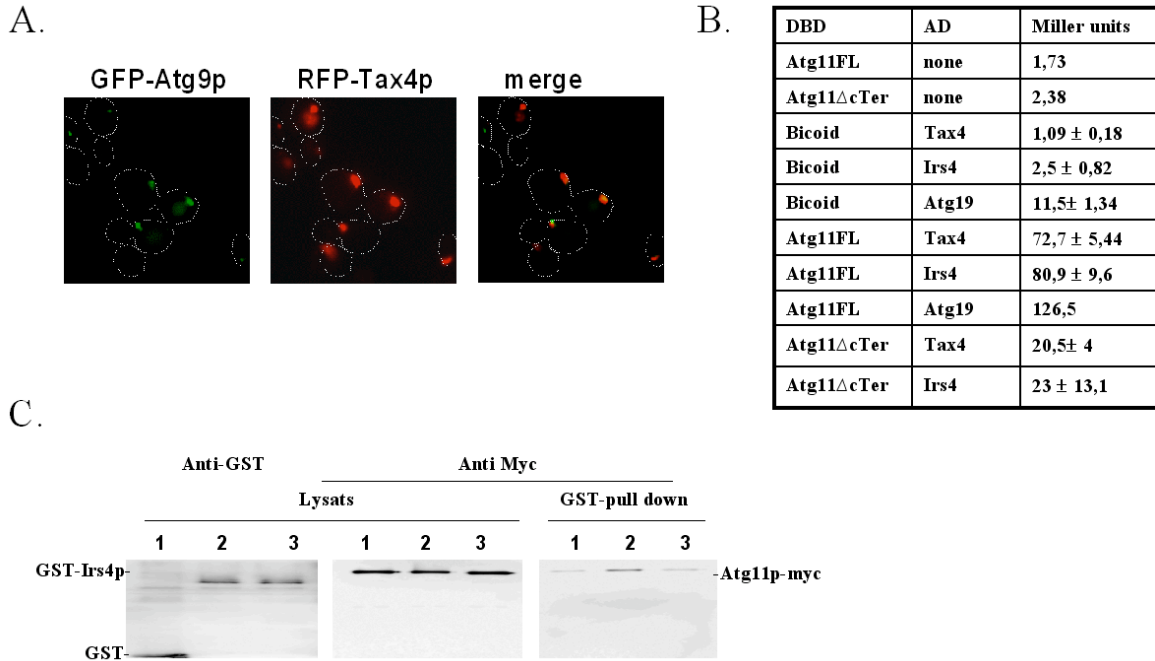


Figure 63 : Irs4p et Tax4p localisent partiellement au PAS et interagissent avec Atg11p

A. Des cellules WT co-transformées avec GFP-Atg9p et Tomato-Tax4p et des cellules *vps30Δ* transformées avec ApeI-RFP et GFP-Irs4p ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance et traitées à la rapamycine pendant trois heures puis la localisation des protéines a été étudiée au microscope. *B.* L'interaction entre Atg11p ou Atg11ΔCter et Irs4p ou Tax4p a été analysée en double hybride comme décrit dans les matériels et méthodes. Les résultats de l'activité beta-gal sont exprimés en unités Miller. Atg19 et Bicoid sont utilisés respectivement en contrôles positifs et négatifs. DBD : LexA DNA-binding domain, AD : activation domain. *C.* Des cellules Atg11-Myc transformées avec GAL-GST (1), des cellules Atg11-Myc, GAL-GST-Irs4p (2) et des cellules Atg11ΔCter-Myc, GAL-GST-Irs4p (3) ont été cultivées en S Raf jusqu'en phase exponentielle. Du galactose (2% final) a été ajouté. Après 90 minutes d'incubation, 60 unités DO₆₀₀ ont été utilisées pour réaliser un GST-pull-down in vivo comme décrit dans les matériel and méthodes. Après SDS PAGE, l'immunodétection a été effectuée avec un anti-corps anti-GST pour contrôler la présence de GST-Irs4p ou de GST et avec un anti-Myc pour visualiser Atg11-Myc ou Atg11ΔCter-Myc.

II.C.2. Propriétés inattendues de Irs4p et Tax4p

Afin de localiser des formes d'Irs4p et Tax4p étiquetées à la GFP, nous avons été amenés à surexprimer les protéines. De façon surprenante, on observe sur les images en microscopie à fluorescence de longues structures fibrillaires ordonnées. L'abondance et la taille de ces structures est proportionnelle au taux de surexpression de ces protéines (fig. 65 A). Par ailleurs, la taille de ces structures augmente lorsque les cellules approchent de la phase stationnaire de croissance. L'expression de RFP-Tax4p et de GFP-Irs4p dans les mêmes cellules nous a permis de montrer que les deux protéines pouvaient être recrutées dans les mêmes tubules (fig. 65 B). La présence du domaine EH et du coiled-coil final n'est pas nécessaire à la formation de ces structures, le large domaine non structuré en Nterminal semble être l'élément déterminant (NP).

Afin de comprendre les paramètres nécessaires à la formation de ces tubules, nous avons étudié l'impact de différentes modifications cellulaires sur leur formation. Aucune modification visible de ces tubules n'a été observée dans les mutants de trafic au niveau l'appareil de Golgien (*sec7ts*), entre endosome précoce et tardif (*pep12Δ*), de formation du MVB (*vps37Δ*) (NP). Leur maintien n'est pas altéré par des drogues détruisant les microtubules (nocodazole) ou le cytosquelette d'actine (latrunculine A) (NP). De plus, nous avons visualisé la formation des tubules dans les mutants d'autophagie (fig. 64). Celle-ci semble normale dans tous les mutants sauf dans les cellules *atg11Δ* où l'on observe de larges structures ponctuées. Il faut rappeler ici que nous avons montré qu'Irs4p et Tax4p interagissaient avec Atg11p. Cette interaction semble donc importante pour la formation des tubules pour une raison que nous ignorons.

Récemment, il a été montré que les protéines prions de *Podospora anserina* Het-s et de levure Sup35p (facteur de terminaison de la transcription) formaient de tels tubules qui sont des agrégats hautement ordonnés lorsqu'elles sont surexprimées (Balguerie et al. 2004; Ganusova et al. 2006) (fig. 65 E). L'étude des prions et agrégats protéiques représente un véritable enjeu de société. En effet, diverses maladies neurodégénératives, comme Alzheimer et Huntington, sont associées à des problèmes d'agrégation de protéines. Au sein de ce groupe, les encéphalopathies sont dues à une classe particulière d'agrégats dits prions. La forme agrégée prion (PrPSc) de la protéine est une structure alternative stable qui peut se reproduire par un mécanisme auto catalytique et devient l'agent infectieux de la maladie. Les prions sont très largement répandus dans le monde vivant. Ainsi, il en existe également chez la levure *S. cerevisiae* ([*PSI*⁺] forme prion de Sup35p ; [*URE3*] forme prion de Ure2p ; et [*PIN*⁺] forme prion de Rnq1p) et le champignon filamenteux *Podospora anserina* (HET-s). Les études sur ces organismes ont permis de mieux comprendre les facteurs cellulaires impliqués dans la formation des structures prions, leur réplication et leur transmission de cellules à cellules selon un mode non-mendélien lors du croisement. Les protéines prions de levure sont des protéines riches en glutamines et asparagines (« QN riches »).

Irs4p et Tax4p ne sont pas « QN riches ». Nous avons testé si les tubules formés par Sup35p co-localisaient avec ceux formés par Tax4p (fig 65 D) mais ce n'est pas le cas. Cependant, comme pour Sup35p, les tubules formés par Irs4p et Tax4p ont une taille et une fréquence qui augmentent à l'arrivée en phase stationnaire et proportionnellement à leur niveau d'expression (fig. 65 C). Compte tenu de ces ressemblances, il est donc tentant de penser qu'Irs4p et Tax4p pourraient être une nouvelle classe de prions. N'ayant pas les compétences nécessaires pour étudier cette hypothèse, nous avons choisi de collaborer avec des spécialistes de ce domaine afin de répondre à cette question. Le travail est en cours.

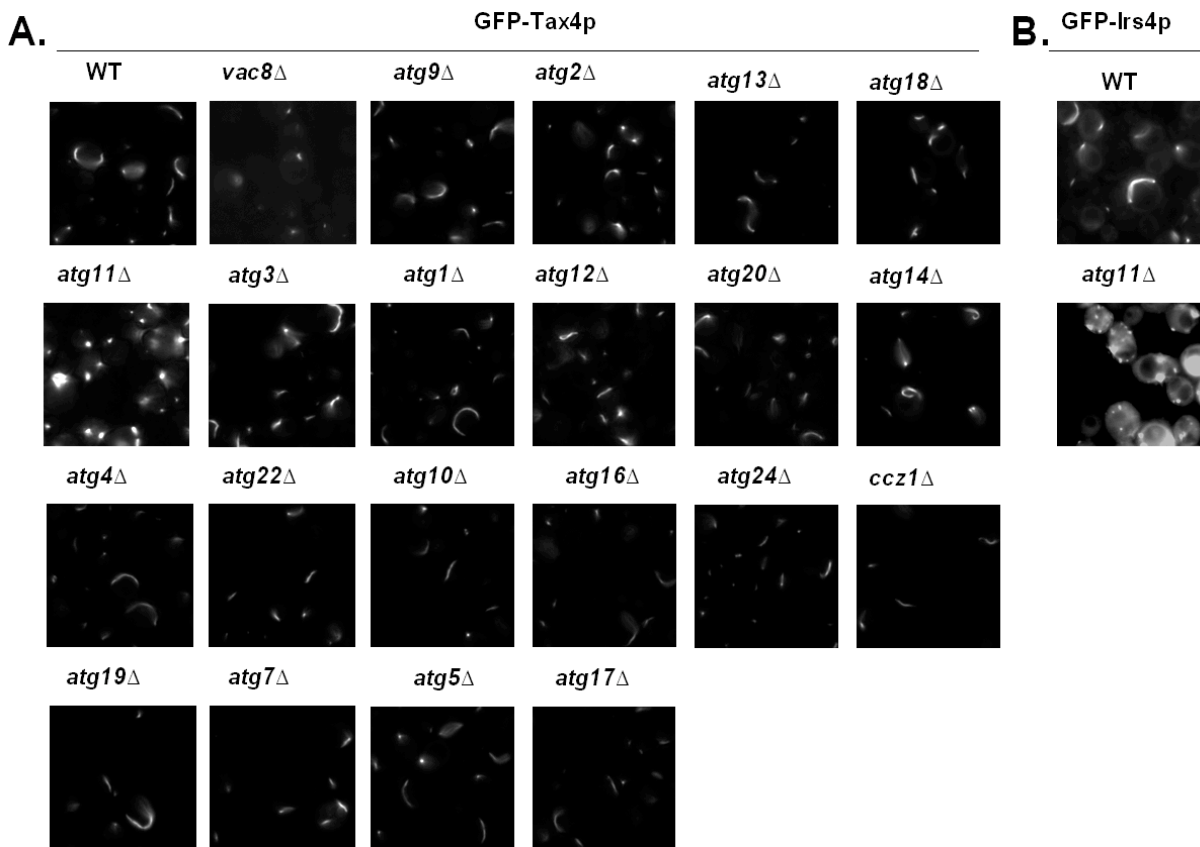


Figure 64 : Tubules formés par GFP-Irs4p et GFP-Tax4p dans les mutants d'autophagie.

A. Des cellules WT, atg11Δ, atg4Δ, atg19Δ, vac8Δ, atg3Δ, atg22Δ, atg7Δ, atg9Δ, atg1Δ, atg10Δ, atg5Δ, atg2Δ, atg12Δ, atg16Δ, atg17Δ, atg13Δ, atg20Δ, atg24Δ, atg18Δ, atg14Δ, ccz1Δ transformées avec GPD-Tax4-GFP ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance en milieu minimum. La localisation de Tax4p a été visualisée au microscope à épifluorescence. B. Des cellules WT et atg11Δ transformées avec GPD-GFP-Irs4p ont été traitées comme en A..

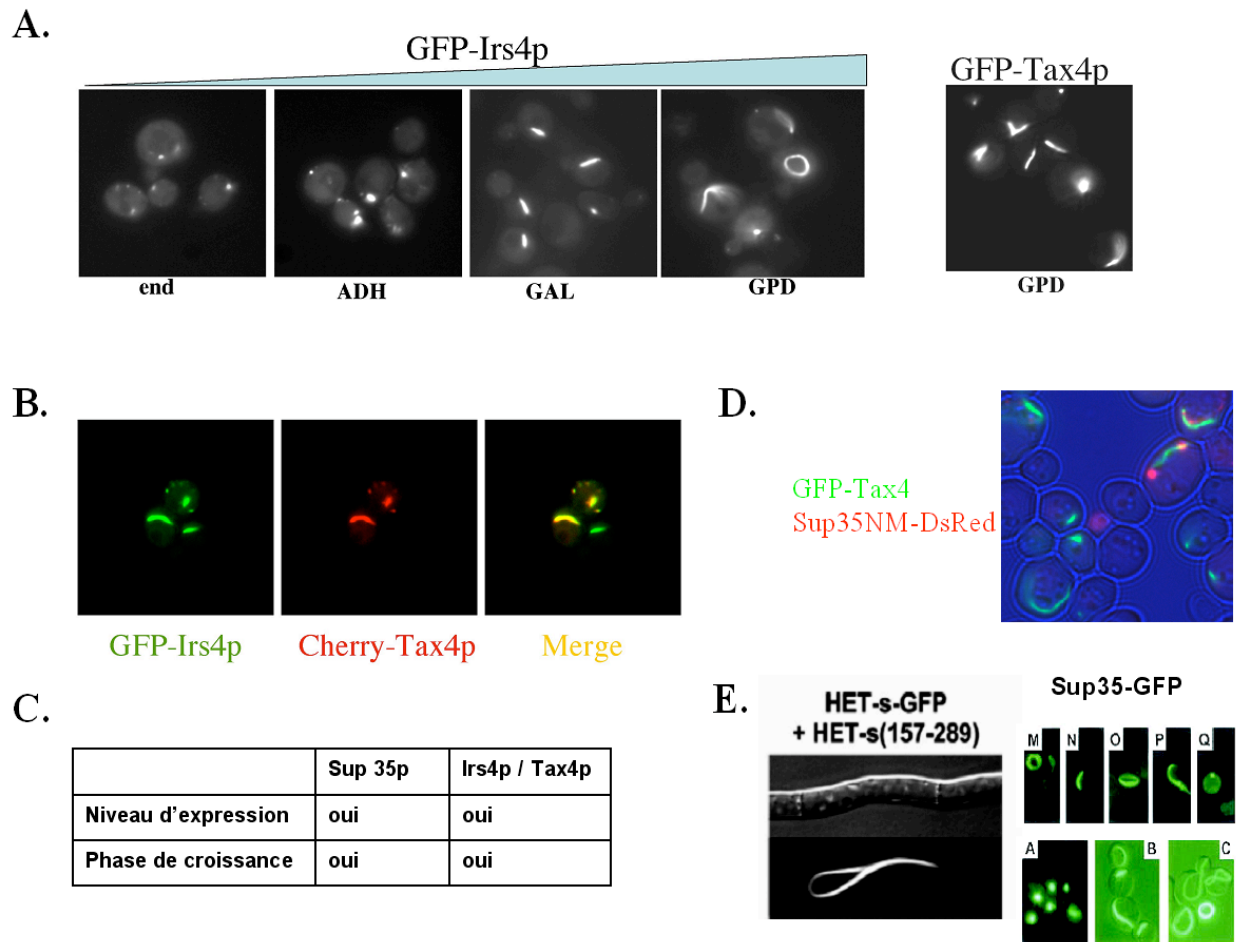


Figure 65 : Caractéristiques des tubules formés par Irs4p et Tax4p et comparaison avec Sup35p.

A. Des cellules WT transformées avec GFP-Irs4p sous contrôle de son promoteur endogène (end) du promoteur ADH, GAL (2 heures d'induction) et GPD ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance en milieu minimum puis observées au microscope à épifluorescence. *B.* Des cellules WT transformées avec GPD-GFP-Irs4p et GAL-Cherry-Tax4p ont été cultivées en présence de raffinose jusqu'en phase exponentielle de croissance puis du galactose a été ajouté. Les images ont été prises 120 minutes plus tard. *C.* conditions favorisant l'apparition de tubules de Sup35p et Irs4p et Tax4p : phase stationnaire et haut niveau d'expression. *D.* Des cellules WT transformées avec GFP-Tax4p et Sup35NM-DsRed ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance en milieu minimum puis observées au microscope à épifluorescence. *E.* Tubules formées par Het-s-GFP chez *Podospora anserina* (adapté de (Balguerie et al. 2004)) et Sup35-GFP chez *S.cerevisiae* (adapté de (Zhou et al. 2001)).

II.D. Discussion

Au cours de notre travail sur le recyclage, nous avons montré que les deux protéines portant un domaine EH en C terminal chez la levure : Irs4p et Tax4p n'intervenaient pas dans l'endocytose ou le recyclage de Fur4p (fig.47). Nous avons également démontré que l'endocytose et le recyclage d'autres cargos n'étaient pas compromis par l'absence de ces deux protéines (fig.55), les différenciant des autres protéines à domaine EH de levure et des eucaryotes supérieurs. Notre but a alors été d'identifier la fonction de Irs4p et Tax4p. Nous avons montré qu'Irs4p et Tax4p se localisaient dans des structures ponctuées intracellulaires qui diffèrent clairement de la localisation des autres protéines EH situées au niveau des patches d'actine à la membrane plasmique (fig.56). En nous basant sur des conditions induisant la phosphorylation de Irs4p (fig.58), nous avons étudié l'autophagie de manière détaillée. Nos résultats démontrent que la survie cellulaire en carence est sévèrement affectée par l'absence de Irs4p et Tax4p. Nous avons aussi trouvé que les capacités d'autophagie et de pexophagie sont retardées de manière transitoire dans les cellules *irs4Δtax4Δ* (fig. 60, 61 et 62). Au contraire, l'import de Ape1p vers la vacuole *via* la voie CVT n'est pas modifiée dans la souche *irs4Δtax4Δ* (fig. 62). De plus, Irs4p et Tax4p sont partiellement localisées au PAS (fig. 63). Enfin, nous montrons qu'Irs4p et Tax4p interagissent avec Atg11p *via* son motif NPF (fig. 63).

ORF IRS4

Le gène *IRS4* (Increased Ribosomal DNA Silencing gene 4) a été tout d'abord identifié au cours d'un crible génétique de recherche de mutants ayant des défauts de « silencing » de l'ADN ribosomal (Smith et al. 1999). Aucune étude n'a été conduite afin de confirmer cette fonction potentielle.

Il a été proposé que Irs4p serait un composant cellulaire de la mitochondrie lors de deux études protéomiques (Reinders et al. 2006). Notre travail ne confirme pas une telle localisation. Tout d'abord, des versions de Irs4p étiquetée à la GFP ou HA se localisent dans une à quelques structures ponctuées cytoplasmiques qui sont clairement différentes du réseau mitochondrial (fig. 56 et NP). Par ailleurs, aucune co-localisation avec du mitotraker (marqueur des mitochondries) n'a été observée (NP). En parallèle, nous montrons que Tax4p, pour laquelle aucune localisation n'avait été proposée, co-localise avec Irs4p (fig. 56).

Au cours de ce travail, nous avons remarqué que le gène codant pour Irs4p est sur le chromosome XI à proximité du promoteur de *VPS51* sur le brin opposé (fig.55 B). Il est à noter que le défaut de recyclage de Snc1p observé dans la souche *irs4Δtax4Δ* (yJMG982) est la conséquence de l'absence d'expression de Vps51p (fig.55 A). En effet, un recyclage normal de Snc1p est restauré par l'expression de Vps51p dans la souche yJMG1012 qui a donc été utilisée dans toutes les autres expériences. Il convient de préciser que Vps51p est ici exprimée sous contrôle du promoteur *ADHI*,

nous ne savons pas si ce niveau d'expression correspond au niveau endogène ; néanmoins ce niveau est suffisant pour rétablir un recyclage normal de Snc1p.

Nous pensons que certaines des annotations sur Irs4p dans la base de données SGD (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/locus.pl?locus=irs4>) résultent de l'absence d'expression de Vps51p et non de celle de Irs4p. Par exemple, il a été proposé que *IRS4* serait synthétique létal avec *YPT6*, *GET1* et *GET2*. Or, *VPS51* est également synthétique létal avec les trois.

Protéines à domaine EH de levure

Etant donnée la structure de Irs4p et Tax4p ayant un seul domaine EH en C terminal comme les protéines EHD, nous avons tout d'abord testé l'hypothèse selon laquelle Irs4p et Tax4p pourraient agir dans le recyclage. Néanmoins, il semble que ni Tax4p ni Irs4p ne soient nécessaires au recyclage de Fur4p et Snc1p (fig. 47 et 55 A).

Comme les trois autres protéines de levure à domaine EH sont requises pour l'étape d'internalisation de l'endocytose, nous avons étudié cette voie de trafic dans des cellules délétées pour *IRS4* et *TAX4* mais n'avons trouvé aucun défaut d'endocytose (fig. 55 C). Ce résultat est en accord avec les localisations différentes de Irs4p et Tax4p (structures intracellulaires, fig. 56) par rapport à Pan1p, End3p et Ede1p (associées au cytosquelette d'actine cortical (Tang et al. 1997), (Gagny et al. 2000)). Ainsi, nos expériences indiquent clairement que la fonction et la localisation des protéines à domaine EH en C terminal de levure divergent de celles des trois protéines de levure présentant de multiples domaines EH en N terminal mais également de celle des protéines à domaine EH, en N ou C terminal, de mammifères.

Irs4p/Tax4p versus Inp51p

Tax4p et Irs4p sont connues pour lier et activer la PI(4,5)P₂ 5-phosphatase Inp51p (synaptojanine) et régule donc négativement le niveau de PI(4,5)P₂ (Morales-Johansson et al. 2004). La souche délétée pour *INP51* est une phénocopie de celle délétée pour *IRS4* et *TAX4* en termes de niveau de PI(4,5)P₂.

Dans la levure, les PI(3)P sont régulés par la PI(3)P phosphatase Ymr1p et les synaptojanines/phosphatases Inp52p/ Sjl2p et Inp53p/ Sjl3p. De manière intéressante, la maturation de Ape1p *via* la voie CVT, mais pas *via* l'autophagie, est sévèrement affectée dans la souche *ymr1Δsjl3Δ* car Atg24p n'est plus localisée au PAS (Parrish et al. 2004). Comme Inp52p et Inp53p contiennent également un domaine PI(4,5)P₂ 5-phosphatase comme Inp51p, on peut se demander si Inp51p pourrait aussi être impliquée dans la voie CVT. Nous avons montré que la maturation de Ape1p est normale dans les cellules *inp51Δ* (fig. 62 A), au contraire de ce qui a été montré dans la souche *ymr1Δsjl3Δ*.

Notre étude de l'autophagie montre des différences importantes de phénotypes entre le mutant *inp51Δ* et *irs4Δtax4Δ*. En effet, la survie cellulaire, l'autophagie et la pexophagie ne semblent pas affectées

par l'absence de Inp51p ; au contraire de ce que nous trouvons pour Irs4p et Tax4p. Ceci indique que Irs4p et Tax4p ont plusieurs fonctions dans la cellule. La première est de réguler la conversion du PI(4,5)P2 et passe par l'intervention de Inp51p. La 2nde, à laquelle nous nous sommes davantage intéressés ici, est liée à l'autophagie et semble indépendante de Inp51p.

Phosphorylation de Irs4p

Nous avons démontré que Irs4p est phosphorylée et que son niveau de phosphorylation est augmenté quand l'autophagie est induite (fig. 58). Atg1p est une kinase à sérine/thréonine importante pour toutes les voies d'autophagie décrites (Matsuura et al. 1997). Les substrats de Atg1p sont inconnus. Nous avons observé que le profil de phosphorylation de Irs4-Myc n'était pas affecté dans un mutant *atg1Δ* (NP). Donc, Atg1p n'est probablement pas la kinase impliquée dans cette modification. Aucun autre candidat n'est présent dans la machinerie d'autophagie. Nous n'avons pas vérifié le niveau de phosphorylation de Irs4p dans la collection des mutants de levures déficients chacun pour une des 122 kinases connues ou prédites, mais cette approche systématique permettrait sûrement de répondre à cette question. Parmi les kinases, plusieurs sont régulées par la présence des nutriments : PKA, Snf1p, TOR, Gcn2p, Pho85p et sont donc des candidates privilégiées. Il serait également intéressant d'étudier la phosphorylation de Irs4p dans les mutants d'autophagie afin de savoir si celle-ci pourrait être régulée indirectement par la machinerie d'autophagie.

Irs4p et Tax4p : deux protéines redondantes importantes pour une autophagie et une pexophagie efficace

Nous montrons que ni le mutant *irs4Δ* ni le mutant *tax4Δ* ne sont sensibles à la carence, les deux gènes doivent être délétés pour obtenir une sensibilité à la carence (fig. 59). Cette redondance explique certainement pourquoi Irs4p et Tax4p n'ont pas été identifiées précédemment lors des cribles génétiques généraux.. M.Hall et ses collègues ont montré que les deux protéines étaient également redondantes pour la régulation de Inp51p (Morales-Johansson et al. 2004).

Cette redondance peut s'expliquer par le fait que les deux gènes sont paralogues, issus d'une duplication du génome (bloc 41 sur les chromosomes X et XI ; (Seoighe and Wolfe 1999)). Pour cette raison, nous avons conduit toutes nos expériences dans une souche double mutante *irs4Δtax4Δ*.

Nous avons trouvé que Irs4p et Tax4p étaient importantes pour une autophagie et une pexophagie efficaces (fig. 60, 61 et 62). Cependant, les phénotypes observés dans la souche mutante *irs4Δtax4Δ* sont moins sévèrement affectés que dans les mutants *atg* classiquement décrits puisqu'il s'agit d'un retard transitoire et non d'un blocage total. Certains mutants *atg* présentent également une voie d'autophagie partiellement fonctionnelle : *atg11Δ*, *atg17Δ*, *vac8Δ*...

Plusieurs classification des Atg en différents groupes basés sur la sévérité des défauts ou l'étape d'intervention dans le processus autophagique ont été proposées (Abeliovich et al. 2000; Suzuki et al. 2001). Abeliovich et al ont proposé que les Atg pourraient être divisés en deux groupes : un premier groupe serait important pour la nucléation de la vésicule et un second serait impliqué dans la phase d'expansion de l'autophagosome, deux étapes supposées indépendantes. De manière intéressante, les mutants de nucléation, comme *atg1Δ*, ont une sensibilité très grande à la carence (viabilité de 2 jours) ((Abeliovich et al. 2000), fig. 59 B) car il ne forment aucun autophagosome. Les mutants d'élongation, *atg8Δ* ou *atg4Δ*, forment des autophagosomes anormalement petits et ont par conséquent une sensibilité intermédiaire à la carence, plus faible que celle des mutants de nucléation mais supérieure à celle des mutants *cvt* ou celle des cellules sauvages (Abeliovich et al. 2000). La demie-vie des cellules *irs4Δtax4Δ* est similaire à celles des mutants d'expansion (fig. 59 B). Cependant, d'après nos données en microscopie électronique, il semble que moins d'autophagosomes seraient formés tôt après la carence dans *irs4Δtax4Δ* mais ceux-ci semblent avoir une taille normale. Ce résultat n'est donc pas en accord avec une classification simple du mutant *irs4Δtax4Δ* dans le groupe des mutants d'élongation.

Quantification des défauts partiels ou transitoires d'autophagie

En nous basant sur nos études cinétiques (Pho8Δ60, microscopie électronique, pexophagie), nous proposons que dans une souche sauvage, l'autophagie serait un processus bi-phasique; avec une phase initiale linéaire, suivie d'une phase de saturation afin que la cellule ne digère pas littéralement tout son contenu cytoplasmique, ce qui serait dommageable pour la cellule. La phase initiale est rapide dans une souche *WT* mais ralentie par la délétion de *IRS4* et *TAX4*. Après plusieurs heures, la même limite est atteinte dans les deux souches.

Dans la plupart des études, le dosage de l'activité Pho8Δ60p et la microscopie électronique sont effectués après des carences longues et ne permettent donc pas de mettre en évidence des défauts transitoires.

Par microscopie électronique, nous montrons que moins de vésicules d'autophagie sont formées dans la souche *irs4Δtax4Δ* par rapport au *WT* juste après la carence (fig. 61). Cette observation nous permet d'expliquer les autres défauts observés. En effet, si moins de vésicules d'autophagie sont formées, moins d'Atg8p est associée aux membranes et dégradée et moins de Pho8Δ60p est transportée à la vacuole par l'autophagie non sélective. Même si la pexophagie est supposée être un processus sélectif, nous pensons que la méthode utilisée pour l'induire chez la levure *S. cerevisiae* (*i.e.* NS) induit principalement l'autophagie non sélective. Dans d'autres levures, un changement de milieu est préconisé afin d'induire la pexophagie (passage d'oléate à glucose ou de méthanol à éthanol) et il a été montré qu'en fonction du milieu, la macropexophagie ou la micropexophagie est induite (Sakai et al. 2006). Chez *S.cerevisiae*, le type de pexophagie (*i.e.* macro ou micro) induit par la carence est

inconnu. Nous pensons que les conditions utilisées chez les autres levures permettent une induction plus sélective de la pexophagie. Ce défaut de pexophagie observé dans *irs4Δtax4Δ*, qui est d'une ampleur très comparable à celui observé pour l'autophagie non sélective, nous semble par conséquent attendu, puisque nous avons montré qu'en NS moins d'autophagosomes sont formés (fig. 61 et 62). Afin de confirmer cette hypothèse, nous pourrions observer les vésicules de pexophagie formées dans ces conditions en microscopie électronique afin de voir si elles ont également un contenu cytoplasmique ou si elles contiennent uniquement des peroxysomes.

Nous avons observé que Fox3p ainsi que certaines autres protéines semblaient plus faiblement exprimées dans la souche *irs4Δtax4Δ* par rapport au *WT*. Nous n'en connaissons pas la raison, mais une observation similaire a été faite dans le mutant *atg22Δ* présentant également des retards de pexophagie et d'autophagie non sélective (V. Todde, communication personnelle). Il serait intéressant de vérifier si la biogenèse des peroxysomes est normale dans les cellules *irs4Δtax4Δ*.

Nous n'avons trouvé aucun défaut de maturation de ApeIp dans *irs4Δtax4Δ* en milieu riche (voie CVT) mais également en NS (fig. 62 A et NP). Pourtant, ApeIp est supposée devenir un cargo de la voie d'autophagie en NS. Ce résultat semble donc en contradiction avec ceux obtenus avec d'autres cargos de la voie d'autophagie (Pho8Δ60p, Atg8p). Cette contradiction apparente peut s'expliquer par le fait que même en condition de carence, ApeI requiert un récepteur spécifique. Pour cette raison, nous le considérons comme un cargo non classique de l'autophagie. Cheong et al ont aussi abouti à cette même conclusion (Cheong et al. 2005). Leurs expériences mettent en évidence que prApeIp n'est pas le cargo adéquat pour tester l'efficacité de l'autophagie. En effet, plusieurs mutants partiellement déficients pour l'autophagie ne présentent pas de défaut de maturation ApeIp en NS. Par exemple, le mutant *atg17Δ* a un défaut important d'autophagie non sélective (activité Pho8Δ60p réduite et transport de Atg8p retardé) et de pexophagie (retard de dégradation de Fox3p). Les analyses en microscopie électronique montrent que moins d'autophagosomes sont formés et qu'ils sont d'une taille apparemment trop petite pour séquestrer des peroxysomes. Pourtant, la maturation de ApeIp en carence est normale dans les cellules *atg17Δ*. Une même contradiction a été mise en évidence pour *vac8Δ*. Nous pensons qu'il faut moins de membrane pour séquestrer ApeIp et que la présence d'un récepteur pourrait contribuer à une séquestration préférentielle. En carence, la voie d'autophagie s'ajoute à la voie CVT et ApeIp est transportée simultanément par les deux types de vésicules.

En conclusion, nous pensons que le cargo ApeIp ne convient pas pour étudier l'autophagie, particulièrement dans le cas des mutants présentant des blocages partiels alors que les analyses cinétiques avec Atg8p, Pho8Δ60 ou en microscopie électronique sont plus adaptées.

Irs4p et Tax4p sont localisées au PAS et dans d'autres structures cellulaires

Notre étude de la localisation de Irs4p et Tax4p montre qu'elles se localisent très probablement au sein de plusieurs structures différentes. Il convient également de faire ici attention au niveau de sur-expression qui semble modifier au moins partiellement les localisations, possiblement suite aux propriétés agrégatives. Cependant, les protéines endogènes sont trop faiblement exprimées pour en déterminer la localisation.

Nous avons trouvé des co-localisations partielles de Irs4p et Tax4p avec des marqueurs des endosomes tardifs, co-localisation qui semble plus forte quand ce compartiment devient non fonctionnel (compartiment classe E). Tax4p semble également capable d'entrer dans le noyau. Nous n'avons pas trouvé de signal de localisation nucléaire (NLS) dans sa séquence. Une autre protéine à domaine EH, Eps15R transite également entre noyau et cytoplasme chez les mammifères (Poupon et al. 2002). Son rôle dans le noyau n'est pas compris.

Enfin, nous montrons que les deux protéines peuvent être re-dirigées en partie vers le PAS en conditions où l'autophagie est induite (fig. 63 A). Ce résultat suggère une implication directe des deux protéines à domaine EH dans l'autophagie. Compte tenu de l'interaction de Irs4p et Tax4p avec Atg11p, nous avons regardé leur localisation dans des cellules *atg11Δ*. Nous avons observé que les structures tubulaires formées en sur-exprimant Irs4p et Tax4p étaient modifiées dans le mutants *atg11Δ*.

La plupart des Atg se localisent au PAS au moins dans certaines conditions. Cependant, pour certaines Atg une localisation différente a été décrite. Par exemple, Atg9p et Atg27p se localisent aussi à la mitochondrie (Reggiori et al. 2005b; Yen et al. 2007). De plus, Atg27p est trouvée à l'appareil de Golgi (Yen et al. 2007). Atg18p et Vps30p/Atg6p localisent à la membrane vacuolaire. Atg18p, Atg21p, et Ygr223c sont localisées dans des structures ponctuées accolées à la membrane vacuolaire (Stromhaug et al. 2004) correspondant partiellement à la jonction nucléo-vacuolaire (Meiling-Wesse et al. 2004) et peut-être à une sous-population endosomale.

Atg11p

Nous montrons une interaction entre Atg11p et Irs4p / Tax4p par double hybride, dépendante des résidus NPF en C terminal de Atg11p et probablement du domaine EH (fig. 63 B). Irs4p interagit *in vivo* avec Atg11p mais beaucoup moins avec Atg11p délétée de son domaine NPF (fig. 63 C). L'étude de cette interaction *in vivo* a été rendue relativement difficile par le fait que Irs4p est très sensible à la dégradation protéasique, la forme modifiée par phosphorylation est largement perdue dès la lyse. Or, cette phosphorylation pourrait réguler l'interaction avec Atg11p. De plus, l'élimination des débris cellulaires par centrifugation conduit également à une perte importante de Irs4p et Tax4p, conséquence possible de leurs propriétés agrégatives.

Nous savons donc que Irs4p et Tax4p interagissent avec Atg11p, mais nous n'avons pas pu mettre en évidence la signification de cette interaction.

Atg11p fait partie d'un complexe protéique incluant Atg1p, Atg13p, Apt17p, Atg20p et Vac8p. Notre travail met en évidence deux nouveaux composants du complexe : Irs4p et Tax4p. Alors que Atg11p a une fonction spécifique dans la voie CVT, les autres protéines du complexe ont des effets différents sur les voies CVT, de pexophagie et d'autophagie suggérant que la composition du complexe pourrait réguler la conversion entre les voies (Kim et al. 2001). A l'intérieur du complexe, Atg17p est la seule protéine intervenant dans l'autophagie non sélective mais pas dans la voie CVT, comme Irs4p et Tax4p.

Klionsky et son équipe ont récemment démontré que le cytosquelette d'actine est important pour le transport de Atg11p au PAS (He et al. 2006). L'étude de la localisation de Cherry-Atg11p dans des cellules *irs4Δtax4Δ* est en cours, les premiers résultats suggèrent que Atg11p localisent au PAS même en l'absence de Irs4p et Tax4p.

Les transports de Atg8p, Atg20p, Atg1p et du complexe formé par prApeIp et son récepteur Atg19p au PAS sont dépendants de Atg11p.

La fonction de Irs4p et Tax4p ne dépend probablement pas uniquement de Atg11p. En effet, tout d'abord, les phénotypes de *atg11Δ* et de *irs4Δtax4Δ* ne sont pas similaires : les cellules *atg11Δ* ont un défaut dans la voie CVT alors que les cellules *irs4Δtax4Δ* sont affectées dans la pexophagie et l'autophagie. De plus, nous avons comparé les phénotypes d'une souche *atg11Δcter* (contenant le motif NPF) en termes de survie en présence de rapamycine et ceux de la souche *irs4Δtax4Δ* (NP). Très clairement, la souche *atg11Δcter* présente des phénotypes différents de ceux de la souche déficiente pour Irs4p et Tax4p. Ce résultat suggère que Atg11p n'est sûrement pas l'unique élément liant la machinerie d'autophagie et les protéines à domaine EH.

Des études additionnelles concernant les fonctions des composants du complexe Atg11p et l'identification des interactions dépendant de Irs4p et Tax4p devrait fournir plus d'informations concernant la fonction de ces deux protéines à domaine EH dans le contrôle de l'autophagie.

Atg9p est une protéine intégrale de membrane nécessaire pour tous les types d'autophagie. Elle cycle entre la mitochondrie et le PAS. Atg11p interagit avec Atg9p et gouverne son ciblage au PAS (He et al. 2006) (Mari and Reggiori 2007). Sachant que Irs4p et Tax4p interagissent avec Atg11p, il serait intéressant de tester la localisation de Atg9p dans la souche *irs4Δtax4Δ*.

Yen et al ont identifié très récemment une seconde protéine transmembranaire requise principalement pour l'autophagie sélective : Atg27p. Atg27p est requise pour le cyclage de Atg9p (He et al. 2006; Yen et al. 2007). Atg27p voyage entre le PAS, la mitochondrie et l'appareil de Golgi. L'une des principales questions à propos de l'autophagie est la source des membranes. Les nouvelles données sur ces deux protéines trans-membranaires (Atg9p, Atg27p) et leur trafic entre différents compartiments (Golgi, Mitochondrie, PAS) renforce l'hypothèse selon laquelle les lipides sources de l'autophagosome auraient différentes sources. Davantage d'expériences sont requises afin de savoir si

Irs4p et Tax4p pourraient aussi participer à l'apport de membrane, sachant qu'elles sont situées dans différentes structures cellulaires. Même si nous avons trouvé que les autophagosomes sont de taille normale dans les cellules *irs4Δtax4Δ*, un moins grand nombre est formé dans la phase initiale d'autophagie par rapport au *WT*, donc moins de membranes sont incluses dans les vésicules. On peut se demander si un signal contrôle la taille des vésicules d'autophagie, cela semble probable car la taille des autophagosomes est supérieure à celle des vésicules de la voie CVT. Si tel est le cas, si moins de lipides sont disponibles, les cellules pourraient faire le choix de former moins d'autophagosomes mais de taille normale.

Hypothèses sur la fonction de Irs4p et Tax4p dans l'autophagie

En résumé, nos résultats suggèrent l'implication d'une nouvelle classe de protéines dans l'autophagie non sélective et la pexophagie : les protéines à domaine EH en Cterminal, Irs4p et Tax4p. Notre travail n'a pas permis de comprendre leur fonction moléculaire. On ne peut pas exclure que Irs4p et Tax4p aient une fonction non directement liée à l'autophagie. Cependant, la localisation de Irs4p et Tax4p partiellement au PAS et l'interaction des protéines avec Atg11p sont des arguments en faveur d'une implication directe.

Les phénotypes observés, retard mais pas blocage, nous permettent de proposer des hypothèses quant à la fonction des protéines dans l'autophagie. Nous pouvons imaginer que l'absence de Irs4p et Tax4p pourrait retarder l'induction de l'autophagie *via* la voie TOR, cette hypothèse n'a pas été testée directement car cette régulation reste relativement mal comprise. Le fait que Irs4p soit rapidement phosphorylée en réponse à la carence la désigne comme un possible interrupteur moléculaire régulé par les voies de signalisation. Dans ce cadre, il aurait été intéressant d'identifier la kinase impliquée dans la phosphorylation de Irs4p.

Nous avons trouvé que Tax4p peut se localiser au noyau : joue t-elle le rôle de régulateur transcriptionnel ? Nous avons observé que l'ajout de rapamycine modifie la localisation de Tax4p : passage du noyau à une structure cytoplasmique ponctuée (potentiellement le PAS). Or, plusieurs effecteurs de la voie TOR sont des activateurs transcriptionnels (Tap42, Sit4, Ure2 et Gln3) (Kirisako et al. 1999; Reggiori and Klionsky 2002). Ils régulent la transcription de *ATG8* et sûrement d'autres gènes codant des protéines impliquées dans l'autophagie. Nous avons étudié la possibilité d'un retard dans l'induction de l'expression de Atg8p dans *irs4Δtax4Δ* par rapport aux cellules *WT*. Cependant, l'induction de Atg8p est identique dans les cellules *irs4Δtax4Δ* et *WT* après carence. Il serait intéressant d'étudier la transcription d'autres gènes impliqués dans l'autophagie dans des cellules *irs4Δtax4Δ*. Une telle fonction pourrait expliquer le retard observé dans la mise en place du processus. Une autre hypothèse serait que l'absence de Irs4p et Tax4p provoquerait une délocalisation ou un retard d'envoi vers le PAS de certains Atg et donc un délai dans la mise en place du processus. A ce

jour, nous avons trouvé que la localisation de Atg11p et de Atg8p au PAS est normale dans les cellules *irs4Δtax4Δ*. Une étude globale des autres Atg n'a pas été entreprise.

Il est aussi envisageable que certaines interactions à l'intérieur du complexe Atg11p (incluant Irs4p, Tax4p et les protéines requises pour les différents types d'autophagie) soient perdues ou affaiblies en l'absence de Irs4p et Tax4p. Des analyses de la dynamique des interactions permettront peut-être de comprendre davantage la fonction de Irs4p et Tax4p dans le processus d'autophagie.

L'implication dans l'autophagie de protéines à domaine EH habituellement acteurs d'étapes de trafic vésiculaire (voie d'endocytose et de recyclage) pourrait donner un éclairage nouveau aux questions qui ont trait aux mécanismes membranaires de formation des autophagosomes.

Propriétés agrégatives de Irs4p et Tax4p

La sur-expression de formes étiquetées d'Irs4p ou Tax4p induit la formation de tubules. Le domaine non structuré de ces protéines semble nécessaire à la formation de ces tubules, au contraire de leur domaine EH.

Il serait intéressant de savoir si ces structures sont des agrégats protéiques purs ou s'ils sont associés à des membranes. Après centrifugation, Irs4p est partitionnée entre le P13 et P100 mais ne se retrouve pas dans le S100 (NP). Cependant, nous avons trouvé des co-localisations très partielles des protéines avec les compartiments membranaires. Une purification biochimique de ces tubules devrait nous permettre de déterminer leur nature (protéique ou associée à des membranes). Alternativement, nous envisageons une étude en immuno-électro-microscopie sur des cellules sur-exprimant Tax4p en utilisant un anticorps dirigé contre Tax4p que nous avons développé.

Nous n'avons pas pu trouver jusqu'ici les facteurs nécessaires à la formation et au maintien de ces structures. Le trafic le long des voies de sécrétion et d'endocytose ne semble pas intervenir pour leur formation.

Compte tenu des ressemblances entre les tubules formés par Sup35p et Irs4p ou Tax4p et des conditions induisant leur prolifération (entrée en phase stationnaire et niveau d'expression), nous cherchons à savoir si ces protéines pourraient constituer une nouvelle classe de prions non riches en QN. Si les structures formées par Irs4p et Tax4p semblent similaires à celles formées par Sup35p, nous avons montré par co-expression, qu'elles n'étaient pas identiques (fig. 64 D). En présence de latrunculine A qui dépolimérise le cytosquelette d'actine, Sup35p et Irs4p sont toujours capables de former des tubules ((Zhou et al. 2001) et NP). Ganosova et al ont récemment proposé un modèle un peu différent ; ils ont montré des interactions entre des protéines du cytosquelette d'actine et Sup35p et proposent que les agrégats se formeraient au niveau du cytosquelette cortical (Ganosova et al. 2006). Par contre, si les microtubules semblent intervenir dans la formation des agrégats prions riches en QN, nos expériences montrent que leur disruption en présence de nocodazole n'empêche pas le maintien des tubules de Irs4p (NP).

De plus, dans des mutants délétés pour *HSP104*, les tubules de Irs4p sont toujours formés (NP) ; son inactivation génère une augmentation de la taille des agrégats de Sup35p (Wegrzyn et al. 2001). Hsp104p est une chaperonne moléculaire. A ce titre, elle permet le repliement correct des protéines, mais ne semble pas capable de contrebalancer la présence d'agrégats formés par la sur-expression de Sup35p. De manière étonnante, Hsp104p est indispensable à la propagation des prions : elle permet de désassembler les gros agrégats afin d'en former de petits qui initient de nouvelles formations et donc participent à la propagation. Nous ne savons pas encore si les structures formées par Irs4p et Tax4p sont transmissibles mais c'est un élément déterminant dans la mise en évidence de nouveaux prions. Les agrégats formés par Sup35p semblent toxiques pour les cellules (Zhou et al. 2001). Nous n'avons pas observé de perte de viabilité dans les cellules sur-exprimant Irs4p ou Tax4p.

A ce stade, il est donc difficile de savoir si ces structures tubulaires sont un artefact de sur-expression ou ont une réelle signification biologique en lien avec leur fonction.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence le lien éventuel entre fonction de Irs4p et Tax4p dans l'autophagie et formation des tubules. Le seul élément de réponse dont nous disposons pour l'instant est l'absence des tubules dans les cellules *atg11Δ*. Compte tenu de l'interaction de Irs4p et Tax4p avec Atg11p, ce résultat suggère qu'un lien pourrait exister, mais nous ne le comprenons pas.

Comme mentionné dans l'introduction, une accumulation d'autophagosomes est observée en présence d'agrégats, suggérant que l'autophagie participerait à leur élimination (Larsen and Sulzer 2002). A ce jour, on ignore comment ces agrégats sont reconnus par la machinerie d'autophagie. Il serait intéressant de trouver des interactions entre machinerie d'autophagie et protéines formant les agrégats. Au cours de notre étude, nous avons trouvé une interaction entre Atg11p et Irs4p/Tax4p qui forment des agrégats, cette interaction permettrait-elle d'activer la machinerie d'autophagie ?

Ganosova et al proposent que les agrégats formés par Sup35p seraient dégradés par autophagie et pourraient peut-être l'induire (Ganosova et al. 2006). Même si cette hypothèse semble peu probable, peut-être que les formes endogènes de Irs4p et Tax4p pourraient également induire la formation d'agrégats qui activeraient l'autophagie dans certaines conditions. Ainsi leur délétion conduirait à un retard dans la mise en place du processus comme nous l'avons observé.

Conclusions et perspectives

L'étude menée a permis de mettre en évidence de nouveaux acteurs des voies de recyclage et d'autophagie. Cependant, de nombreuses questions demeurent concernant ces deux voies de trafic, j'en présenterai certaines. Au cours de ce dernier paragraphe, je souhaite discuter des apports et des inconvénients des choix faits au cours de ce projet en termes de cargos, d'approches expérimentales, de modèles cellulaires (...) et proposer des alternatives éventuelles.

Etude du recyclage dans un contexte mutant (déficient pour les complexes ESCRTs)

L'invagination des membranes des MVBs où sont dirigés les cargos ubiquitinés requiert l'action des complexes ESCRTs, conservés de la levure à l'homme. Comprendre le fonctionnement des cellules déficientes pour cette machinerie représente donc un enjeu important. En effet, il a été montré que la perte de fonction des ESCRTs est associée à l'accumulation de protéines comme l'EGFR à la membrane plasmique, probablement à l'origine de certains cancers (Babst et al. 2000). Notre étude visait donc à comprendre l'origine de ces phénotypes en utilisant la levure comme modèle et cet objectif a été rempli. Nous avons pu démontrer grâce à un protocole adéquat que l'accumulation de protéines à la membrane plasmique est la conséquence d'un recyclage accru. Notre 2^{ème} objectif était de mieux comprendre le recyclage dans ces cellules mutantes et plus généralement de caractériser de nouveaux facteurs du recyclage. Le bilan du travail visant à ce 2^{ème} objectif est relativement maigre.

Au cours de ce travail, nous nous sommes focalisé sur le recyclage dans des cellules mutantes. Ainsi, nous avons artificiellement bloqué les cargos dans des compartiments endosomaux modifiés, précoces ou tardifs, en bloquant le trafic en aval par des mutations. A partir de là, nous avons suivi leur recyclage. On peut se demander si le recyclage observé dans ces conditions non physiologiques reflète des voies qui existent réellement dans des cellules sauvages. Plusieurs études, en microscopie électronique notamment, ont montré que les endosomes tardifs dans les mutants ESCRTs, ou compartiments classe E, ont des propriétés morphologiques tout à fait particulières : absence de vésicules internes, empilement de saccules et de tubules. De plus, des structures endosomales précoces y serait également piégées (H Riezman, communication personnelle). Il apparaît probable que les endosomes précoces soient également modifiés en cas de blocage du trafic endosomal en aval.

Les résultats obtenus dans ces mutants, en termes de voies suivies par les cargos et de machineries de recyclage sont-ils directement transposables à des cellules sauvages ? En d'autres termes, la machinerie est-elle identique à celle nécessaire au recyclage de cargos dans le contexte sauvage ? Par exemple, une voie directe de l'endosome tardif à la membrane plasmique existe-t-elle aussi dans des cellules sauvages ou correspond-elle à la mise en place d'une route nouvelle pour contre balancer la non fonctionnalité du retour vers l'appareil de Golgi (non fonctionnalité du rétromère) dans les mutants ESCRTs ? Quand la voie d'endocytose est bloquée, la cellule pourrait mettre en place un recyclage par défaut. En particulier, des signaux de tri/sauvetage pourraient être nécessaires pour que le cargo recycle dans les cellules WT mais ceux-ci deviennent probablement dispensables dans le cas des mutants.

Choix des cargos et des protocoles d'étude

L'utilisation de Fur4-GFP sous contrôle d'un promoteur régulable nous a permis d'étudier séparément son endocytose vers le compartiment classe E puis son recyclage vers la membrane plasmique depuis cet organelle en l'absence de néosynthèse. Nous avons donc pu mesurer la dynamique du processus.

Nous pensons qu'en phase exponentielle de croissance, le maintien de Fur4p à la membrane plasmique dans des cellules sauvages pourrait être assuré par une endocytose constitutive permanente suivie de recyclage. Néanmoins, il est difficile d'étudier la dynamique du recyclage dans ces conditions de croissance, les deux voies étant simultanée. Nous avons donc choisi d'induire dans un 1^{er} temps une endocytose massive puis, une fois toute la perméase internalisée, nous avons provoqué son recyclage. Cependant, dans de telles conditions, si la voie d'endocytose est fonctionnelle, Fur4p est normalement envoyée jusqu'à la vacuole pour dégradation, ce qui nous a empêché d'étudier le recyclage dans un contexte sauvage. Expérimentalement, quand l'endocytose est induite, il est difficile de rassembler l'ensemble du cargo dans un seul compartiment sans, pour ce faire, utiliser des mutants bloquant le trafic en aval. D'autres cargos ont un recyclage régulé par les conditions de croissance et peuvent échapper à la dégradation dans des cellules WT, ces cargos sont de bons candidats afin d'étudier les routes du recyclage dans des conditions plus physiologiques. On peut citer par exemple Chs3p qui recycle en cas de dommage de la paroi cellulaire (Valdivia and Schekman 2003) ou Ste3p. Ste3p est endocytée constitutivement de manière dépendante de l'ubiquitine et dégradée en l'absence de son substrat. Au contraire, Ste3p, endocytée de manière indépendante de l'ubiquitine en présence de phéromone, en l'absence de signal de dégradation, elle est alors recyclée « par défaut ». Ceci implique la présence d'une machinerie de tri entre cargo ubiquitiné ou non au niveau de l'endosome précoce (Chen and Davis 2002).

Cependant, ces cargos ne recyclent pas depuis l'endosome tardif, voie à laquelle nous nous sommes davantage intéressés. Une fraction de la perméase Gap1p et du transporteur de Ferrioxamine B, Sit1p semblent pouvoir recycler dans des cellules sauvages (M. Froissard et N. Belgareh, communication personnelle). Mais, la route suivie par Gap1p a été étudiée uniquement dans des souches *vps* classe E où le niveau de recyclage est beaucoup plus important et la perméase ne peut pas rejoindre la vacuole pendant la phase d'endocytose (Rubio-Teixeira and Kaiser 2006). L'idéal serait de trouver un cargo qui recycle massivement depuis l'endosome tardif dans les cellules sauvages ; certaines autres perméases sont de bons candidats.

On peut s'attendre à ce qu'une partie de la machinerie soit commune aux différents cargos et que les facteurs de régulation soient eux spécifiques. A ce titre, nous avons également étudié le recyclage de Snc1p et du FM4-64 dans les mutants présentant un défaut de recyclage de Fur4p. Ainsi, nous avons montré que Ump1p est un facteur spécifique de Fur4p ou peut-être des cargos recyclant depuis la voie d'endocytose « tardive ». Il serait intéressant de mesurer le recyclage de Gap1p et Sit1p dans le mutant *ump1Δ*. Au contraire, le complexe Vps classe C est requis pour tous les recyclages étudiés ; probablement car, les endosomes précoces sont non fonctionnels dans les mutants. Pour Gap1p, des

protéines formant un manteau potentiel et des facteurs impliqués dans la régulation du recyclage en fonction des conditions du milieu ont pu être identifiées. La régulation du recyclage de Fur4p devrait nécessiter des facteurs comparables.

L'étude du recyclage de GFP-Snc1p par fluorescence permet de connaître la localisation de la protéine à l'équilibre (Lewis et al. 2000). De plus, l'étude de la phosphorylation permet une évaluation semi-quantitative du recyclage et une comparaison fine entre les souches d'intérêt. En revanche, la néosynthèse n'est pas bloquée et Snc1p ne permet pas d'étudier la dynamique du recyclage. De plus, si un mutant présente simultanément un ralentissement dans la voie d'endocytose et de recyclage, il apparaît, à l'équilibre, identique au sauvage. Il est donc important de vérifier dans les mêmes mutants la cinétique d'endocytose avec un cargo comme Fur4p. Enfin, nous avons suivi le trafic des lipides membranaires grâce à un colorant lipophile, le FM4-64 (Wiederkehr et al. 2000). 10 minutes après son internalisation, le colorant endocyté se retrouve au niveau des endosomes précoces. Après des lavages, le retour de ce pool endosomal vers la membrane plasmique est mesuré au spectrofluorimètre. Cet essai permet donc une quantification précise du recyclage. Des phases d'endocytose plus longues permettraient peut-être de l'adapter à l'étude du recyclage depuis l'endosome tardif ; là encore, la difficulté est de pouvoir concentrer le FM4-64 dans un seul compartiment, sans utiliser des mutants.

L'utilisation de nouveaux cargos permettrait peut-être de montrer l'existence de voies additionnelles de recyclage, directement depuis l'endosome précoce par exemple. La multiplicité des voies empruntées par différents cargos permet une régulation différentielle de leur recyclage chez les eucaryotes supérieurs et sûrement aussi chez la levure. De plus, un niveau de régulation supplémentaire est assuré par l'existence de différentes voies de recyclage pour un même cargo, comme le récepteur à la transferrine chez les eucaryotes supérieurs et, semble-t-il, Fur4p chez *S.cerevisiae*.

Choix du modèle cellulaire

Avantages du modèle levure

Pour notre étude, nous avons choisi la levure *S. cerevisiae* comme modèle cellulaire. Celui-ci possède un certain nombre d'avantages largement reconnus : facilité de manipulation, multiplicité des approches permises (génétique, génomique, biochimique, cellulaire), génome totalement séquencé, nombre plus restreint de facteurs cellulaires que chez les eucaryotes supérieurs mais organisation similaire et souvent conservation des mécanismes et des acteurs, par exemple, dans l'endocytose et l'exocytose. L'ensemble de ces caractéristiques en font un modèle de choix –simple et rapide- pour l'étude du trafic dans une cellule eucaryote.

Cependant, la mise au point de nouvelles techniques chez les eucaryotes supérieurs, telles que l'interférence à ARN, permet maintenant de répondre à ce type de problématique. Dans ces conditions, on peut se demander quel est l'intérêt d'utiliser la levure et ce que l'on peut apprendre sur le recyclage

grâce à la levure. Il y a encore quelques années le recyclage était très peu étudié dans la levure, mais des essais sont maintenant disponibles et de nombreuses données ont pu être acquises en un temps restreint.

Au cours de ce travail, la facilité de la génétique a été l'avantage dont nous avons le plus tiré partie avec la construction de mutants « candidats » et un crible génétique à large échelle sans *a priori*. Afin de trouver d'autres composants d'une nouvelle voie de recyclage, nous avons réalisé un crible génétique basé sur la sensibilité/ résistance au 5-FU sur une collection des 4800 mutants de levure viables. A cette collection de simples mutants délétés chacun pour un gène non-essentiels, s'ajoute maintenant la collection des souches où chaque gène essentiel est placé sous le contrôle d'un promoteur répressible, qu'il aurait été intéressant de cribler également.

Les cribles phénotypiques sur ces collections de souches ont permis la mise en évidence de relations inattendues entre des voies. Par exemple, afin de trouver de nouveaux facteurs impliqués dans le trafic de Chs3p, Lam et al ont développé un test à large échelle basé sur la fixation à la chitine de la paroi cellulaire d'une drogue fluorescente, le calcofluor white. Des mutants de trafic de Chs3p présentent donc une plus faible fluorescence. Grâce à ce crible, un lien inattendu entre la palmitoylation de Chs3p et sa sécrétion a pu être mis en évidence (Lam et al. 2006). On peut s'attendre à ce que des facteurs nécessaires au recyclage de Chs3p soient également isolés grâce à ce crible. Afin de caractériser le trafic des perméases, d'autres cribles ont été entrepris. Par exemple, un crible basé sur la sensibilité accrue à la canavanine (drogue pénétrant dans les cellules par l'arginine perméase Can1p) de mutants recyclant davantage Can1p aurait permis de découvrir de nouveaux ESCRTs (S. Emr, communication personnelle).

Des analyses croisées de la collection des mutants dans différentes conditions permettent de regrouper en clusters des mutants ayant des phénotypes communs. Cette méthode permet de prédire la fonction de protéines non caractérisées trouvées au sein de clusters contenant des protéines de fonctions connues. Elle a montré que de nombreuses protéines ont plusieurs fonctions distinctes dans la cellule (Dudley et al. 2005). De plus, une utilisation originale peut en être faite. Par exemple, cette approche a permis de mieux comprendre le mode d'action de différents principes actifs utilisés en médecine humaine grâce à l'étude de la croissance de levure en leur présence, comme le 5-FU utilisé lors des chimiothérapies (Lum et al. 2004).

Différentes études globales grâce aux collections disponibles (délétants, ORF étiquetées pour permettre leur localisation ou leur purification...) sont envisageables dans le but d'étudier le trafic intracellulaire de manière global (pour revue, voir (Quenneville and Conibear 2006)). De manière schématique, on distingue : la génomique fonctionnelle (crible pour un phénotype donné, voir ci-avant), étude des interactions génétiques (cribles de co-létalité) (Tong et al. 2004), étude de la localisation (localizome) (Huh et al. 2003), étude des interactions par double hybride (Ito et al. 2001) ou par purification des complexes par affinité suivie de spectrométrie de masse (interactome) (Gavin

et al. 2006) ou étude protéomique sur des organelles après fractionnement, étude de l'expression des gènes dans différentes conditions (transcriptome).

L'intégration des données obtenues lors de ces différentes approches, ou biologie systémique, permet d'atteindre un niveau supplémentaire de compréhension des processus biologiques complexes (comme le recyclage) en les appréhendant dans leur ensemble : identification de la machinerie, régulation, relations croisées entre les voies (...); le but final étant de créer des modèles prédictifs concernant le trafic vésiculaire.

Limites du modèle levure

Afin de déterminer la route et la machinerie du recyclage de Fur4p, nous avons utilisé une approche « mutants », c'est-à-dire que nous avons recherché des mutations qui inhibent le recyclage. Cependant, les résultats obtenus sont décevants. Notre hypothèse est que cette approche a été inopérante à cause de la redondance des facteurs mais aussi par la versatilité des voies de recyclage. Un défaut dans une voie est peut-être contrebalancé par le passage du cargo par une voie alternative. Cette adaptabilité des routes de recyclage est bien caractérisée chez les eucaryotes supérieurs dans le cas du récepteur à la transferrine. Chez la levure, aucune donnée ne permet de l'attester concernant le recyclage. Par contre, on sait par exemple que la phosphatase alcaline est normalement envoyée à la vacuole par la voie AP3 directement depuis l'appareil de Golgi. En cas de blocage de cette voie, la phosphatase alcaline est redirigée vers la voie *VPS*, qui a la même origine (Golgi) et la même destination (vacuole) que la voie AP3, mais, qui implique un passage par le MVB (Stepp et al. 1997).

En outre, les approches phénotypiques globales génèrent beaucoup de faux positifs et d'artéfacts, comme nous l'avons expérimenté ; d'où l'intérêt de les combiner pour obtenir des résultats plus fiables. Elles doivent être très bien réfléchies quant au choix du phénotype observé qui doit être clair et n'avoir qu'une cause bien définie, ce qui est rarement le cas. Le seuil de sélection doit être éloigné du bruit de fond. Si l'ensemble de ces critères n'est pas rempli, ces cribles peuvent générer de grandes difficultés d'interprétation des résultats.

Enfin, beaucoup de protéines ou de mutants ne sont pas étudiables par ces approches globales. Citons quelques exemples, les protéines trans-membranaires sont problématiques lors des double hybrides. La localisation des protéines a été déterminée par étiquetage au locus chromosomique en C-terminal, or, les protéines de type SNAREs et RABs ne sont pas étiquetables en Cter. De même, la localisation des protéines naturellement peu exprimées n'a pas pu être déterminée. Les approches phénotypiques sont inopérantes dans le cas des protéines ayant des fonctions redondantes. Enfin, certaines protéines sensibles à la protéolyse sont dégradées lors des phases préliminaires des protocoles dédiés à l'étude des interactions physiques...

Autres approches envisageables

L'approche « mutants » présente donc des handicaps pour l'étude du recyclage. Les nouvelles techniques d'imagerie sont des alternatives intéressantes car elles permettent d'étudier les flux de protéines *in vivo* (Lippincott-Schwartz et al. 2001) et complètent donc l'approche « mutants ».

Par exemple, on peut étudier les différents compartiments traversés par une protéine lors de son recyclage par vidéomicroscopie en temps réel en suivant la colocalisation avec des marqueurs de différents organelles. Cette approche permettrait par exemple de savoir si un cargo transite par l'appareil de Golgi.

L'utilisation d'un variant de la GFP photoactivable (PA-GFP) permet aux protéines d'intérêt d'être localement activées et d'être suivies dans le temps. On peut ainsi suivre un petit pool de protéine depuis un compartiment donné. Comme mentionné précédemment, l'étude de la route suivie par un cargo, comme Fur4p ou Gap1p, dans une souche sauvage est difficile car quand on induit l'endocytose, on retrouve de la fluorescence dans les différents compartiments de la voie d'endocytose. L'utilisation d'une perméase étiquetée avec une GFP photoactivable permettrait l'induction de l'endocytose puis l'activation d'un pool de perméase à l'endosome tardif simultanément au passage en milieu où le recyclage est attendu. Cependant, à notre connaissance, la PA-GFP n'a jamais été employée chez la levure.

L'ensemble de ces outils ouvrent des portes alternatives intéressantes à la génétique classique ; pour certaines, la levure, du fait de sa petite taille, n'est cependant pas le modèle cellulaire le plus adéquat.

Etude de l'autophagie

Différents cribles génétiques, des études de localisation au PAS et des études des interactions ont permis d'acquérir un grand nombre de données sur l'autophagie. Cependant, Irs4p et Tax4p ont échappé à ces trois approches du fait de leur redondance, de leur faible expression *in vivo* et de leur sensibilité à la protéolyse.

L'approche mutants est adaptée à l'étude de l'autophagie car il n'existe pas de voie pouvant contrebalancer un blocage dans cette voie. Une combinaison de cette approche avec l'utilisation de techniques récentes d'imagerie pourraient aider à répondre à certaines des « grandes » questions. Par exemple, il est largement admis que les autophagosomes seraient formés au PAS, mais aucune donnée expérimentale ne l'atteste. Une étude au vidéomicroscope sur GFP-Atg8p devrait permettre de le savoir. On ignore la structure du PAS et sa purification biochimique a été tentée mais semble délicate. Une étude en immuno-électro-microscopie utilisant un anticorps dirigé contre Atg8p permettrait de savoir si elle est à proximité de certains organelles et de voir si des membranes y sont associées.

Un des plus grands défis dans le « monde de l'autophagie » est de découvrir les modalités de formation de l'autophagosome. Tout d'abord, on ne connaît toujours pas l'origine des membranes et il est probable qu'en réalité il y ait une multiplicité d'origines. Cependant, l'absence quasi-totale de

protéines associées aux membranes suggère l'existence d'un mécanisme de sélection et de « préparation » des membranes rendant l'identification de la source difficile puisque les marqueurs sont perdus. Un second défi est de comprendre comment cette vésicule se forme *de novo* –et non par bourgeonnement- et quelles sont les forces qui génèrent la courbure de la membrane puis sa fermeture. Enfin, une régulation de la voie d'autophagie semble nécessaire afin pour que la cellule ne digère pas complètement son contenu cytoplasmique. L'autophagie étant ralentie dans le mutant *irs4Δtax4Δ*, ces protéines à domaine EH sont de bons candidats pour une fonction régulatrice.

Remarques finales

Les deux voies –autophagie et recyclage- sur lesquelles se sont focalisées nos études restent relativement mal comprises en termes de mécanismes moléculaires et de régulation. Cependant, les études chez la levure ont permis d'acquérir des informations concernant les machineries impliquées et permettent parfois de proposer des modèles pour expliquer le fonctionnement des voies de trafic chez les eucaryotes supérieurs. On peut espérer que la combinaison des approches mutants, des approches globales et des techniques récentes d'imagerie permettront de mieux appréhender la dynamique de ces voies et leur complexité.

Bibliographie

-A-

- Abeliovich H, Dunn WAJ, Kim J, Klionsky DJ (2000) Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J Cell Biol* 151(5): 1025-1034.
- Adams A, Gottschling D, Kaiser C, Stearns T (1997) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York.
- Amenta JS, Sargus MJ, Venkatesan S, Shinozuka H (1978) Role of the vacuolar apparatus in augmented protein degradation in cultured fibroblasts. *J Cell Physiol* 94(1): 77-86.
- Amerik AY, Nowak J, Swaminathan S, Hochstrasser M (2000) The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell* 11(10): 3365-3380.
- Andrews N (2002) Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *J Cell Biol* 158: 389-394.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG et al. (1991) *Current protocols in molecular biology*; Greene Publishing Associates NY, N.Y., editor.
- Ausubel M (2000) *Current protocols in molecular biology*; Wiley J, editor.
- Avaro S, Belgareh-Touze N, Sibella-Arguelles C, Volland C, Haguenaer-Tsapis R (2002) Mutants defective in secretory/vacuolar pathways in the EUROFAN collection of yeast disruptants. *Yeast* 19(4): 351-371.

-B-

- Baba M, Takeshige K, Baba N, Ohsumi Y (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J Cell Biol* 124(6): 903-913.
- Babst M (2005) A protein's final ESCRT. *Traffic* 6(1): 2-9.
- Babst M, Sato TK, Banta LM, Emr SD (1997) Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *Embo J* 16(8): 1820-1831.
- Babst M, Odorizzi G, Estepa EJ, Emr SD (2000) Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic* 1(3): 248-258.
- Babst M, Katzman DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD (2002) ESCRT III : An Endosome-Associated Heterooligomeric Protein Complex Required For MVB Sorting. *Developmental Cell* 3: 271-282.
- Bache KG, Brech A, Mehlum A, Stenmark H (2003a) Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* 162(3): 435-442.
- Bache KG, Raiborg C, Mehlum A, Stenmark H (2003b) STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem* 278(14): 12513-12521.
- Baehrecke EH (2003) Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 10(9): 940-945.
- Baggett JJ, Wendland B (2001) Clathrin function in yeast endocytosis. *Traffic* 2: 297-302.
- Bajno L, Peng XR, Schreiber AD, Moore HP, Trimble WS et al. (2000) Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J Cell Biol* 149: 697-706.
- Balguerie A, Dos Reis S, Couly-Salin B, Chaignepain S, Sabourin M et al. (2004) The sequences appended to the amyloid core region of the HET-s prion protein determine higher-order aggregate organization in vivo. *J Cell Sci* 117(Pt 12): 2599-2610.
- Bankaitis VA, Malehorn DE, Emr SD, Greene R (1989) The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J Cell Biol* 108(4): 1271-1281.
- Belgareh-Touze N, Avaro S, Rouille Y, Hoflack B, Haguenaer-Tsapis R (2002) Yeast Vps55p, a functional homolog of human obesity receptor gene-related protein, is involved in late endosome to vacuole trafficking. *Mol Biol Cell* 13: 1694-1708.
- Benedetti H, Raths S, Crausaz F, Riezman H (1994) The END3 gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast. *Mol Biol Cell* 5(9): 1023-1037.
- Benmerah A, Lamaze C, Begue B, Schmid SL, Dautry-Varsat A et al. (1998) AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 140(5): 1055-1062.

- Bernales S, McDonald KL, Walter P (2006) Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* 4(12): e423.
- Bilodeau PS, Urbanowski JL, Winistorfer SC, Piper RC (2002) The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* 4(7): 534-539.
- Bishop N, Horman A, Woodman P (2002) Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol* 157(1): 91-101.
- Blondel MO, Morvan J, Dupre S, Urban-Grimal D, Haguenaer-Tsapis R et al. (2004) Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uracil binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation. *Mol Biol Cell* 15(2): 883-895.
- Bonangelino CJ, Chavez EM, Bonifacino JS (2002) Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13: 2486- 2501.
- Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J (2003) Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 409-414.
- Bonifacino JS, Glick BS (2004) The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* 116: 153-166.
- Bonifacino JS, Rojas R (2006) Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(8): 568-579.
- Bota DA, Davies KJ (2001) Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders. *Mitochondrion* 1(1): 33-49.
- Bowers C, Stevens TH (2005) Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1744: 438 - 454.
- Bowers K, Levi BP, Patel FI, Stevens TH (2000) The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11: 4277-4294.
- Bowers K, Lottridge J, Helliwell SB, Goldthwaite LM, Luzio JP et al. (2004) Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 5: 194- 210.
- Brace EJ, Parkinson LP, Fuller RS (2006) Skp1p regulates Soi3p/Rav1p association with endosomal membranes but is not required for vacuolar ATPase assembly. *Eukaryot Cell* 5(12): 2104-2113.
- Bugnicourt A, Froissard M, Sereti K, Ulrich HD, Haguenaer-Tsapis R et al. (2004) Antagonistic roles of ESCRT and Vps class C/HOPS complexes in the recycling of yeast membrane proteins. *Mol Biol Cell* 15(9): 4203-4214.

-C-

- Camilli P, Takei K (1996) Molecular Mechanisms in Synaptic Vesicle Endocytosis and Recycling. *Review Neuron* 16: 481-486.
- Carrera AC (2004) TOR signaling in mammals. *J Cell Sci* 117(Pt 20): 4615-4616.
- Ceresa B (2006) Regulation of EGFR endocytic trafficking by rab proteins. *Histol Histopathol* 21(9): 987-993.
- Chastagner P, Israel A, Brou C (2006) Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep* 7(11): 1147-1153.
- Chen L, Davis NG (2000) Recycling of the yeast a-factor receptor. *J Cell Biol* 151(3): 731-738.
- Chen L, Davis NG (2002) Ubiquitin-independent entry into the yeast recycling pathway. *Traffic* 3(2): 110-123.
- Chen SH, Chen S, Tokarev AA, Liu F, Jedd G et al. (2005) Ypt31/32 GTPases and their novel F-box effector protein Rcy1 regulate protein recycling. *Mol Biol Cell* 16(1): 178-192.
- Cheong H, Yorimitsu T, Reggiori F, Legakis JE, Wang CW et al. (2005) Atg17 regulates the magnitude of the autophagic response. *Mol Biol Cell* 16(7): 3438-3453.
- Chu T, Sun J, Saksena S, Emr SD (2006) New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J Cell Biol* 175(5): 815-823.
- Chuang JS, Schekman RW (1996) Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol* 135(3): 597-610.
- Ciechanover A, Hod Y, Hershko A (1978) A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 81: 1100-1105.

- Ciechanover A, Schwartz AL, Dautry-Varsat A, Lodish HF (1983) Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. *J Biol Chem* 258(16): 9681-9689.
- Codogno P (2004) [ATG genes and macroautophagy]. *Med Sci (Paris)* 20(8-9): 734-736.
- Confalonieri S, Di Fiore PP (2002) The Eps15 homology (EH) domain. *FEBS Lett* 513(1): 24-29.
- Conibear E, Cleck J, Stevens T (2003) Vps51p Mediates the Association of the GARP (Vps52/53/54) Complex with the Late Golgi t-SNARE Tlg1p. *Mol Biol Cell*(Apr;14(4)): 1610-1623.
- Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927): 37-44.
- Cowles CR, W.B. S, C.G. B, S.D. E (1997) Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *EMBO J* 16(10): 2769-2782.
- Curtiss M, Jones C, Babst M (2007) Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12. *Mol Biol Cell* 18(2): 636-645.

-D-

- D'Hondt K, Heese-Peck A, Riezman H (2000) Protein and lipid requirements for endocytosis. *Annu Rev Genet*(34): 255-295.
- Darsow T, Burd CG, Emr SD (1998) Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE. *J Cell Biol* 142: 913-922.
- Davierwala AP, Haynes J, Li Z, Brost RL, Robinson MD et al. (2005) The synthetic genetic interaction spectrum of essential genes. *Nat Genet* 37(10): 1147-1152.
- Davis NG, Horecka JL, Sprague GF, Jr. (1993) Cis- and trans-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J Cell Biol* 122(1): 53-65.
- de Beer T, Hoofnagle AN, Enmon JL, Bowers RC, Yamabhai M et al. (2000) Molecular mechanism of NPF recognition by EH domains. *Nat Struct Biol* 11: 1018-1022.
- De Duve C, Wattiaux X (1966) functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28: 435-492.
- De Matteis MA, Godi A, Corda D (2002) Phosphoinositides and the Golgi complex. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 434-447.
- Dell'Angelica EC, Puertollano R, Mullins C, Aguilar RC, Vargas JD et al. (2000) GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* 149(1): 81-94.
- Deloche O, Schekman RW (2002) Vps10p cycles between the TGN and the late endosome via the plasma membrane in clathrin mutants. *Mol Biol Cell* 13: 4296-4307.
- Devonald MA, Smith AN, Poon JP, Ihrke G, Karet FE (2003) Non-polarized targeting of AE1 causes autosomal dominant distal renal tubular acidosis. *Nat Genet* 33(2): 125-127.
- Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD (2002) The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277(36): 33105-33114.
- Donaldson JG (2003) Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* 278: 41573-41576.
- Dudley AM, Janse DM, Tanay A, Shamir R, Church GM (2005) A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol Syst Biol* 1: 2005 0001.
- Dunn KW, Maxfield FR (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting. *J Cell Biol* 117: 301-310.
- Dunn WA, Jr., Cregg JM, Kiel JA, van der Klei IJ, Oku M et al. (2005) Pexophagy: the selective autophagy of peroxysomes. *Autophagy* 1(2): 75-83.
- Dupre S, Haguenaer-Tsapis R (2001) Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. *Mol Cell Biol* 21(14): 4482-4494.
- Dupre S, Urban-Grimal D, Haguenaer-Tsapis R (2004) Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* 1695: 89-111.

-E-

- Edinger AL, Thompson CB (2003) Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell* 4(6): 422-424.
- Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *Faseb J* 15(12): 2286-2287.
- Epple UD, Eskelinen EL, Thumm M (2003) Intravacuolar membrane lysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Does vacuolar targeting of Cvt17/Aut5p affect its function? *J Biol Chem* 278(10): 7810-7821.
- Eugster A, Pecheur EI, Michel F, Winsor B, Letourneur F et al. (2004) Ent5p is required with Ent3p and Vps27p for ubiquitin dependent protein sorting into the multivesicular body. *Mol Biol Cell* 15: 3031-3041.

-F-

- Falguières T, Mallard F, Baron C, Hanau D, Lingwood C et al. (2001) Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell* 12(8): 2453-2468.
- Fengsrud M, Erichsen ES, Berg TO, Raiborg C, Seglen PO (2000) Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur J Cell Biol* 79(12): 871-882.
- Fevrier B, Raposo G (2004) Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology* 16: 415-421.
- Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ et al. (2002) Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419: 361-366.
- Friant S, Pecheur EI, Eugster A, Michel F, Lefkir Y et al. (2003) Ent3p Is a PtdIns(3,5)P₂ effector required for protein sorting to the multivesicular body. *Dev Cell* 5: 499-511.
- Funakoshi T, Matsuura A, Noda T, Ohsumi Y (1997) Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192(2): 207-213.
- Furuta N, Fujimura-Kamada K, Saito K, Yamamoto T, Tanaka K (2007) Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway. *Mol Biol Cell* 18(1): 295-312.

-G-

- Gagny B, Wiederkehr A, Dumoulin P, Winsor B, Riezman H et al. (2000) A novel EH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Ede1p, involved in endocytosis. *J Cell Sci* 113 (Pt 18): 3309-3319.
- Galan J-M, Haguenaer-Tsapis R (1997) Ubiquitin Lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J* 16: 5847-5854.
- Galan JM, Peter M (1999) Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9124-9129.
- Galan JM, Moreau V, André B, Volland C, Haguenaer-Tsapis R (1996) Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem* 271: 10946-10952.
- Galan JM, Wiederkehr A, Seol JH, Haguenaer-Tsapis R, Deshaies RJ et al. (2001) Skp1p and the F-box protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Mol Cell Biol* 21(9): 3105-3117.
- Gan Y, McGraw TE, Rodriguez-Boulán E (2002) The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat Cell Biol* 4: 605-609.
- Ganusova EE, Ozolins LN, Bhagat S, Newnam GP, Wegrzyn RD et al. (2006) Modulation of prion formation, aggregation, and toxicity by the actin cytoskeleton in yeast. *Mol Cell Biol* 26(2): 617-629.
- Gao M, Kaiser CA (2006) A conserved GTPase-containing complex is required for intracellular sorting of the general amino-acid permease in yeast. *Nat Cell Biol* 8(7): 657-667.
- Garnier C, Blondel MO, Haguenaer-Tsapis R (1996) Membrane topology of the yeast uracil permease. *Mol Microbiol* 21(5): 1061-1073.
- Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M et al. (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440(7084): 631-636.

- Gerrard SR, Bryant NJ, Stevens TH (2000) VPS21 controls entry of endocytosed and biosynthetic proteins into the yeast prevacuolar compartment. *Mol Biol Cell* 11(2): 613-626.
- Gissen P, Johnson CA, Morgan NV, Stapelbroek JM, Forshew T et al. (2004) Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE-dependent membrane fusion, cause arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome. *Nat Genet* 36(4): 400-404.
- Goldstein JL, Brown M, Anderson R, Russell DW, Schneider WJ (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1: 1-39.
- Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10592-10597.
- Govers R, ten Broeke T, van Kerkhof P, Schwartz AL, Strous GJ (1999) Identification of a novel ubiquitin conjugation motif, required for ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. *Embo J* 18(1): 28-36.
- Gozuacik D, Kimchi A (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23(16): 2891-2906.
- Gozuacik D, Kimchi A (2007) Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* 78: 217-245.
- Grant B, Zhang Y, Paupard MC, Lin SX, Hall DH et al. (2001) Evidence that RME-1, a conserved *C. elegans* EH-domain protein, functions in endocytic recycling. *Nat Cell Biol* 3(6): 573-579.
- Gruenberg J, Maxfield FR (1995) Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7(4): 552-563.
- Gu F, Crump CM, Thomas G (2001) Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci* 58: 1067-1084.
- Gurunathan S, David D, Gerst J (2002) Dynamin and clathrin are required for the biogenesis of a distinct class of secretory vesicles in yeast. *EMBO J* 21: 602-614.
- Gutierrez MG, Munafo DB, Beron W, Colombo MI (2004) Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2687-2697.
- Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R (1993) Cdk2, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75(4): 791-803.

-H-

- Haas A, Conradt B, Wickner W (1994) G-protein ligands inhibit in vitro reactions of vacuole inheritance. *J Cell Biol* 126(1): 87-97.
- Haft CR, de la Luz Sierra M, Barr VA, Haft DH, Taylor SI (1998) Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol Cell Biol* 18(12): 7278-7287.
- Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP et al. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5: 461-466.
- Haguenauer-Tsapis R, André B (2004) Membrane trafficking of yeast transporters: mechanisms and physiological control of downregulation. *Top Curr Gen* 9: 273-323.
- Hao M, Maxfield FR (2000) Characterization of rapid membrane internalization and recycling. *J Biol Chem* 275(20): 15279-15286.
- Harsay E, Schekman R (2002) A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *J Cell Biol* 156(2): 271-285.
- He C, Song H, Yorimitsu T, Monastyrska I, Yen WL et al. (2006) Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *J Cell Biol* 175(6): 925-935.
- Hein C, Springael JY, Volland C, Haguenauer-Tsapis R, Andre B (1995) NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol Microbiol* 18: 77-87.
- Helliwell SB, Losko S, Kaiser CA (2001) Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J Cell Biol* 153: 649-662.
- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258, 8206-8214.

- Hettema EH, Lewis MJ, Black MW, Pelham HR (2003) Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes. *Embo J* 22(3): 548-557.
- Hicke L, Riezman H (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84: 277-287.
- Hicke L, Dunn R (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 141-172.
- Hicke L, Schubert HL, Hill CP (2005) Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 610-621.
- Hicke L, Zanolari B, Pypaert M, Rohrer J, Riezman H (1997) Transport through the yeast endocytic pathway occurs through morphologically distinct compartments and requires an active secretory pathway and Sec18p/N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Mol Biol Cell* 8(1): 13-31.
- Holthuis JC, Nichols BJ, Pelham HR (1998a) The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast. *Mol Biol Cell* 9(12): 3383-3397.
- Holthuis JC, Nichols BJ, Dhruvakumar S, Pelham HR (1998b) Two syntaxin homologues in the TGN/endosomal system of yeast. *EMBO J* 17(1): 113-126.
- Hopkins CR, Gibson A, Shipman M, Strickland DK, Trowbridge IS (1994) In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and then routed to the plasma membrane of the leading lamella. *J Cell Biol* 125: 1265-1274.
- Horazdovsky BF, Cowles CR, Mustol P, Holmes M, Emr SD (1996) A novel RING finger protein, Vps8p, functionally interacts with the small GTPase, Vps21p, to facilitate soluble vacuolar protein localization. *J Biol Chem* 271: 33607-33615.
- Horton AC, Ehlers MD (2003) Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40: 277-295.
- Hua Z, Fatheddin P, Graham TR (2002) An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Mol Biol Cell* 13(9): 3162-3177.
- Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S, Sorkin A (2006) Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell* 21(6): 737-748.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW et al. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425(6959): 686-691.
- Hutchins MU, Veenhuis M, Klionsky DJ (1999) Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J Cell Sci* 112(Pt 22): 4079-4087.

-I-

- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y et al. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408(6811): 488-492.
- Ishihara N, Hamasaki M, Yokota S, Suzuki K, Kamada Y et al. (2001) Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Mol Biol Cell* 12(11): 3690-3702.
- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M et al. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8): 4569-4574.

-J-

- Juhasz G, Csikos G, Sinka R, Erdelyi M, Sass M (2003) The *Drosophila* homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett* 543(1-3): 154-158.
- Jun Y, Thorngren N, Starai VJ, Fratti RA, Collins K et al. (2006) Reversible, cooperative reactions of yeast vacuole docking. *EMBO J* 25(22): 5260-5269.

-K-

- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T et al. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* 19(21): 5720-5728.

- Kaiser CA, Schekman R (1990) Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* 61(4): 723-733.
- Kama R, Robinson M, Gerst JE (2007) Btn2, a Hook1 ortholog and potential Batten disease-related protein, mediates late endosome-Golgi protein sorting in yeast. *Mol Cell Biol* 27(2): 605-621.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M et al. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150(6): 1507-1513.
- Kanaseki T, Kadota K (1969) The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J Cell Biol* 42(1): 202-220.
- Katzmann DJ, Babst M, Emr SD (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106(2): 145-155.
- Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y (2001) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 152(3): 519-530.
- Kim J, Scott SV, Oda MN, Klionsky DJ (1997) Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol* 137(3): 609-618.
- Kim J, Kamada Y, Stromhaug PE, Guan J, Hefner-Gravink A et al. (2001) Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole. *J Cell Biol* 153(2): 381-396.
- Kirchhausen T (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69: 699-727.
- Kirchhausen T, Harrison SC (1981) Protein organization in clathrin trimers. *Cell* 23: 755-761.
- Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M et al. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* 147(2): 435-446.
- Kissova I, Deffieu M, Manon S, Camougrand N (2004) Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J Biol Chem* 279(37): 39068-39074.
- Kleijmeer M, Ramm G, Schuurhuis D, Griffith J, Rescigno M et al. (2001) Reorganization of multivesicular bodies regulates MHclass II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol* 155: 53-63.
- Kleijnen MF, Kirkpatrick DS, Gygi SP (2007) The ubiquitin-proteasome system regulates membrane fusion of yeast vacuoles. *EMBO J* 26(2): 275-287.
- Klionsky DJ (2005a) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 118(Pt 1): 7-18.
- Klionsky DJ (2005b) Autophagy. *Curr Biol* 15(8): R282-283.
- Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO (2007) Methods for Monitoring Autophagy from Yeast to Human. *Autophagy* 3(3).
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y et al. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5(4): 539-545.
- Kölling R, Hollenberg CP (1994) The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J* 13: 3261-3271.
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S et al. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169(3): 425-434.
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S (2005) The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 5(9): 726-734.
- Krsmanovic T, Pawelec A, Sydor T, Kolling R (2005) Control of Ste6 recycling by ubiquitination in the early endocytic pathway in yeast. *Mol Biol Cell* 16(6): 2809-2821.
- Kubler E, Riezman H (1993) Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Embo J* 12(7): 2855-2862.
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y (2002) Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* 277(21): 18619-18625.
- Kundu M, Thompson CB (2005) Macroautophagy versus mitochondrial autophagy: a question of fate? *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1484-1489.
- Kurten RC, Cadena DL, Gill GN (1996) Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science* 272(5264): 1008-1010.

Kvam E, Goldfarb DS (2007) Nucleus-vacuole junctions and piecemeal microautophagy of the nucleus in *S. cerevisiae*. *Autophagy* 3(2): 85-92.

-L-

- Lafourcade C, Galan JM, Peter M (2003) Opposite roles of the F-box protein Rcy1p and the GAP Gyp2p during recycling of internalized proteins in yeast. *Genetics* 164(2): 469-477.
- Lafourcade C, Galan JM, Gloor Y, Haguenaer-Tsapis R, Peter M (2004) The GTPase-activating enzyme Gyp1p is required for recycling of internalized membrane material by inactivation of the Rab/Ypt GTPase Ypt1p. *Mol Cell Biol* 24(9): 3815-3826.
- Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X (2006) Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* 124: 997-1009
- Lam KK, Davey M, Sun B, Roth AF, Davis NG et al. (2006) Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J Cell Biol* 174(1): 19-25.
- Lampson MA, Schmoranzler J, Zeigerer A, Simon SM, McGraw TE (2001) Insulin-regulated release from the endosomal recycling compartment is regulated by budding of specialized vesicles. *Mol Biol Cell* 12(11): 3489-3501.
- Lang T, Reiche S, Straub M, Bredschneider M, Thumm M (2000) Autophagy and the cvt pathway both depend on AUT9. *J Bacteriol* 182(8): 2125-2133.
- Larsen KE, Sulzer D (2002) Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol* 17(3): 897-908.
- Leber R, Silles E, Sandoval IV, Mazon MJ (2001) Yol082p, a novel CVT protein involved in the selective targeting of aminopeptidase I to the yeast vacuole. *J Biol Chem* 276(31): 29210-29217.
- Lesuisse E, Knight SA, Courel M, Santos R, Camadro JM et al. (2005) Genome-wide screen for genes with effects on distinct iron uptake activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 169(1): 107-122.
- Levine B (2005) Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120(2): 159-162.
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6(4): 463-477.
- Lewis MJ, Nichols BJ, Prescianotto-Baschong C, Riezman H, Pelham HR (2000) Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* 11(1): 23-38.
- Li Y, Kane T, Tipper C, Spatrick P, Jenness DD (1999) Yeast mutants affecting possible quality control of plasma membrane proteins. *Mol Cell Biol* 19(5): 3588-3599.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402(6762): 672-676.
- Lin SX, Grant B, Hirsh D, Maxfield FR (2001) Rme-1 regulates the distribution and function of the endocytic recycling compartment in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 3(6): 567-572.
- Lin SX, Mallet WG, Huang AY, Maxfield FR (2004) Endocytosed cation-independent mannose 6-phosphate receptor traffics via the endocytic recycling compartment en route to the trans-Golgi network and a subpopulation of late endosomes. *Mol Biol Cell* 15(2): 721-733.
- Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(6): 444-456.
- Longtine MS, A. MI, Demarini DJ, Shah NG, Wach A et al. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 953-961.
- Losev E, Reinke CA, Jellen J, Strongin DE, Bevis BJ et al. (2006) Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* 441(7096): 1002-1006.
- Losko S, Kopp F, Kranz A, Kolling R (2001) Uptake of the ATP-binding cassette (ABC) transporter Ste6 into the yeast vacuole is blocked in the *doa4* mutant. *Mol Biol Cell* 12(4): 1047-1059.
- Lottridge JM, Flannery AR, Vincelli JL, Stevens TH (2006) Vta1p and Vps46p regulate the membrane association and ATPase activity of Vps4p at the yeast multivesicular body. *PNAS* 103(16): 6202-6207.
- Lum PY, Armour CD, Stepaniants SB, Cavet G, Wolf MK et al. (2004) Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell* 116(1): 121-137.

Luo W, Chang A (2000) An endosome-to-plasma membrane pathway involved in trafficking of a mutant plasma membrane ATPase in yeast. *Mol Biol Cell* 11(2): 579-592.

-M-

Mallard F, Antony C, Tenza D, Salamero J, Goud B et al. (1998) Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol* 143(4): 973-990.

Mallard F, Tang BL, Galli T, Tenza D, Saint-Pol A et al. (2002) Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol* 156(4): 653-664.

Mallet WG, Maxfield FR (1999) Chimeric forms of furin and TGN38 are transported with the plasma membrane in the trans-Golgi network via distinct endosomal pathways. *J Cell Biol* 146: 345-359.

Marchal C, Haguenaer-Tsapis R, Urban-Grimal D (2000) Casein kinase I-dependent phosphorylation within a PEST sequence and ubiquitination at nearby lysines, signal endocytosis of yeast uracil permease. *J Biol Chem* 275: 23608-23614.

Marchal C, Dupre S, Urban-Grimal D (2002) Casein kinase I controls a late step in the endocytic trafficking of yeast uracil permease. *J Cell Sci* 115(Pt 1): 217-226.

Mari M, Reggiori F (2007) Atg9 Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 3(2): 145-148.

Massey AC, Zhang C, Cuervo AM (2006) Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* 73: 205-235.

Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S et al. (1998) COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 93: 263-275.

Matsuura-Tokita K, Takeuchi M, Ichihara A, Mikuriya K, Nakano A (2006) Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* 441(7096): 1007-1010.

Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae* *Gene* 192(2): 245-250

Maxfield FR, McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 121-132.

Mayor S, Presley JF, Maxfield FR (1993) Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J Cell Biol* 121: 1257-1269.

McCaffrey MW, Bielli A, Cantalupo G, Mora S, Roberti V et al. (2001) Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Lett* 495: 21-30.

McNatt MW, McKittrick I, West M, Odorizzi G (2007) Direct binding to Rsp5 mediates ubiquitin-independent sorting of Sna3 via the multivesicular body pathway *Mol Biol Cell* 18(2): 697-706.

Meijer AJ, Codogno P (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12): 2445-2462.

Meiling-Wesse K, Barth H, Voss C, Eskelinen EL, Epple UD et al. (2004) Atg21 is required for effective recruitment of Atg8 to the preautophagosomal structure during the Cvt pathway. *J Biol Chem* 279(36): 37741-37750.

Melendez A, Tallozy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH et al. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301(5638): 1387-1391.

Mellman I (2000) Quo vadis: polarized membrane recycling in motility and phagocytosis. *J Cell Biol* 149: 529-530.

Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7(8): 766-772.

Miliaras NB, Wendland B (2004) EH Proteins: Multivalent Regulators of Endocytosis (and Other Pathways). *Cell Biochem Biophys* 41(2): 295-318.

Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 27(6): 421-429.

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2003) Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 35(5): 553-561.

- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y et al. (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152(4): 657-668.
- Mnaimneh S, Davierwala AP, Haynes J, Moffat J, Peng WT et al. (2004) Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell* 118(1): 31-44.
- Monastyrska I, Shintani T, Klionsky DJ, Reggiori F (2006) Atg11 directs autophagosome cargoes to the PAS along actin cables. *Autophagy* 2(2): 119-121.
- Morales-Johansson H, Jenoe P, Cooke FT, Hall MN (2004) Negative regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by the INP51-associated proteins TAX4 and IRS4. *J Biol Chem* 279(38): 39604-39610.
- Moreau V, Galan JM, Devilliers G, Haguenaer-Tsapis R, Winsor B (1997a) The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis. *Mol Biol Cell* 8(7): 1361-1375.
- Moreau V, Galan J-M, Devilliers G, Haguenaer-Tsapis R, Winsor B (1997b) The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis. *Mol Biol Cell* 8: 1361-1375.
- Morvan J, Froissard M, Haguenaer-Tsapis R, Urban-Grimal D (2004) The ubiquitin ligase Rsp5p is required for modification and sorting of membrane proteins into multivesicular bodies. *Traffic* 5(5): 383-392.
- Mostov K, Su T, Ter Beest M (2003) Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol* 5: 287-293.
- Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315: 201-205.
- Mumberg D, Muller R, Funk M (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156(1): 119-122.
- Muniz M, Morsomme P, Riezman H (2001) Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* 104: 313-320.
- Munn AL, Riezman H (1994) Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *J Cell Biol* 127: 373-386.
- Murk JL, Humbel BM, Ziese U, Griffith JM, Posthuma G et al. (2003) Endosomal compartmentalization in three dimensions: implications for membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13332-13337.

-N-

- Nakamura N, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y (1997) Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem (Tokyo)* 121(2): 338-344.
- Naslavsky N, Caplan S (2005) C-terminal EH-domain-containing proteins: consensus for a role in endocytic trafficking, EH? *J Cell Sci* 118(Pt 18): 4093-4101.
- Newpher TM, Lemmon SK (2006) Clathrin is important for normal actin dynamics and progression of Sla2p-containing patches during endocytosis in yeast. *Traffic* 7(5): 574-588.
- Newpher TM, Idrissi FZ, Geli MI, Lemmon SK (2006) Novel function of clathrin light chain in promoting endocytic vesicle formation. *Mol Biol Cell* 17(10): 4343-4352.
- Nice DC, Sato TK, Stromhaug PE, Emr SD, Klionsky DJ (2002) Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *J Biol Chem* 277(33): 30198-30207.
- Nichols B (2003) Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* 116(Pt 23): 4707-4714.
- Nikko E, Marini AM, Andre B (2003) Permease recycling and ubiquitination status reveal a particular role for Bro1 in the multivesicular body pathway. *J Biol Chem* 278(50): 50732-50743.
- Noda T, Ohsumi Y (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 273(7): 3963-3966.
- Noda T, Suzuki K, Ohsumi Y (2002) Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol* 12(5): 231-235.

- Noda T, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y (1995) Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 210(1): 126-132.
- Noda T, Kim J, Huang WP, Baba M, Tokunaga C et al. (2000) Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol* 148(3): 465-480.
- Novick P, Field C, Schekman R (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21(1): 205-215.
- Novick P, Ferro S, Schekman R (1981) Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25(2): 461-469.
- Nyman T, Kota J, Ljungdahl PO (2004) Ancillary proteins in membrane targeting of transporters. *Top Curr Gen* 9: 207-228.

-O-

- Odorizzi G, Babst M, Emr SD (1998) Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* 95: 847-858.
- Odorizzi G, Katzmann DJ, Babst M, Audhya A, Emr SD (2003) Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 116(Pt 10): 1893-1903.
- Oestreich AJ, Davies BA, Payne JA, Katzmann DJ (2007a) Mvb12 is a novel member of ESCRT-I involved in cargo selection by the multivesicular body pathway. *Mol Biol Cell* 18(2): 646-657.
- Oestreich AJ, Aboian M, Lee J, Azmi I, Payne J et al. (2007b) Characterization of multiple multivesicular body sorting determinants within Sna3: a role for the ubiquitin ligase Rsp5. *Mol Biol Cell* 18(2): 707-720.
- Ohsumi Y (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 211-216.
- Onodera J, Ohsumi Y (2004) Ald6p is a preferred target for autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279(16): 16071-16076.
- Ortiz D, Novick PJ (2006) Ypt32p regulates the translocation of Chs3p from an internal pool to the plasma membrane. *Eur J Cell Biol* 85(2): 107-116.
- Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH (2003) Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 278(20): 17636-17645.

-P-

- Parrish WR, Stefan CJ, Emr SD (2004) Essential role for the myotubularin-related phosphatase Ymr1p and the synaptojanin-like phosphatases Sjl2p and Sjl3p in regulation of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast. *Mol Biol Cell* 15(8): 3567-3579.
- Parton RG (2003) Caveolae--from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(2): 162-167.
- Pearse BM (1975) Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* 97(1): 93-98.
- Pelham HR (2001) Traffic through the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 155(7): 1099-1101.
- Pelham HR (2002) Insights from yeast endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 14(4): 454-462.
- Pelkmans L, Puntener D, Helenius A (2002) Local Actin Polymerization and Dynamin Recruitment in SV40-Induced Internalization of Caveolae. *Science* 296(5567): 535-539.
- Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D et al. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21(8): 921-926.
- Peterson MR, Emr SD (2001) The class C Vps complex functions at multiple stages of the vacuolar transport pathway. *Traffic* 2(7): 476-486.
- Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 275(2): 992-998.

- Piper RC, Bryant NJ, Stevens TH (1997) The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. *J Cell Biol* 138: 531-545.
- Piper RC, Cooper AA, Yang H, Stevens TH (1995) VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 131(3): 603-617.
- Polo S, Sigismund S, Faretta M, Guidi M, Capua MR et al. (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416: 451-455.
- Pornillos O, Garrus JE, Sundquist WI (2002) Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol* 12: 569-579.
- Pornillos O, Higginson DS, Stray KM, Fisher RD, Garrus JE et al. (2003) HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol* 162: 425-434.
- Poupon V, Polo S, Vecchi M, Martin G, Dautry-Varsat A et al. (2002) Differential nucleocytoplasmic trafficking between the related endocytic proteins Eps15 and Eps15R. *J Biol Chem* 277(11): 8941-8948.
- Powelka AM, Sun J, Li J, Gao M, Shaw LM et al. (2004) Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic* 5: 20-36.
- Prescianotto-Baschong C, Riezman H (1998) Morphology of the yeast endocytic pathway. *Mol Biol Cell* 9(1): 173-189.
- Priault M, Salin B, Schaeffer J, Vallette FM, di Rago JP et al. (2005) Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death Differ*.
- Prigent M, Dubois T, Raposo G, V. D, D. T et al. (2003) ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J Cell Biol* 163: 1111-1121.
- Puertollano R, Aguilar RC, Gorshkova I, Crouch RJ, Bonifacino JS (2001) Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* 292(5522): 1712-1716.

-Q-

- Quenneville NR, Conibear E (2006) Toward the systems biology of vesicle transport. *Traffic* 7(7): 761-768.

-R-

- Ramos PC, Marques AJ, London MK, Dohmen RJ (2004) Role of C-terminal extensions of subunits beta2 and beta7 in assembly and activity of eukaryotic proteasomes. *J Biol Chem* 279(14): 14323-14330.
- Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A et al. (2002) Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 3: 718-729.
- Raths S, Rohrer J, Crausaz F, Riezman H (1993) end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 120: 55-65.
- Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA, Stevens TH (1992) Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* 3(12): 1389-1402.
- Rayner JC, Pelham HR (1997) Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *Embo J* 16(8): 1832-1841.
- Reggiori F (2006) 1. Membrane origin for autophagy. *Curr Top Dev Biol* 74: 1-30.
- Reggiori F, Pelham HR (2001) Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *Embo J* 20(18): 5176-5186.
- Reggiori F, Pelham HR (2002) A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. *Nat Cell Biol* 4(2): 117-123.
- Reggiori F, Klionsky DJ (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 1(1): 11-21.
- Reggiori F, Klionsky DJ (2005) Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr Opin Cell Biol* 17(4): 415-422.
- Reggiori F, Klionsky DJ (2006) Atg9 sorting from mitochondria is impaired in early secretion and VFT-complex mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 119(Pt 14): 2903-2911.
- Reggiori F, Black MW, Pelham HR (2000) Polar transmembrane domains target proteins to the interior of the yeast vacuole. *Mol Biol Cell* 11(11): 3737-3749.

- Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2004a) The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell* 6(1): 79-90.
- Reggiori F, Shintani T, Nair U, Klionsky DJ (2005a) Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* 1(2): 101-109.
- Reggiori F, Monastyrska I, Shintani T, Klionsky DJ (2005b) The actin cytoskeleton is required for selective types of autophagy, but not nonspecific autophagy, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16(12): 5843-5856.
- Reggiori F, Wang CW, Stromhaug PE, Shintani T, Klionsky DJ (2003) Vps51 is part of the yeast Vps fifty-three tethering complex essential for retrograde traffic from the early endosome and Cvt vesicle completion. *J Biol Chem* 278(7): 5009-5020.
- Reggiori F, Wang CW, Nair U, Shintani T, Abeliovich H et al. (2004b) Early stages of the secretory pathway, but not endosomes, are required for Cvt vesicle and autophagosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15(5): 2189-2204.
- Reinders J, Zahedi RP, Pfanner N, Meisinger C, Sickmann A (2006) Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res* 5(7): 1543-1554.
- Ren M, Xu G, Zeng J, De Lemos-Chiarandini C, Adesnik M et al. (1998) Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6187-6192.
- Roberts P, Moshitch-Moshkovitz S, Kvam E, O'Toole E, Winey M et al. (2003) Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 14(1): 129-141.
- Rojas R, Apodaca G (2002) Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 944-955.
- Rojas R, Kametaka S, Haft CR, Bonifacino JS (2007) Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol Cell Biol* 27(3): 1112-1124.
- Rojo E, Zouhar J, Carter C, Kovaleva V, Raikhel NV (2003) A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12): 7389-7394.
- Roos-Mattjus P, Sistonen L (2004) The ubiquitin-proteasome pathway. *Ann Med* 36(4): 285-295.
- Rotin D, Staub O, Haguenaer-Tsapis R (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases [In Process Citation]. *J Membr Biol* 176(1): 1-17.
- Royle SJ, Murrell-Lagnado RD (2003) Constitutive cycling: a general mechanism to regulate cell surface proteins. *Bioessays* 25: 39-46.
- Rubio-Teixeira M, Kaiser CA (2006) Amino acids regulate retrieval of the yeast general amino acid permease from the vacuolar targeting pathway. *Mol Biol Cell* 17(7): 3031-3050.
- Rudich A, Klip A (2003) Push/pull mechanisms of GLUT4 traffic in muscle cells. *Acta Physiol Scand* 178: 297-308.

-S-

- Sacher M, Jiang Y, Barrowman J, Scarpa A, Burston J et al. (1998) TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *EMBO J* 17(9): 2494-2503.
- Sachse M, Urbe S, Oorschot V, Strous GJ, Klumperman J (2002) Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell* 13(4): 1313-1328.
- Sakai Y, Oku M, van der Klei IJ, Kiel JAKW (2006) Pexophagy: Autophagic degradation of peroxysomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 1767-1775.
- Salcini AE, Chen H, Iannolo G, De Camilli P, Di Fiore PP (1999) Epidermal growth factor pathway substrate 15, Eps15. *Int J Biochem Cell Biol* 8: 805-809.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1997) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*; Nolan C, editor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampo B, Kaech S, Kunz S, Banker G (2003) Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* 37: 611-624.

- Sanchatjate S, Schekman R (2006) Chs5/6 complex: a multiprotein complex that interacts with and conveys chitin synthase III from the trans-Golgi network to the cell surface. *Mol Biol Cell* 17(10): 4157-4166.
- Santolini E, Salcini AE, Kay BK, Yamabhai M, Di Fiore PP (1999) The EH network. *Exp Cell Res* 253(1): 186-209.
- Santos B, Snyder M (1997) Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol* 136(1): 95-110.
- Schin KS, Clever U (1965) Lysosomal and free acid phosphatase in salivary glands of chironomus tentans. *Science* 150(699): 1053-1055.
- Schmeizle K, Hall M (2000) TOR, a central controller of cell Growth. *Cell* 103: 253-262.
- Schmid SL, Fuchs R, Male P, Mellman I (1988) Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell* 52(1): 73-83.
- Schmidt A, Beck T, Koller A, Kunz J, Hall M (1998) The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO J* 17: 6924-6931.
- Schmitz C, Kinner A, Kolling R (2005) The deubiquitinating enzyme Ubp1 affects sorting of the ATP-binding cassette-transporter Ste6 in the endocytic pathway. *Mol Biol Cell* 16(3): 1319-1329.
- Scott SV, Guan J, Hutchins MU, Kim J, Klionsky DJ (2001) Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol Cell* 7(6): 1131-1141.
- Seaman MN (2006) Endosome sorting: GSE complex minds the Gap. *Nat Cell Biol* 8(7): 648-649.
- Seoighe C, Wolfe KH (1999) Updated map of duplicated regions in the yeast genome. *Gene* 238(1): 253-261.
- Sevrioukov EA, He JP, Moghrabi N, Sunio A, Kramer H (1999) A role for the deep orange and carnation eye color genes in lysosomal delivery in *Drosophila*. *Mol Cell* 4(4): 479-486.
- Sharma DK, Choudhury A, Singh RD, Wheatley CL, Marks DL et al. (2003) Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling. *J Biol Chem* 278: 7564-7572.
- Sheff D, Daro EA, Hull M, Mellman I (1999) The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J Cell Biol* 145: 123-139.
- Sheff D, Pelletier L, O'Connell CB, Warren G, Mellman I (2002) Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. *J Cell Biol* 156: 797-804.
- Sherman F, Fink G, Hicks JB (1986) *Methods in yeast genetics. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Shiba Y, Katoh Y, Shiba T, Yoshino K, Takatsu H et al. (2004) GAT (GGA and Tom1) domain responsible for ubiquitin binding and ubiquitination. *J Biol Chem* 279: 7105-7111.
- Shintani T, Klionsky DJ (2004a) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306(5698): 990-995.
- Shintani T, Klionsky DJ (2004b) Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Biol Chem* 279(29): 29889-29894.
- Shintani T, Huang WP, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2002) Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Dev Cell* 3(6): 825-837.
- Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C et al. (2005) Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *PNAS* 102(8): 2760-2765.
- Silles E, Mazon MJ, Gevaert K, Goethals M, Vandekerckhove J et al. (2000) Targeting of aminopeptidase I to the yeast vacuole is mediated by Ssa1p, a cytosolic member of the 70-kDa stress protein family. *J Biol Chem* 275(44): 34054-34059.
- Simonsen A, Wurmser AE, Emr SD, Stenmark H (2001) The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13: 485-492.
- Siniosoglou S, Pelham HR (2001) An effector of Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late Golgi membranes. *Embo J* 20(21): 5991-5998.
- Siniosoglou S, Pelham HR (2002) Vps51p links the VFT complex to the SNARE Tlg1p. *J Biol Chem* 277(50): 48318-48324.
- Siniosoglou S, Peak-Chew SY, Pelham HR (2000) Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p. *Embo J* 19(18): 4885-4894.

- Sipos G, Brickner JH, Brace EJ, Chen L, Rambourg A et al. (2004) Soi3p/Rav1p functions at the early endosome to regulate endocytic trafficking to the vacuole and localization of trans-Golgi network transmembrane proteins. *Mol Biol Cell* 15(7): 3196-3209.
- Smith JS, Caputo E, Boeke JD (1999) A genetic screen for ribosomal DNA silencing defects identifies multiple DNA replication and chromatin-modulating factors. *Mol Cell Biol* 19(4): 3184-3197.
- Soetens O, De Craene JO, Andre B (2001) Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J Biol Chem* 276: 43949-43957.
- Soldati T, Schliwa M (2006) Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nature reviews* 7: 897-908.
- Sonnichsen B, De RS, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149: 901-914.
- Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D (1995) A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 15: 1265-1273.
- Springael JY, Galan JM, Haguenaer-Tsapis R, Andre B (1999) NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J Cell Sci* 112(Pt 9): 1375-1383.
- Springael JY, Nikko E, Andre B, Marini AM (2002) Yeast Npi3/Bro1 is involved in ubiquitin-dependent control of permease trafficking. *FEBS Lett* 517(1-3): 103-109.
- Srivastava A, Jones EW (1998) Pth1/Vam3p is the syntaxin homolog at the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae* required for the delivery of vacuolar hydrolases. *Genetics* 148(1): 85-98.
- Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschop K, Ciechanover A et al. (1997) Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J* 16: 6325-6336.
- Steinman RM, Brodie SE, Cohn ZA (1976) Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis. *J Cell Biol* 68: 665-687.
- Stepp JD, Huang K, Lemmon SK (1997) The yeast adaptor protein complex, AP-3, is essential for the efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternate pathway to the vacuole. *J Cell Biol* 139(7): 1761-1774.
- Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V, Schwartz AL (1991) Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 65.
- Stromhaug PE, Reggiori F, Guan J, Wang CW, Klionsky DJ (2004) Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy. *Mol Biol Cell* 15(8): 3553-3566.
- Stroupe C, Collins KM, Fratti RA, Wickner W (2006) Purification of active HOPS complex reveals its affinities for phosphoinositides and the SNARE Vam7p. *EMBO J* 25(8): 1579-1589.
- Strous GJ, Govers R (1999) The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci* 112 (Pt 10): 1417-1423.
- Subramanian S, Woolford CA, Jones EW (2004) The Sec1/Munc18 Protein, Vps33p, Functions at the Endosome and the Vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15(6): 2593-2605.
- Suriapranata I, Epple UD, Bernreuther D, Bredschneider M, Sovarasteanu K et al. (2000) The breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole depends on Aut4p. *J Cell Sci* 113 (Pt 22): 4025-4033.
- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T et al. (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 20(21): 5971-5981.
- Suzuki T, Oiso N, Gautam R, Novak EK, Panthier JJ et al. (2003) The mouse organellar biogenesis mutant buff results from a mutation in Vps33a, a homologue of yeast vps33 and *Drosophila* carnation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(3): 1146-1150.
- Swanson KA, Kang RS, Stamenova SD, Hicke L, Radhakrishnan I (2003) Solution structure of Vps27 UIM-ubiquitin complex important for endosomal sorting and receptor downregulation. *Embo J* 22(18): 4597-4606.

-T-

- Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119(2): 301-311.
- Tan PK, Davis NG, Sprague GF, Payne GS (1993) Clathrin facilitates the internalization of seven transmembrane segment receptors for mating pheromones in yeast. *J Cell Biol* 123: 1707-1716.
- Tang H, Munn A, Cai M (1997) EH domain proteins Pan1p and End3p are components of a complex that plays a dual role in organization of the cortical actin cytoskeleton and endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8: 4294-4304.
- Teasdale RD, Loci D, Houghton F, Karlsson L, Gleeson PA (2001) A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1. *Biochem J* 358(Pt 1): 7-16.
- TerBush DR, Maurice T, Roth D, Novick P (1996) The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15(23): 6483-6494.
- Teter SA, Eggerton KP, Scott SV, Kim J, Fischer AM et al. (2001) Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J Biol Chem* 276(3): 2083-2087.
- Tong AH, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD et al. (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294(5550): 2364-2368.
- Tong AH, Lesage G, Bader GD, Ding H, Xu H et al. (2004) Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* 303(5659): 808-813.
- Toret CP, Drubin DG (2006) The budding yeast endocytic pathway. *J Cell Sci* 119(Pt 22): 4585-4587.
- Trautwein M, Schindler C, Gauss R, Dengjel J, Hartmann E et al. (2006) Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *Embo J* 25(5): 943-954.
- Tsukada M, Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333(1-2): 169-174.
- Tucker KA, Reggiori F, Dunn WA, Jr., Klionsky DJ (2003) Atg23 is essential for the cytoplasm to vacuole targeting pathway and efficient autophagy but not pexophagy. *J Biol Chem* 278(48): 48445-48452.
- Tuma PL, Hubbard AL (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* 83: 871-932.

-U-

- Umebayashi K, Nakano A (2003) Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J Cell Biol* 161(6): 1117-1131.
- Urbanowski J, Piper RC (2001) Ubiquitin sorts proteins into the luminal degradative compartment of the late endosome/vacuole. *Traffic* 2: 622-630.

-V-

- Valdez-Taubas J, Pelham HR (2003) Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr Biol* 13(18): 1636-1640.
- Valdivia RH, Schekman R (2003) The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18): 10287-10292.
- Valdivia RH, Baggott D, Chuang JS, Schekman RW (2002) The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev Cell* 2(3): 283-294.
- van Dam EM, Stoorvogel W (2002) Dynamin-dependent Transferrin Receptor Recycling by Endosome-derived Clathrin-coated Vesicles. *Mol Biol Cell* 13(1): 169-182.
- van Dam EM, Ten Broeke T, Jansen K, Spijkers P, Stoorvogel W (2002) Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 277(50): 48876-48883.
- Volland C, Garnier C, Haguenaer-Tsapis R (1992) In vivo phosphorylation of the yeast uracil permease. *J Biol Chem* 267(33): 23767-23771.
- Volland C, Urban-Grimal D, Géraud G, Haguenaer-Tsapis R (1994a) Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J Biol Chem* 269: 9833-9841.
- Volland C, Galan JM, Urban-Grimal D, Devilliers G, Haguenaer-Tsapis R (1994b) Endocytose and degradation of the uracil permease of *S. cerevisiae* under stress conditions: possible role of ubiquitin. *Folia Microbiol (Praha)* 39(6): 554-557.

-W-

- Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C et al. (2006) Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439(7079): 998-1003.
- Wang CW, Stromhaug PE, Shima J, Klionsky DJ (2002) The Ccz1-Mon1 protein complex is required for the late step of multiple vacuole delivery pathways. *J Biol Chem* 277(49): 47917-47927.
- Wang CW, Hamamoto S, Orci L, Schekman R (2006) Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J Cell Biol* 174(7): 973-983.
- Wang CW, Stromhaug PE, Kauffman EJ, Weisman LS, Klionsky DJ (2003) Yeast homotypic vacuole fusion requires the Ccz1-Mon1 complex during the tethering/docking stage. *J Cell Biol* 163(5): 973-985.
- Wang L, Seeley ES, Wickner W, Merz AJ (2002) Vacuole Fusion at a Ring of Vertex Docking Sites Leaves Membrane Fragments within the Organelle. *cell* 108(3): 357-369
- Wang X, Kumar R, Navarre J, Casanova JE, Goldenring JR (2000) Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by Rab11a and Rab25. *J Biol Chem* 275: 29138-29146.
- Watson H, Bonifacino JS (2007) Direct Binding to Rsp5p Regulates Ubiquitination-independent Vacuolar Transport of Sna3p *Mol Biol Cell*.
- Wegrzyn RD, Bapat K, Newnam GP, Zink AD, Chernoff YO (2001) Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast. *Mol Cell Biol* 21(14): 4656-4669.
- Weimbs T, Low SH, Chapin SJ, Mostov KE, Bucher P et al. (1997) A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3046-3051.
- Wendland B (2001) Round-trip ticket: recycling to the plasma membrane requires RME-1. *Nat Cell Biol* 3: 133-135.
- Wendland B, Emr SD (1998) Pan1p, yeast eps15, functions as a multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis. *J Cell Biol* 141(1): 71-84.
- Wendland B, McCaffery JM, Xiao Q, Emr SD (1996) A novel fluorescence-activated cell sorter-based screen for yeast endocytosis mutants identifies a yeast homologue of mammalian eps15. *J Cell Biol* 135(6Pt1): 1485-1500.
- Whyte JR, Munro S (2002) Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci* 115(Pt 13): 2627-2637.
- Wickner W (2002) Yeast vacuoles and membrane fusion pathways. *EMBO J* 21(6): 1241-1247.
- Wiederkehr A, Avaro S, Prescianotto-Baschong C, Haguenuer-Tsapis R, Riezman H (2000) The F-box protein Rcy1p is involved in endocytic membrane traffic and recycling out of an early endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 149(2): 397-410.
- Worby CA, Dixon JE (2002) Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12): 919-931.
- Wurmser AE, Emr SD (2002) Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy. *J Cell Biol* 158(4): 761-772.
- Wurmser AE, Sato TK, Emr SD (2000) New Component of the Vacuolar Class C-Vps Complex Couples Nucleotide Exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent Docking and Fusion. *The Journal of Cell Biology* 151(3): 551-562.

-Y-

- Yen WL, Legakis JE, Nair U, Klionsky DJ (2007) Atg27 Is Required for Autophagy-dependent Cycling of Atg9. *Mol Biol Cell* 18: 581-593.
- Yokota S, Himeno M, Roth J, Brada D, Kato K (1993) Formation of autophagosomes during degradation of excess peroxysomes induced by di-(2-ethylhexyl)phthalate treatment. II. Immunocytochemical analysis of early and late autophagosomes. *Eur J Cell Biol* 62(2): 372-383.
- Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005) Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Mol Biol Cell* 16(4): 1593-1605.
- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E et al. (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304(5676): 1500-1502.

Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15077-15082.

-Z-

Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 107-117.

Zhou P, Derkatch IL, Liebman SW (2001) The relationship between visible intracellular aggregates that appear after overexpression of Sup35 and the yeast prion-like elements [PSI(+)] and [PIN(+)]. *Mol Microbiol* 39(1): 37-46.

Ziman M, Chuang JS, Schekman RW (1996) Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol Biol Cell* 7(12): 1909-1919.

Annexes