



HAL
open science

Rôle du complexe adaptateur pour la clathrine AP-1 dans le maintien de la polarité épithéliale chez *Caenorhabditis elegans*

Massiullah Shafaq-Zadah

► **To cite this version:**

Massiullah Shafaq-Zadah. Rôle du complexe adaptateur pour la clathrine AP-1 dans le maintien de la polarité épithéliale chez *Caenorhabditis elegans*. Génétique. Université Rennes 1, 2012. Français. NNT : 2012REN1S002 . tel-00683716

HAL Id: tel-00683716

<https://theses.hal.science/tel-00683716>

Submitted on 29 Mar 2012

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.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie – Agro – Santé (VAS)

présentée par

Massiullah SHAFaq-ZADAH

préparée à l'unité de recherche UMR6061 CNRS, IGDR
Institut de Génétique et Développement de Rennes
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Rôle du complexe
adaptateur pour la
clathrine AP-1 dans le
maintien de la
polarité épithéliale
chez *Caenorhabditis
elegans***

**Thèse soutenue à Rennes le 12
Janvier 2012**

devant le jury composé de :

Dr. Roland LE BORGNE

DR2 CNRS
UMR 6061, IGDR, Rennes / *président*

Dr. Alexandre BENMERAH

DR2 INSERM
UMR 8104, Institut Cochin, Paris / *rapporteur*

Dr. Arnaud ÉCHARD

DR2 CNRS
URA 2582, Institut Pasteur, Paris / *rapporteur*

Dr. Michel LABOUESSE

DR1 CNRS
IGBMC, Illkirch / *examinateur*

Dr. Grégoire MICHAUX

CR1 INSERM
UMR 6061, IGDR, Rennes / *directeur de thèse*



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie – Agro – Santé (VAS)

présentée par

Massiullah SHAFQA-ZADAH

préparée à l'unité de recherche UMR6061 CNRS, IGDR
Institut de Génétique et Développement de Rennes
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Rôle du complexe
adaptateur pour la
clathrine AP-1 dans le
maintien de la
polarité épithéliale
chez *Caenorhabditis
elegans***

**Thèse soutenue à Rennes le 12
Janvier 2012**

devant le jury composé de :

Dr. Roland LE BORGNE

DR2 CNRS
UMR 6061, IGDR, Rennes / *président*

Dr. Alexandre BENMERAH

DR2 INSERM
UMR 8104, Institut Cochin, Paris / *rapporteur*

Dr. Arnaud ÉCHARD

DR2 CNRS
URA 2582, Institut Pasteur, Paris / *rapporteur*

Dr. Michel LABOUESSE

DR1 CNRS
IGBMC, Illkirch / *examineur*

Dr. Grégoire MICHAUX

CR1 INSERM
UMR 6061, IGDR, Rennes / *directeur de thèse*

"Un peu de science éloigne de Dieu, beaucoup de science y ramène"

Louis Pasteur

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier mon "papa de thèse" Grégoire Michaux, qui m'a accordé sa confiance depuis mon Master II jusqu'à la fin de ma thèse. Un grand merci également pour m'avoir permis d'assister à de nombreux congrès nationaux et internationaux qui ont été pour moi une source d'épanouissement scientifique (et pour lui financièrement très couteux!). Merci pour tout "Ze Greg Michaux".

Je me dois également de remercier Alex Holmes pour m'avoir permis de progresser en anglais mais aussi pour son aide scientifique, sa bonne humeur et ses éternuements à vous glacer le sang.

Une pensée également pour Raghida Damaj pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Un grand merci à Anne Pacquelet, pour ses conseils, ses critiques pertinentes, la bonne ambiance au laboratoire ainsi que pour avoir apporté une lecture critique de ce manuscrit.

Je voudrais bien sûr remercier Ophélie Nicolle pour sa disponibilité et sa gentillesse. Merci également à Aurélien Perrin pour l'aide apportée au projet et la bonne ambiance de travail lors de ce fameux crible. "Je monte les lames et tu les regardes au SPE". Je n'oublie pas non plus Ghislain Gillard, Clémence Kergourlay, Virginie Vion et tous les stagiaires qui ont fait un passage au laboratoire et avec qui j'ai eu de bonnes relations.

Je remercie Roland Le Borgne ainsi que son équipe pour la très bonne ambiance qui règne dans nos laboratoires ainsi qu'aux échanges scientifiques toujours très pertinents. En particulier un grand merci à Nahhhbila Founounou et Najate Benhra, Mathieu Cotton, Nico "ça mousse, épatant!", Solange et Françoise Vignaux pour leurs conseils scientifiques et Aurore Dussert avec qui j'aurais souhaité échanger plus.

Un très grand merci à Sylvie Lallet et Stéphanie Le Bras qui m'ont apporté leur soutien, leur réconfort : merci pour votre disponibilité et vos conseils au combien précieux (cf. Dieu de la "biomol" sans qui nous ne serions bien peu de choses!).

Je tiens à remercier mes "PAPAs de labo" antérieurs ; Yves Le Dréan avec qui j'ai fais mes premiers pas à la paillasse, disponible, patient et surtout très pédagogue ; Jacek Kubiak, Laurent Richard-Parpaillon et Frank Chesnel qui m'ont très bien encadré et m'ont donné envie de continuer dans la recherche. Je voudrais remercier Aude Pascal et Régis Giet parce que ça me fait plaisir de le faire.

Je tiens à remercier mon ami commis d'office Pierre Romé dit fils de Ragondin. J'ai trouvé en toi des qualités rares de générosité et d'humanité. Ne changes surtout pas l'ami. Tu es juste quelqu'un de bien!

Un grand merci à mes amis Barbara, Marina, Romain, Aurélien qui sont des personnes très chères à mon cœur, vous êtes les meilleurs.

Je remercie également les copains thésards, en particulier Emmanuel Gallaud dont la barbe n'aspire pas vraiment confiance, Leslie Ratié qui se cherche encore capillairement parlant, Marc Gillard et ses bacantes douteuses, Olivier Le Tonquèze que j'estime énormément, Jabbar Khan enfin auprès des siens, Alga Diallo, Benoit Dehapiot un brin insolent, Ariane Mogha, Audrey Valée...

Je remercie bien évidemment le dieu du séquençage Stéphane Dréano ; Gérard Calioni pour sa gentillesse et sa disponibilité, l'indispensable Géraldine Le Provost et tout le personnel de la gestion Hugues, Nadine, Nathalie et Isabelle Poulard dont l'aide est juste essentielle.

Enfin, je remercie mes parents pou leur soutien et pour m'avoir donner l'opportunité de faire des études. Merci également pour m'avoir inculqué des valeurs humaines nécessaires et indispensables. Un grand merci à ma femme pour sa patience et son réconfort au cours de ces années de thèse.

... Mon dernier merci va au nématode *C. elegans*, bien entendu.

"A wassi et Osswa...."

Liste des abréviations _____ **5**

INTRODUCTION _____ **10**

I. De la cellule procaryote à la cellule eucaryote : une compartimentation endomembranaire _____ **12**

- I.1 L'organisation simple d'une cellule procaryote _____ 12
- I.2 La cellule eucaryote présente des compartimentations complexes _____ 14

II. Synthèse et transport des protéines cytosoliques à destinée membranaire _____ **16**

- II.1 Les modifications lipidiques co- ou post-traductionnelles _____ 16
 - II.1.1 Modification des protéines par ajout d'ancre isoprènes _____ 16
 - II.1.2 Modifications lipidiques par ajout d'acide gras saturé _____ 20
 - II.1.3 La glypiation : ajout d'une ancre GPI _____ 24
- II.2 Les domaines protéiques d'association aux phosphoinositides _____ 26
 - II.2.1 Les phosphoinositides et les domaines remarquables _____ 26
 - II.2.2 Les domaines de liaison aux phosphoinositides _____ 27
 - II.2.3 Les domaines non encore caractérisés _____ 30

III. Transport des protéines transmembranaires et des protéines sécrétées. _____ **30**

- III.1 Synthèse et transport des protéines transmembranaires et des protéines sécrétées dans le RE _____ 31
 - III.1.1 Le Réticulum Endoplasmique Lisse _____ 32
 - III.1.2 Le Réticulum Endoplasmique Rugueux _____ 32
 - III.1.3 Reconnaissance et acheminement des protéines vers le RE _____ 34
 - III.1.3.1 « La séquence signal » et le complexe SRP _____ 34
 - III.1.3.2 Le récepteur SR et le processus de translocation _____ 35
- III.2 Fonctions sommaires du Réticulum Endoplasmique Rugueux _____ 35
 - III.2.1 Le RE est le site de la N-glycosylation _____ 35
 - III.2.2 L'ajout des ponts disulfures et de l'ancre GPI se déroule dans le RE _____ 36
- III.3 ERGIC : compartiment intermédiaire RE-Golgi _____ 36
- III.4 L'appareil de Golgi _____ 37
 - III.4.1 Fonctions sommaires du Golgi _____ 37
 - III.4.1.1 Modification protéique par ajout de glucides _____ 37
 - III.4.1.2 L'étiquette Mannose-6-Phosphate _____ 38
 - III.4.1.3 Protéines portant une signature KDEL _____ 38
 - III.4.1.4 Le Golgi est également un site de clivage protéique _____ 38
- III.5 Mécanismes de communication entre le RE et le Golgi _____ 40
 - III.5.1 Le transport antérograde _____ 40
 - III.5.2 Le transport rétrograde _____ 44
- III.6 Le trafic post-Golgi _____ 46
 - III.6.1 Le trafic post-Golgi COP-I dépendant _____ 46
 - III.6.2 Le trafic post-Golgi clathrine dépendant _____ 46
 - III.6.2.1 Conformation structurale de la clathrine _____ 48
 - III.6.2.2 Formation de la vésicule à clathrine _____ 48
 - III.6.2.3 Scission de la vésicule _____ 50
 - III.6.2.4 Processus de « désassemblage » et motilité de la vésicule _____ 50
 - III.6.3 Arrimage des vésicules sur la membrane cible _____ 52
 - III.6.3.1 Les Rab-GTPases : des éléments clés du trafic vésiculaire _____ 52
 - III.6.3.2 Attachement et fusion de la vésicule sur la membrane receveuse _____ 54
 - III.6.4 Les complexes adaptateurs pour la clathrine _____ 56
 - III.6.4.1 Les adaptateurs monomériques _____ 56
 - III.6.4.2 Les adaptateurs multimériques : les complexes APs _____ 58

III.6.4.3	Sélection des protéines cargos	61
III.6.5	Fonctions non exhaustives des complexes APs	62
III.6.5.1	AP-2 est impliqué dans l'endocytose à la membrane plasmique	62
III.6.5.2	AP-3 est impliqué dans le trafic entre le TGN et les endo-lysosomes	63
III.6.5.3	AP-4 : Trafic vers les endosomes et transport polarisé	64
III.7	Fonctions connues du complexe AP-1	65
III.7.1	AP-1 est un complexe essentiel au développement des organismes modèles	65
III.7.2	AP-1 assure le transport de protéines lysosomales ou assimilées	66
III.7.2.1	Le Récepteur au mannose-6-Phosphate est un « célèbre cargo » d'AP-1	66
III.7.2.2	La protéine Lerp joue le rôle du MPR chez la drosophile	66
III.7.2.3	Transport vers le lysosome indépendant de MPR/Lerp	66
III.7.2.4	Transport de cargos vers le mélanosome	67
III.7.3	AP-1 est impliqué dans la biogenèse de granules denses de sécrétion	67
III.7.3.1	Formation des « Weibel-Palade Bodies » dans les cellules endothéliales	67
III.7.3.2	Formation des « Glue Granules » chez la drosophile	68
III.7.3.3	Incorporation d'un cargo dans les granules matures de sécrétion	68
III.7.3.4	AP-1 et les granules de sécrétion immatures	68
III.7.4	Fonction polarisée d'AP-1 dans le tissu neuronal	69
III.7.5	Fonction d'AP-1 dans la polarisation du tissu épithélial	70
III.7.6	L'implication d'AP-1 dans les maladies	72
IV.	Relation étroite entre le trafic membranaire et la polarité épithéliale	74
IV.1	Les cellules polarisées	74
IV.2	Les différents modules contrôlant la polarité épithéliale	76
IV.2.1	Le module Par3/Par6/aPKC	76
IV.2.1.1	Le module Par régule la polarité	78
IV.2.1.2	Le module apical Par3/Par6/aPKC se lie à Cdc42 pour réguler la polarité	78
IV.2.1.3	Maintien du module Par antérieur	79
IV.2.2	Le module Crb/Pals1/Patj recrute le complexe Par antérieur	80
IV.2.2.1	Le complexe apical Crb/Pals1/Patj	81
IV.2.2.2	Interdépendance entre le module Par et le module Crumbs	83
IV.2.3	Le module basolatéral Scribble/Disc Large/Lgl	84
IV.3	Les lipides présentent également une localisation polarisée	85
IV.4	Les jonctions cellulaires	88
IV.4.1	Généralités sur les jonctions cellulaires chez les vertébrés et les invertébrés	88
IV.4.2	Rôle du trafic dans la formation des jonctions d'adhérence	89
IV.4.3	Formation des jonctions chez <i>C. elegans</i> et implication du complexe Par	90
IV.5	Les complexes de polarité sont impliqués dans les cancers	93
IV.6	Trafic membranaire et polarité : une étroite relation	94
IV.6.1	Trafic apico-basal	95
IV.6.1.1	Le trafic basolatéral	95
IV.6.1.2	Le transport apical	96
IV.6.2	Lien entre trafic et localisation des déterminants de polarité	99
IV.6.3	Les déterminants de polarité contrôlent le trafic intracellulaire	100
V.	Déterminants de polarité dans la formation de lumière	101
V.1	Modèles de luminogénèse	101
V.2	Formation de lumière <i>in vitro</i>	104
V.3	Formation de lumière dans un contexte physiologique et pathologique	105
VI.	Modèle de travail : le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	106
VI.1	Présentation générale du nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	108
VI.2	Le cycle de développement du ver	108
VI.2.1	Le développement embryonnaire	110
VI.2.2	Le développement larvaire	110

VI.3	Description sommaire du tissu épithélial de l'intestin et de l'épiderme	112
VI.3.1	Le tissu intestinal	112
VI.3.2	Le tissu épidermal ou « l'hypoderme » chez <i>C. elegans</i>	112
OBJECTIFS PRINCIPAUX DE LA THÈSE		113
MATÉRIELS ET MÉTHODES		115
I.	Culture de <i>C. elegans</i>	116
II.	Inactivation de gènes	116
II.1	L'ARN interférence chez <i>C. elegans</i>	116
II.1.1	RNAi par injection	116
II.1.2	RNAi par ingestion ou "feeding"	117
II.1.3	Inhibition du complexe AP-1 par RNAi	117
II.2	Mutants de délétion	118
II.2.1	Principe	118
II.2.2	Les mutants <i>aps-1</i> et <i>apg-1</i>	118
III.	Immuno-marquage des embryons	118
IV.	Transgénèse	119
IV.1	Obtention du transgène par PCR fusion	119
IV.2	Obtention du transgène par construction de plasmide	119
IV.3	Injection du transgène dans l'organisme	120
V.	Analyse des phénotypes	120
RÉSULTATS		121
I.	Le complexe adaptateur pour la clathrine AP-1 est requis pour le maintien de la polarité apico-basale chez <i>C. elegans</i>	122
I.1	Objectifs de l'article	122
I.2	Résultats majeurs	122
II.	AP-1 est requis pour l'adhésion des cellules épithéliales de l'épiderme chez <i>C. elegans</i> .	124
II.1	Objectifs de l'article	124
II.2	Résultats majeurs	124
DISCUSSION		127
I.	AP-1 contrôle le tri apical	128
II.	AP-1 régule la localisation apicale de PAR-6 et CDC-42	130
III.	Mécanisme du tri apical	131
IV.	L'inhibition d'AP-1 induit la formation de lumières ectopiques	134
V.	AP-1 est impliqué dans le maintien de l'adhésion cellulaire : cause de létalité ?	136
VI.	Conclusion	141
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		144

Tables des figures

Figure 1 : La classification des êtres vivants	11
Figure 2 : La cellule procaryote	11
Figure 3 : La cellule eucaryote, une organisation interne complexe	13
Figure 4 : Les modifications lipidiques des protéines cytosoliques	15
Figure 5 : L'isoprénylation et la réaction de post-prénylation	17
Figure 6 : La réaction de post-prénylation, cas des protéines Ras	19
Figure 7 : La palmitoylation et le trafic vésiculaire	21
Figure 8 : La glypiation ou l'ajout d'une ancre GPI	23
Figure 9 : Les domaines d'interaction directe avec la membrane lipidique	25
Figure 10 : La voie de sécrétion ou le trafic membranaire : expérience de Palade	29
Figure 11 : Adressage d'une protéine à la membrane du RE	33
Figure 12 : Vue d'ensemble du transport entre le RE et le Golgi	39
Figure 13 : Formation de vésicule à manteau COP-II	41
Figure 14 : Le complexe COP-I	43
Figure 15 : Vue d'ensemble du trafic post-Golgi	45
Figure 16 : Conformation de la « cage » de clathrine	47
Figure 17 : Formation d'une vésicule à clathrine	49
Figure 18 : Les protéines Rabs sont essentielles au trafic vésiculaire	51
Figure 19 : Le complexe SNARE	53
Figure 20 : Structure de l'adaptateur monomérique GGA	55
Figure 21 : Structure hétérotétramérique des complexes APs	59
Figure 22 : Les cellules polarisées et les déterminants de polarité	73
Figure 23 : Les modules contrôlant la polarité épithéliale	75
Figure 24 : Localisation des modules de polarité dans l'épithélium	77
Figure 25 : Les jonctions cellulaires	87
Figure 26 : Formation des jonctions épithéliales chez <i>C. elegans</i>	91
Figure 27 : Modèles pour la formation de lumière	103
Figure 28 : Cycle de développement de <i>C. elegans</i>	107
Figure 29 : Le système reproducteur auto-fécond de l'hermaphrodite	109
Figure 30 : Le tissu épithélial de l'intestin	111
Figure 31 : AP-1 contrôle la formation des lumières	133
Figure 32 : Maintien de l'adhésion cellulaire	137
Figure 33 : Modèle pour AP-1 dans le tri apical	142

Liste des abréviations

ADN	: Acide D éoxyribo N ucléique
ACR-16	: Acetyl C holine R eceptor-16
AJM-1	: Apical J unction M olecule-1
AP	: Adaptor P rotein (ou A ssembly P olypeptide)
aPKC	: atypical P rotein K inase C
Arf	: ADP-ribosylation factor related
ARN	: Acide R ibo N ucléique
ARNdb	: Acide R ibo N ucléique d ouble b rin
ARNm	: Acide R ibo N ucléique m essenger
Arp2/3	: Actin related p rotein 2/3
ATP	: Adenosine T ri P hosphate
CaCo-2	: Colorectal a deno C arcinoma-2 cells
CAM-1	: C An cell M igration defective (Récepteur tyrosine kinase)
CDMPR	: Cation D ependant M annose-6- P hosphate R eceptor
CeAJ	: <i>C. elegans</i> Apical J unction
CHE-14	: abnormal C H E motaxis-14
CHO	: Chinese H amster O vary
CIMPR	: Cation I ndependant M annose-6- P hosphate R eceptor
COP	: C Oatmer P rotein
CUP-5	: Coelomocyte U Ptake defective-5
DIC	: Differential Interference Contrast microscopy
DLG	: Disc- L ar G e
FYVE	: Fab1p Yotb Vac1p E EA1 domain
PH	: Pleckstrin H omology
PX	: Phagocyte N ADPH o Xidase
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EAT-20	: E A T ing : pompe pharyngal anormal

EEA1	: Early Endosome Antigen1
EGF	: Epidermal Growth Factor
ERAD	: ER-Associated-Degradation
ERGIC	: ER-Golgi Intermediate Compartment
ERM-1	: Ezrin/Radixin/Moesin-1
FTase	: FarnesylTransferase
GAE	: Gamma Adaptin Ear
GAP	: GTPase Activating Protein
GDI	: GDP-Dissociation Inhibitor
GDP	: Guanosine DiPhosphate
GEF	: Guanine Exchange Factor
GFP	: Green Fluorescent Protein
GGA	: Golgi-localised, Gamma adaptin-ear-containing, Arf-binding
GLR-1	: GLutamate Receptor family-1
GPI	: GlycosylPhosphatidylinositol
GSL	: GlycoSphingoLipid
HA	: HemAgglutinine
HMP-1	: HuMPback
HMR-1	: HaMmeRhead embryonic lethal
HPS	: Hermansky Pudlak Syndrome
HSP	: Heat Shock Protein
Icmt	: Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase
IFB-2	: Intermediate Filament B-2
ISG	: Immature Secretory Granule
LAMP-1	: Lysosomal-Associated Membrane Protein-1
LDL	: Low Density Lipoprotein
LGL	: Lethal Giant Larvae
LRO	: Lysosome Related Organelle
MDCK	: Madin-Darby Canine Kidney

MEDNIK	: M ental retardation, E nteropathy, D eafness, peripheral N euroopathy, I chthyosis, and K eratoderma
MID	: M icrovillus I nclusion D isease
MPR	: M annose 6- P hosphate R eceptor
MVB	: M ulti V esicular B ody
MYO5B	: M YOsine 5B
NGM	: N ematode G rowth M edium
NMT	: N - M yristoyl- T ransferase
NMY-2	: N on-muscular M Yosine- 2
ODR-10	: O Dorant R eceptor- 10
OPT-2	: O ligo P eptide T ransporter- 2
PAR	: P ARtitioning defective
PAT	: P almitoyl A cyl T ransferase
PDI	: P rotein D isulfure I somerase
PDZ	: P SD95 D lg1 Z o-1 domain
PIP2	: P hosphatidyl I nositide 4,5 bi P hosphate
PIP3	: P hosphatidyl I nositide 3,4,5 tri P hosphate
PLC	: P hospho L ipase C
PPT	: P almitoyl P rotein T hioesterase
PtdIns	: P hosphatidyl I nositide
Rab	: R as-related proteins in b rain
Rce1	: R as-converting enzyme 1
RE	: R éticulum E ndoplasmique
REL	: R éticulum E ndoplasmique L isse
REP	: R ab E scort P roteins
RER	: R éticulum E ndoplasmique R ugueux
RGGTase	: R ab G eranyl G eranyl T ransferase
RME-1	: R eceptor M ediated E ndocytosis- 1
RNAi	: R NA interference
RTK	: R eceptor T yrosine K inase

Scrib	: S cribble
SNAP	: SyNaptosomal-Associated P rotein
SNB-1	: SyNapto B revin-1
SNG-1	: SyNapto G yrin-1
SR	: S RP R eceptor
SRP	: Signal R ecognition P article
SV40	: Simian V irus 40
t-SNARE	: target- S oluble NSF Attachment protein R eceptor
TfnR	: T ransferin R eceptor
TGN	: T rans- G olgi N etwork
TSG	: T umor S uppressor G ene
Tyrp1	: T yrosinase-related p rotein 1
v-SNARE	: vesicle- S oluble NSF Attachment Protein R eceptor
VAC	: V acuolar A pical C ompartment
VHS	: V ps27p H rs S TAM domain
VIH	: V irus de l' I mmunodéficience H umaine
VPS	: V acuolar P rotein S orting
VSV	: V esicular S tomatite V irus
VWF	: V on W illebrand F actor
WASP	: W iskott– A ldrich S yndrome P rotein
WPB	: W eibel P alade B ody
YP170	: Y olk P rotein 170
ZA	: Z onula A dherens

PRÉAMBULE

Au cours de cette introduction, je présenterai la compartimentation d'une cellule eucaryote et comment les dits compartiments communiquent entre eux. Je ferai un court paragraphe sur la synthèse et l'acheminement des protéines cytosoliques ; précisant ainsi que des motifs signalétiques existent et contrôlent le transport de ces protéines cytosoliques vers les organites cibles tels que le noyau ou la mitochondrie. Ces protéines cytosoliques peuvent également s'associer avec des membranes lipidiques grâce à des modifications co- ou post-traductionnelles.

J'aborderai également la synthèse et le transport des protéines transmembranaires et sécrétées depuis le réticulum endoplasmique vers le Golgi et depuis le Golgi vers les compartiments membranaires cibles. C'est le processus du trafic intracellulaire : la fonction des différents compartiments du trafic membranaire sera détaillée dans ce chapitre. Je présenterai ensuite les complexes adaptateur pour la clathrine AP et en particulier le complexe AP-1 largement impliqué dans le transport vésiculaire post-Golgi. Les fonctions documentées d'AP-1, qui fait l'objet de cette étude, seront citées.

La polarité épithéliale est le second aspect abordé dans cette étude. Je présenterai les différents modules protéiques contrôlant cette polarité ainsi que la relation qui existe entre le trafic membranaire et la polarité épithéliale.

Une partie sera consacrée au rôle des déterminants de polarité et du trafic membranaire dans la genèse d'une lumière dans un système de cellule en kyste ou *in vivo* dans un organisme vivant.

Je ferai enfin une brève introduction sur notre modèle *C. elegans*.

INTRODUCTION

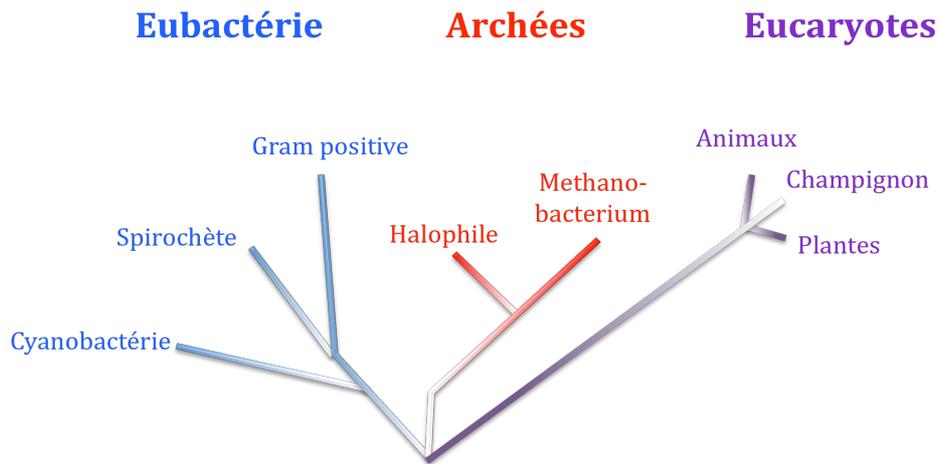


Figure 1 : La classification des êtres vivants

Représentation très simplifiée de la classification des êtres vivants selon Carl Woese. Cette classification représente les trois empires d'après les comparaisons de séquences nucléotidiques de l'ARN 16S de la petite sous-unité du ribosome. Ces empires sont formés par les Archées, les Eubactéries et les Eucaryotes. Noter que les Archées et les Eubactéries sont également regroupées sous le terme de procaryotes (Gribaldo et al., 2010).

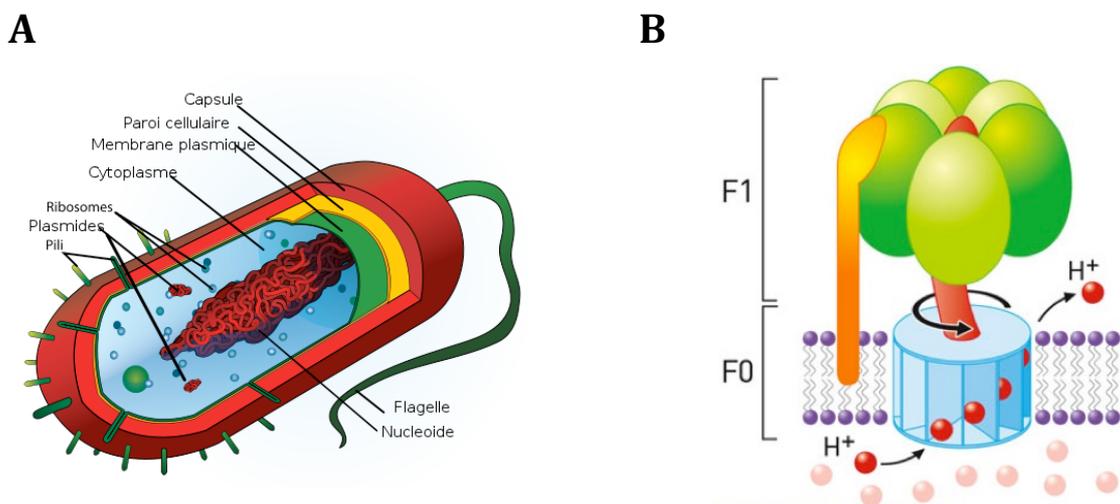


Figure 2 : La cellule procaryote

A) Représentation schématique d'une cellule procaryote : la bactérie présente une organisation interne simple dans lequel le matériel génétique se trouve libre dans le cytosol. Aucune compartimentation membranaire interne n'est présente. Les seuls organites que l'on trouve dans le cytosol sont les ribosomes nécessaires à la synthèse des protéines. B) Exemple d'une protéine essentielle à la production d'énergie : l'ATP synthase insérée dans la membrane plasmique de la bactérie. (Dittrich et al., 2004)

I. De la cellule procaryote à la cellule eucaryote : une compartimentation endomembranaire

I.1 L'organisation simple d'une cellule procaryote

Au cours de l'évolution, les cellules n'ont cessé de se complexifier, ceci afin de diversifier et de spécifier leurs fonctions biologiques. A l'origine, les procaryotes, « pro » du grec avant et « caryon » pour noyau, représentent les êtres vivants unicellulaires simples dont la structure cellulaire ne comporte pas de noyaux (Figure 1). Cet empire est représenté par les Archées et les Eubactéries (« eu » du grec pour vrai) dans lesquelles on ne trouve aucune compartimentation intracellulaire. Ici, l'information génétique portée par une ou plusieurs molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) linéaire ou circulaire « baigne » sous forme libre dans le cytosol (Figure 2). L'ADN bactérien se présente très souvent sous forme circulaire appelé « nucléoïde » et on ne trouve aucun cloisonnement cytoplasmique (Figure 2A). Le cytosol chez les procaryotes est dépourvu de cytosquelette et une absence de flux cytoplasmique de type exocytose ou endocytose. Les organites qu'on trouve essentiellement dans le cytoplasme d'une cellule procaryote sont les ribosomes en étroite contact avec le matériel génétique (Figure 2A).

Le cytoplasme est, quant à lui, entouré par une membrane constituée d'une bicouche de phosphoglycérolipides mais totalement dépourvue de stérols. La membrane des procaryotes possède des fonctions biologiques essentielles : la présence de protéines membranaires spécifiques permet notamment de réguler le passage de divers molécules et ions tels que le sodium, le potassium, les sucres, les acides aminés ou encore les petits peptides. La membrane contrôle ainsi les échanges avec le milieu extérieur.

De plus, la présence de complexes protéiques spécialisés tel que l'ATP synthase permet par un flux de protons, de produire l'énergie sous forme d'ATP, nécessaire au métabolisme de la cellule (Figure 2B). La membrane remplit donc une fonction de type « mitochondrie » dont la cellule procaryote est dépourvue, ce qui est en accord avec la théorie endosymbiotique selon laquelle la mitochondrie résulte de l'endocytose d'une cellule procaryote.

Enfin, une épaisse paroi enveloppe la cellule procaryote et lui confère sa forme et sa résistance.

Cette absence de compartiments internes spécialisés dans une tâche donnée, réduit considérablement les capacités fonctionnelles de la cellule par rapport à une cellule eucaryote

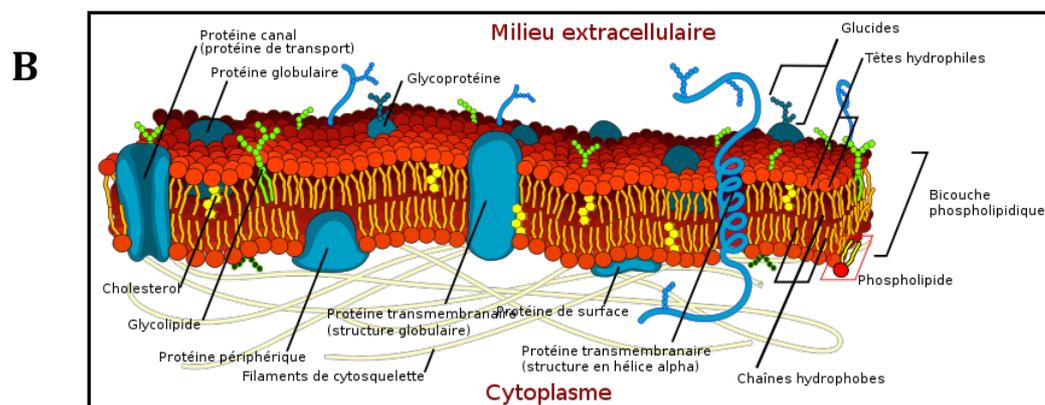
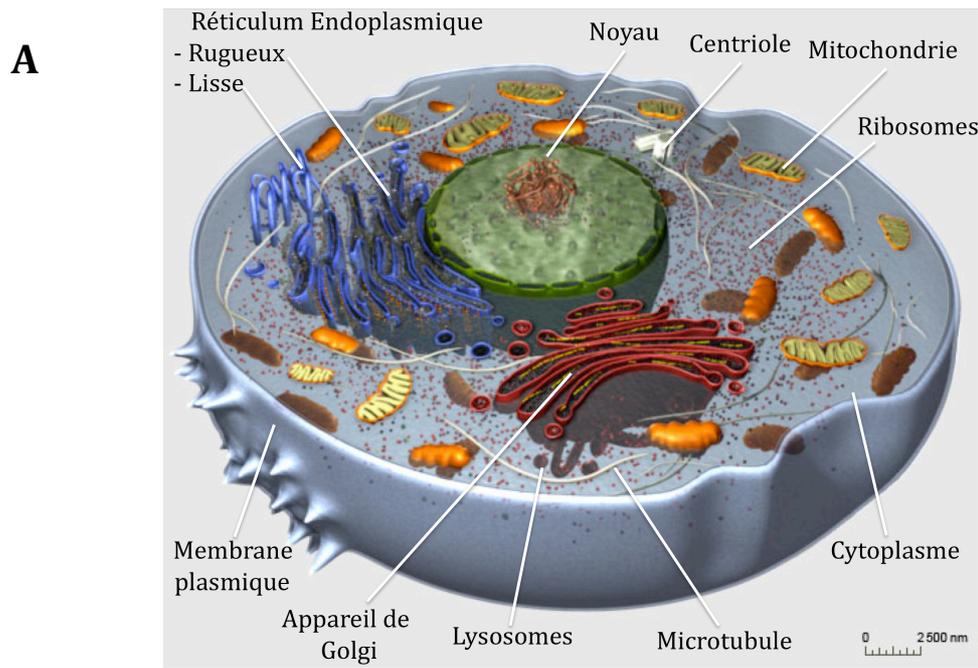


Figure 3 : La cellule eucaryote, une organisation interne complexe

A) Représentation schématique d'une cellule eucaryote. Ce qui fait la particularité de cette cellule, c'est la présence d'un noyau dans lequel se trouve le matériel génétique. La cellule présente de nombreuses structures membranaires dans le cytoplasme assurant toutes des fonctions très spécifiques. Dans la cellule procaryote beaucoup d'événements se déroulent dans la membrane plasmique, la cellule eucaryote a, elle, spécialisé des organites pour une fonction donnée. Notons la présence du Réticulum Endoplasmique et de l'appareil de Golgi essentiels pour la voie de sécrétion (<http://www.ccdmd.qc.ca/ri/cellule/>). **B)** Structure de la membrane plasmique d'une cellule eucaryote. Elle est formée par une bicouche lipidique qui correspond à deux feuilletts de phospholipides. La particularité de cette bicouche lipidique réside dans la présence du cholestérol, absent dans la membrane des procaryotes (http://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_%28biologie%29)

beaucoup plus complexe. Ce système est donc clairement un frein pour la diversification et l'acquisition de nouvelles fonctionnalités. Néanmoins, les capacités d'adaptation et d'évolutions rapides des procaryotes ont permis leur survie à travers les âges (Lenski R.E., 2004).

I.2 La cellule eucaryote présente des compartimentations complexes

Les cellules eucaryotes (« eu » du grec vrai et « caryon » noyau) désignent les cellules possédant un « véritable noyau » dans lequel se trouve le matériel génétique. Ce noyau est entouré par une enveloppe nucléaire complexe avec de nombreux pores nucléaires qui permettent les échanges dynamiques entre le cytoplasme et le noyau. Outre ce noyau, la cellule eucaryote se complexifie en présentant de nombreux compartiments membranaires spécialisés tels que la mitochondrie pour la production d'énergie, le réticulum endoplasmique pour la synthèse protéique, l'appareil de Golgi concernant les processus de maturation ou les lysosomes pour la dégradation protéique (Figure 3A).

Afin d'assurer une bonne cohésion entre ces différents compartiments membranaires, il est nécessaire d'établir une bonne communication grâce à un acheminement correct de protéines et de lipides. Ce transport se fait grâce à des motifs signalétiques portés par lesdites protéines. De plus, contrairement aux cellules procaryotes, les cellules eucaryotes possèdent un cytosquelette formé notamment par un réseau de microtubules et d'actine qui quadrille la cellule. Ce cytosquelette régule par exemple la forme et la motilité de la cellule et est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que la mitose, la cytodierèse et servent de « rails » pour l'acheminement d'ARN, de protéines et de lipides. Le cytosquelette sert de support d'ancrage pour le trafic vésiculaire à travers les processus d'endocytose et de sécrétion que je détaillerai ultérieurement. Enfin, la cellule eucaryote est enveloppée par une bicouche phospholipidique fluide, riche en glycolipides, glycoprotéines, protéines transmembranaires et en particulier en cholestérol que l'on ne trouve pas dans une cellule procaryote (Figure 3B). Ainsi, la cellule eucaryote est caractérisée par différents compartiments membranaires localisés dans le cytoplasme, possédant des fonctions bien spécifiques, indispensables à l'homéostasie cellulaire. Pour permettre un transport protéique et lipidique contrôlé et spécifique entre ces différents organites, il existe des signaux d'adressage très précis ainsi qu'un trafic tubulo-vésiculaire très dynamique au sein de la cellule.

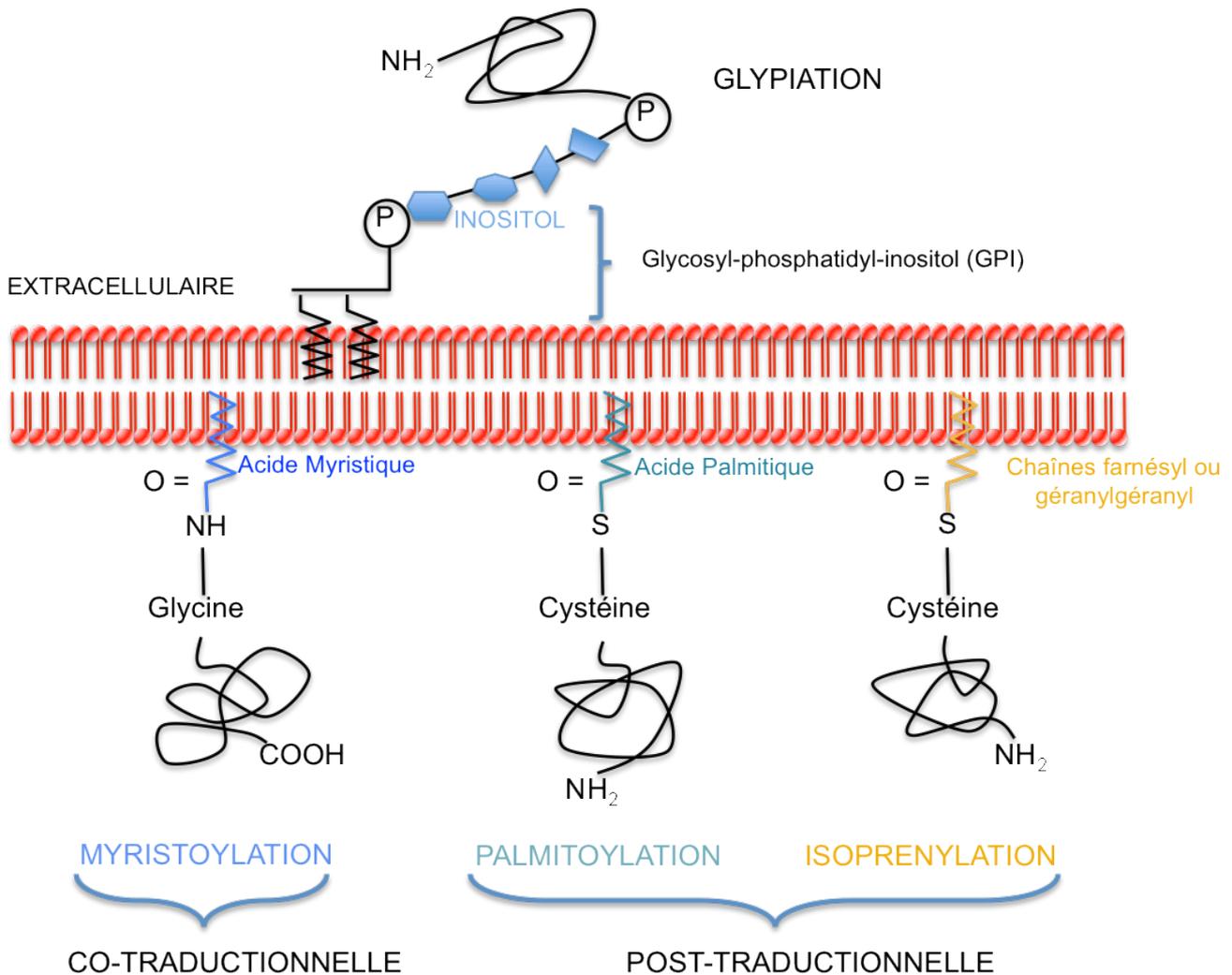


Figure 4 : Les modifications lipidiques des protéines cytosoliques

Les protéines cytosoliques qui se localisent au niveau d'une membrane nécessitent une modification lipidique, afin de permettre une insertion de celles-ci dans une bicouche lipidique. Différents types de modifications lipidiques sont schématisés dans cette figure tels que l'isoprénylation, la palmitoylation, la myristoylation ou encore l'ajout de l'ancrage GPI. Ces modifications permettent de rendre la protéine hydrophobe, capable de s'associer avec des lipides.

Il faut cependant distinguer deux types d'acheminement des protéines selon la nature de celle-ci. En effet, une protéine cytosolique sera acheminée différemment d'une protéine transmembranaire ou sécrétée (Figure 4). J'aborderai ces différences dans les deux grands chapitres qui vont suivre.

II. Synthèse et transport des protéines cytosoliques à destinée membranaire

II.1 Les modifications lipidiques co- ou post-traductionnelles

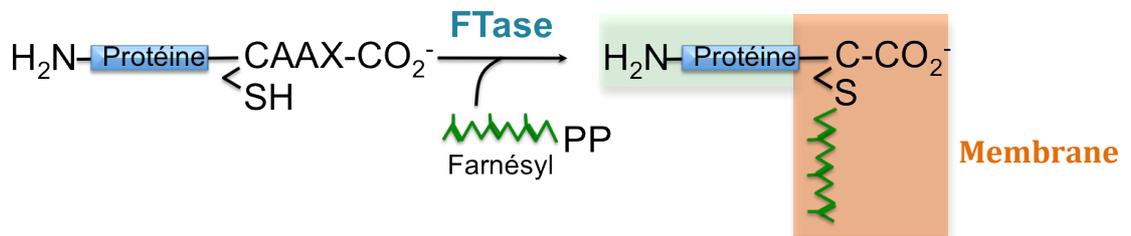
Des protéines cytosoliques peuvent également être adressées aux membranes bien qu'elles ne soient pas transmembranaires. Ces protéines se localisent aussi bien sur la membrane plasmique que sur les vésicules ou encore sur les endosomes. Toutes ces protéines modifiées, à l'exception des protéines à ancre GPI, se situent sur la face cytoplasmique de ces compartiments membranaires. Différents signaux ou modifications post-traductionnelles permettent la localisation membranaire des protéines cytosoliques (Figure 5).

II.1.1 Modification des protéines par ajout d'ancre isoprènes

Il existe des protéines traduites dans le cytosol sur des ribosomes libres qui sont ensuite destinées à une localisation membranaire. Or, ces protéines sont hydrophiles et nécessitent une modification co- ou post-traductionnelle pour les rendre hydrophobes et faciliter leur ancrage à la membrane lipidique. L'isoprénylation concerne une classe de protéines qui présentent un domaine « CAAX » où C correspond à une Cystéine, A à des acides aminés aliphatiques et X pour n'importe quel acide aminé. Cette séquence consensus CAAX servira pour la modification lipidique appelée prénylation, créant ainsi un domaine hydrophobe qui permet l'association de la protéine avec des membranes. La prénylation consiste à l'attachement à travers une liaison thioester, d'un groupe isoprénoïde C15-farnésyl ou C20-géranylgéranyl sur un résidu Cystéine en position C-terminale. Cette réaction est irréversible.

Comme exemple de protéines cytosoliques régulées par cette modification lipidique, nous pouvons notamment citer les petites GTPases des familles Rab ou Rho (Michaelson et al., 2005 ; Preising and Ayuso, 2004). Ces petites protéines GTPase Rab sont des protéines solubles dont l'activité est dépendante de leur association avec la face cytoplasmique des

A



B

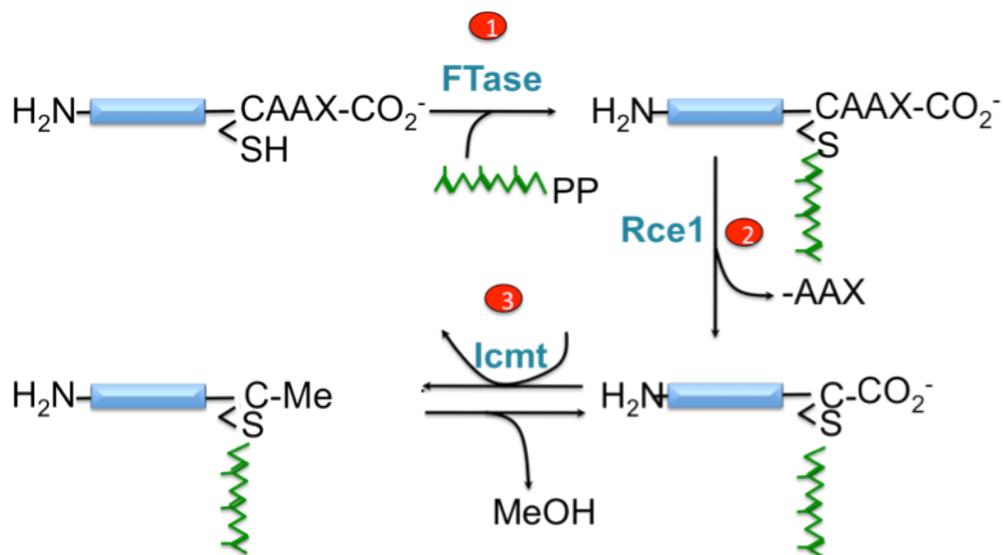


Figure 5 : L'isoprénylation et la réaction de post-prénylation

A) Isoprénylation. Les protéines prénylées débutent leur synthèse dans le cytosol. Elles deviennent ensuite des substrats pour l'enzyme FarnesylTransferase (FTase) qui va catalyser l'ajout d'un groupe isoprène C15-farnésyl sur une Cystéine en position C-terminale. CAAX représente le site consensus nécessaire pour ce type de modification. Cet ajout de groupement farnésyl est suffisant pour insérer la protéine soluble dans la bicouche lipidique (encadré orange). B) Post-prénylation. Certaines protéines telles que Ras nécessitent en plus une réaction de post-prénylation pour s'ancrer à une membrane. Lorsque la protéine est farnésylée (1), elle va être reconnue par l'enzyme Rce qui va cliver le domaine AAX (2). La protéine ainsi générée va être reconnue par l'enzyme Icmt (3) qui va catalyser une réaction de méthylestérification.

compartiments membranaires (Endosomes, Golgi, Lysosomes) (Pfeffer, 1994). Cette association est permise grâce à l'addition du groupe géranylgeranyl catalysée par l'enzyme de transfert Rab GeranylGeranyl Transferase (RGGTase) sur des cystéines en C-terminale. Une fois que la modification est achevée, la protéine alors « géranylée » va être en mesure de s'associer avec la membrane cible (Preising and Ayuso, 2004).

Le cas des protéines Ras est un peu plus complexe. Le génome des mammifères contient trois gènes Ras qui donnent quatre protéines : N-Ras, H-Ras, K-Ras et K-Ras4B. Toutes ces protéines sont cytosoliques et nécessitent un acheminement à la membrane plasmique pour assurer leurs fonctions (Michaelson et al., 2005). Il a été montré que l'extrémité C-terminale des protéines Ras est responsable de l'interaction avec la membrane plasmique.

Les protéines RAS sont traduites dans le cytosol sur des polysomes libres. Immédiatement, elles deviennent des substrats pour l'enzyme FarnesylTransferase (FTase) qui va catalyser l'ajout d'un groupe isoprène C15-farnésyl en C-terminale (Figure 5A). Cependant, concernant les protéines Ras, la seule réaction de prénylation par l'ajout de farnésyl n'est pas suffisante pour adresser correctement ces protéines à la membrane plasmique. En effet, une modification supplémentaire est requise et est regroupée sous le terme de modification post-prénylation.

Cette première modification de prénylation va permettre le transport des protéines Ras vers le réticulum endoplasmique (RE). A ce niveau, les protéines vont subir, selon leur nature, plusieurs étapes de modifications dans les compartiments endomembranaires du RE et du Golgi (Goodwin et al., 2005). Ainsi, dans le RE, l'endoprotéase Rce1 va cliver le fragment AAX du domaine CAAX puis la nouvelle extrémité C-terminale ainsi générée devient un substrat pour une carboxyl méthyltransferase Icmt (Figure 5B). Les deux enzymes nécessaires à la modification post-prénylation, Rce1 et Icmt se trouvent exclusivement dans le RE (Goodwin et al., 2005). Cette post-prénylation est indispensable pour localiser correctement Ras à la membrane plasmique. En effet, en l'absence de l'enzyme Icmt, les protéines Ras s'accumulent dans le cytoplasme (Goodwin et al., 2005). Cependant, les modifications décrites précédemment sont nécessaires mais pas suffisantes pour adresser correctement ces protéines à la bicouche phospholipidique. Un second signal situé en amont du domaine CAAX est également nécessaire (Goodwin et al., 2005)

Ces études démontrent que les voies membranaires empruntées par les différentes protéines Ras pour se localiser à la membrane plasmique diffèrent selon la nature du second signal porté par ces protéines. En effet, les protéines palmitoylées N-Ras et H-Ras sont transportées par le trafic intracellulaire à travers une voie vésiculaire avec des caractéristiques de la voie

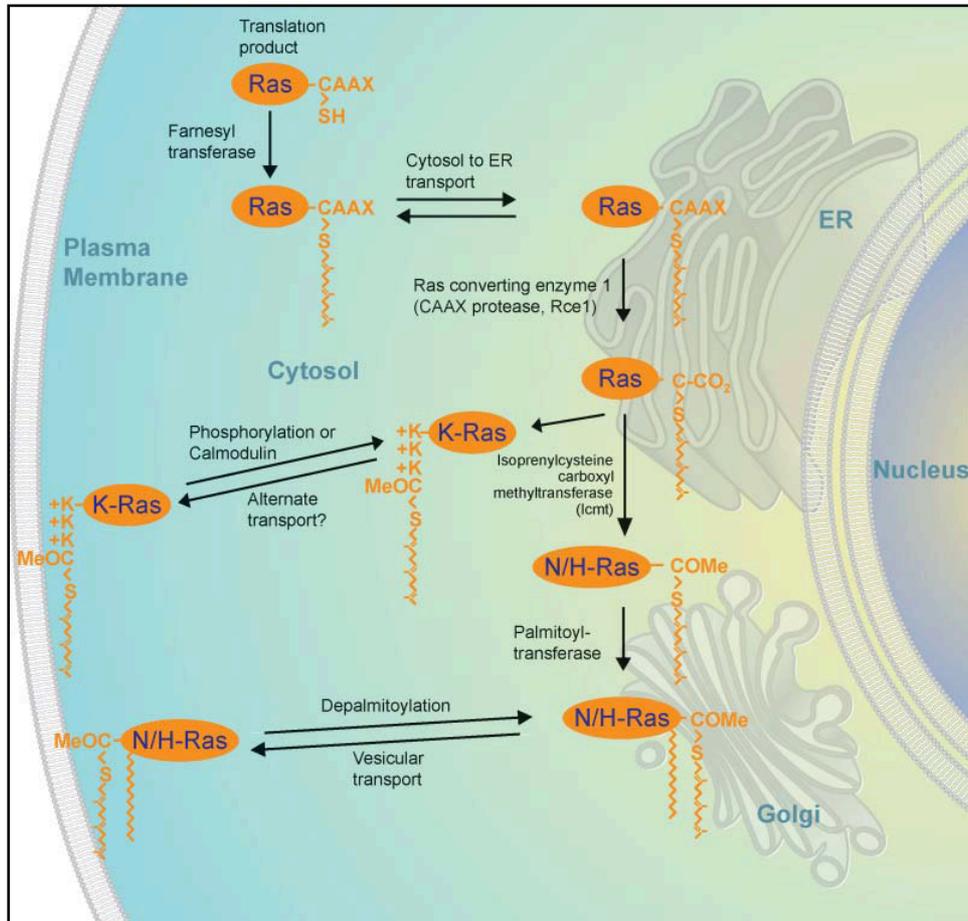


Figure 6 : La réaction de post-prénylation, cas des protéines Ras

Il existe différents types d'acheminement des protéines Ras vers la membrane plasmique. Concernant la protéine K-Ras, une fois farnésylée dans le cytosol, elle est transportée vers le RE où elle subira une réaction de post-prénylation. C'est sous cette forme farnésyl-méthylée qu'elle quitte le RE pour être transportée vers la membrane plasmique. Quant à N- et H-Ras, elles poursuivent leur voyage dans le Golgi, où elles subissent une deuxième modification postraductionnelle, une palmitoylation, catalysée par une palmitoyl-transférase. C'est sous cette forme farnésylée et palmitoylée que ces deux protéines quittent le Golgi et sont transportées vers la membrane plasmique grâce à un transport vésiculaire (Figure d'après Wright and Philips, 2006).

de sécrétion classique (Goodwin et al., 2005 ; Rocks et al., 2005). Tandis que la protéine K-Ras qui possède une région polybasique, emprunte quant à elle une voie alternative qui reste à caractériser (Figure 6). Les protéines destinées à la palmitoylation sont localisées dans le pré-Golgi, précisément dans le compartiment intermédiaire ERGIC dans lequel se trouve l'enzyme Palmitoyl Transférase contenant un domaine consensus appelé DHHC pour D=Aspartate, H=Histidine et C=Cystéine (Greaves et al., 2009 ; Ohno et al., 2006).

Ensemble, ces résultats indiquent de façon très intéressante que des protéines normalement cytosoliques sont capables de s'associer à des compartiments endomembranaires et à la membrane plasmique.

II.1.2 Modifications lipidiques par ajout d'acide gras saturé

D'autres protéines sont également post-traductionnellement modifiées par un ajout d'acide gras saturé tel que l'addition d'un palmitate ou d'un myristate.

La myristoylation est une modification principalement co-traductionnelle, irréversible, qui correspond à l'ajout d'un acide myristique, sous forme de myristoyl-CoA, sur l'acide aminé Glycine en position N-terminale (Boutin, 1997). L'enzyme qui catalyse cette réaction s'appelle la N-Myristoyl-Transférase (NMT) (Zha et al., 2000). Cette enzyme se trouve majoritairement dans le cytoplasme mais une proportion membranaire non négligeable est également observée au niveau du réticulum endoplasmique dans les cellules HeLa (Zha et al., 2000). Ce type de modification concerne par exemple de nombreuses enzymes telles que la protéine kinase A, la protéine kinase G, la NADH-cytochrome b5 réductase ou les GTPases Arfs.

La S-palmitoylation est la modification post-traductionnelle qui ajoute un acide palmitique sur une cystéine interne, à travers une liaison thioester. On peut également trouver une N-palmitoylation dans laquelle l'acide palmitique est ajouté sur une cystéine en position N-terminale, à travers une liaison amide. Ces réactions de palmitoylation sont réversibles et catalysées par l'enzyme Palmitoyl Acyl Transférase (PAT). Du fait de la réversibilité de cette réaction, la palmitoylation est un processus dynamique qui implique des cycles de

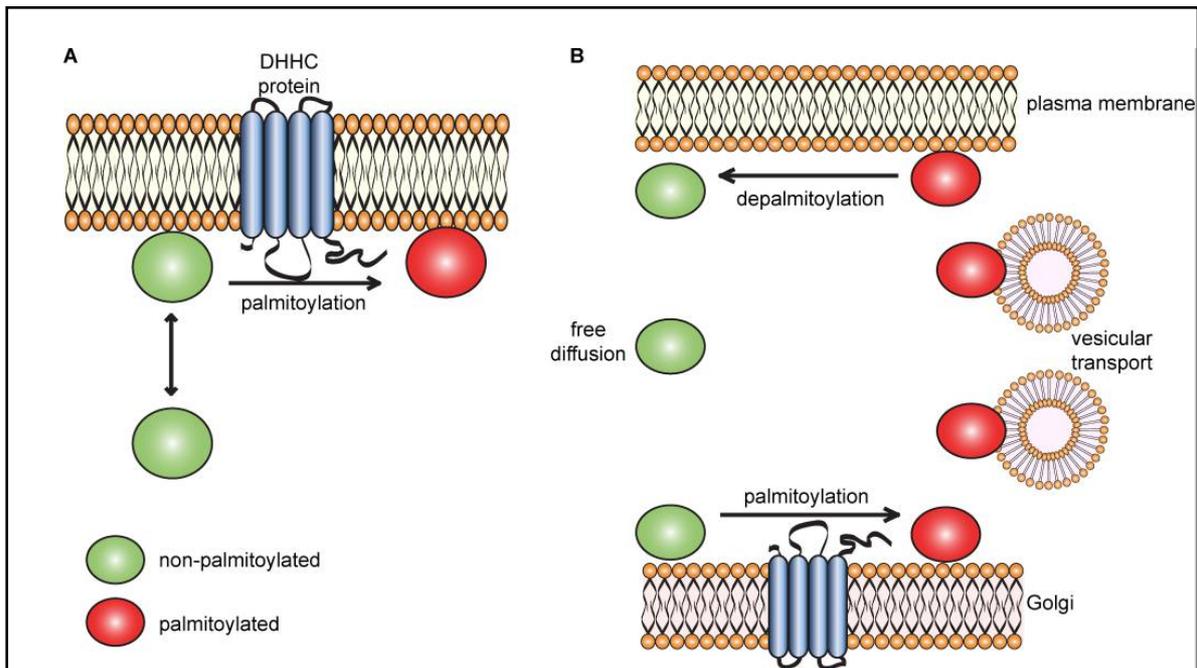


Figure 7 : La palmitoylation et le trafic vésiculaire

A) La réaction de palmitoylation est réversible et catalysée par l'enzyme palmitoyl-transferase DHHC qui peut se trouver sur la membrane du Golgi, du RE ou de la membrane plasmique. Cette modification permet l'association d'une protéine cytosolique avec une membrane lipidique. B) Cette modification est suffisante pour autoriser un trafic vésiculaire de la protéine cytosolique. Ceci est original car seules les protéines transmembranaires et les protéines sécrétées empruntent habituellement cette voie. (Salaun et al., 2010)

palmitoylation et de dépalmitoylation catalysés par l'enzyme Palmitoyl Protein Thioesterase (PPT) (Goodwin et al., 2005). Il faut savoir que cette modification lipidique ne concerne pas uniquement les protéines solubles. En effet, la rhodopsine bien que possédant 7 domaines transmembranaires, utilise une ancre S-palmitoylée pour attacher son extrémité C-terminale cytoplasmique à la membrane plasmique (Chuang and Sung, 1998). L'enzyme qui catalyse la palmitoylation se trouve plus particulièrement au niveau du Golgi mais on la trouve également au niveau du réticulum endoplasmique ou encore au niveau de la membrane plasmique (Greaves et al., 2009 ; Bartels et al., 1999). La palmitoylation est souvent couplée avec une autre modification lipidique comme une prénylation ou une myristoylation afin d'augmenter l'hydrophobicité de la protéine soluble et accroître son affinité pour la membrane lipidique (Shahinian and Silvius, 1995). Cela permettra un attachement stable de la protéine sur la membrane. Ainsi, la palmitoylation est essentielle pour la liaison membranaire stable de nombreuses protéines telles que les protéines H-Ras et N-Ras farnésylées ou encore la sous-unité α myristoylée des protéines G (Salaun et al., 2010).

La palmitoylation a une fonction plus complexe qu'une simple ancre membranaire. L'analyse de nombreuses protéines a indiqué que ce type de modification régule de nombreux processus tels que le trafic, la stabilité protéique et la localisation membranaire (Salaun et al., 2010). Des études ont montré l'importance de cette modification lipidique en lien avec le trafic membranaire. En effet, il a été décrit que la palmitoylation se comporte comme un signal de transport qui régule le trafic protéique à travers différents compartiments membranaires intracellulaires (Figure 7). Ce cas est très bien illustré par les protéines H-Ras et N-Ras. Ces protéines sont initialement farnésylées puis adressées au réticulum endoplasmique où elles vont subir une réaction de post-prénylation décrite précédemment. Enfin, ces deux protéines vont être palmitoylées dans le Golgi puis seront adressées à la membrane plasmique grâce à un trafic vésiculaire « classique » (Goodwin et al., 2005). Cette réaction de palmitoylation peut également avoir lieu dans le cytoplasme. GAD65, la petite isoforme de la GABA-Synthetising enzyme glutamate décarboxylase est synthétisée sous forme soluble (Kanaani et al., 2004). Elle va subir une réaction de palmitoylation dans le cytoplasme pour être dans un premier temps adressée sur le feuillet externe du Golgi et ensuite transportée vers des vésicules présynaptiques. Ce transport semble se faire à travers la voie du trafic vésiculaire classique : en effet, GAD65 est adressée au Golgi puis des vésicules issues du Golgi, positives pour le marqueur endosomal précoce Rab5a, vont prendre en charge GAD65 pour l'acheminer à destination (Kanaani et al., 2004).

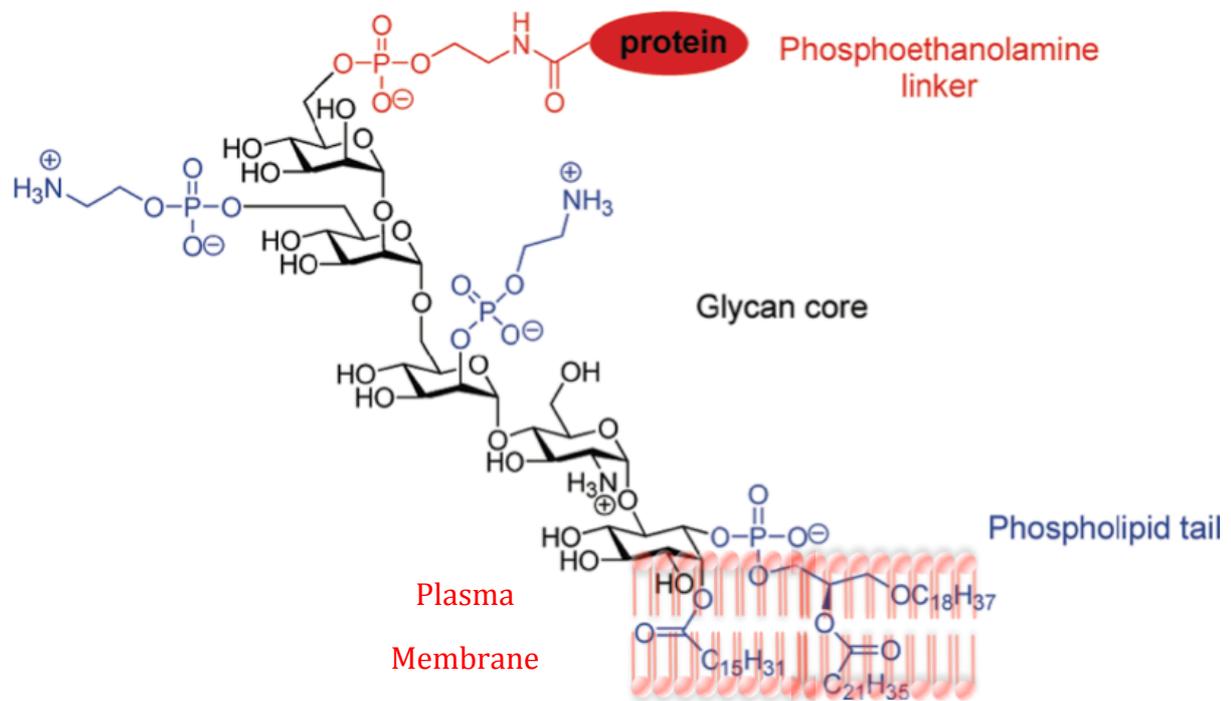


Figure 8 : La glypiation ou l'ajout d'une ancre GPI

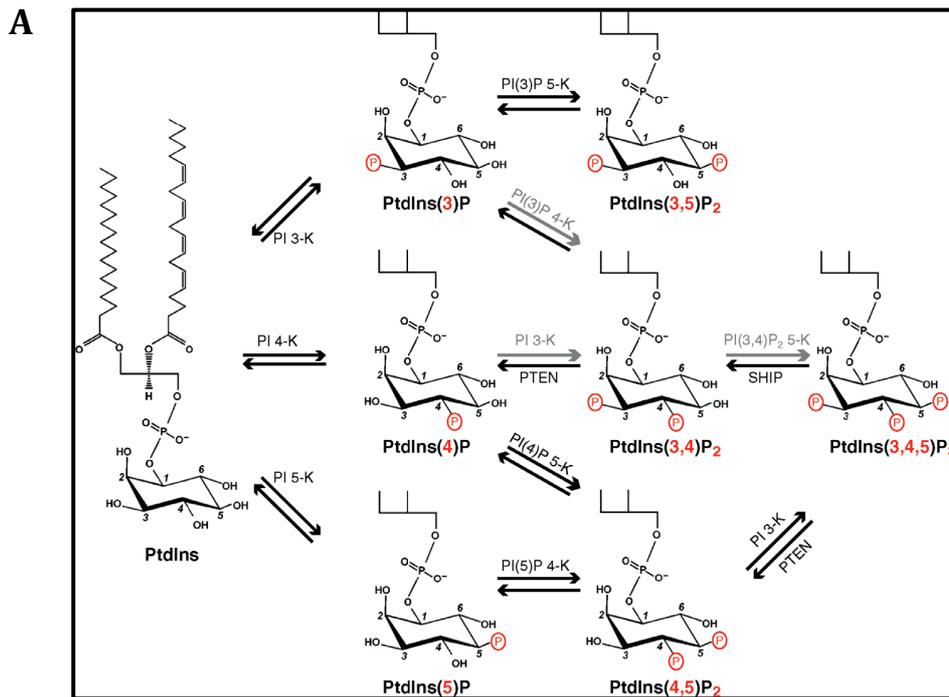
L'ancre GPI est constituée d'un résidu de phosphoéthanolamine qui permet de faire le lien entre la protéine cible et la membrane. Elle est ensuite formée par un corps glycan et finalement de deux acides gras qui forment la queue phospholipide capable d'ancrer l'ensemble dans la membrane lipidique. (Paulick and Bertozzi, 2008)

II.1.3 La glypiation : ajout d'une ancre GPI

La glypiation est une modification co-translationnelle qui ajoute une ancre GlycosylPhosphatidylinositol (GPI) sur l'extrémité C-terminale de nombreuses protéines eucaryotes. L'ancre GPI est pré-assemblée dans la membrane et est composée d'un groupement phosphatidylinositol, qui est fixé à un noyau glycane (glycan core) formé de résidus de mannoses et de N-acétylglucosamine. Ce noyau glycane est lui-même lié au groupement phosphoryl de la phosphoéthanolamine (Figure 8). Ainsi la liaison de l'ancre GPI à l'extrémité C-terminale de la protéine se fait à travers une phosphoéthanolamine. De plus, deux acides gras présents dans le groupement phosphatidylinositol permettent à l'ancre GPI d'être attachée à la membrane cellulaire (Maeda and Kinoshita, 2011).

La protéine destinée à une modification lipidique par glypiation, contient un peptide signal en N-terminale afin de permettre son adressage vers le réticulum endoplasmique (Englund, 1993). L'extrémité C-terminale de cette protéine, composée d'acides aminés hydrophobes est clivée et remplacée par l'ancre GPI. Cette ancre est suffisante pour « ancrer » la protéine à la membrane luminale du RE. Cette réaction est catalysée par une réaction dite de transamidation (Englund, 1993). La protéine ainsi modifiée va alors emprunter la voie de la sécrétion classique et être transférée dans l'appareil de Golgi. Enfin, cette protéine atteindra le réseau trans-Golgi pour être adressée à l'espace extracellulaire et insérée dans le feuillet externe de la membrane plasmique (Englund, 1993). De plus, la réaction de glypiation est réversible. En effet, la phospholipase C (PLC) est une enzyme connue pour rompre le lien entre la protéine et l'ancre GPI : l'antigène Thy-1 et l'acétylcholinestérase sont deux protéines « glypiées » et on sait qu'un traitement à la PLC induit la dissociation de ces protéines de la membrane plasmique (Paulick and Bertozzi, 2008).

Un processus biologique dans lequel cette modification joue un rôle important concerne la polarité apico-basale dans les cellules épithéliales (Lisanti et al., 1990). L'équipe de Rodriguez-Boulan a ainsi montré que l'ajout d'une ancre GPI à la protéine transmembranaire gD-1 normalement localisée à la membrane basolatérale induit une relocalisation de celle-ci au pôle apical (Lisanti et al., 1990). Le transport de cette protéine « taguée ancre-GPI » s'effectue à travers la voie de sécrétion (RE et Golgi) et des études ont montré son interaction préférentielle avec des radeaux lipidiques, riches en cholestérol et en sphingolipides (Sangiorgio et al., 2004).



B

Phosphoinositide	Target domains (<i>in vivo</i>)
PtdIns(3)P	FYVE, PX (PH?)
PtdIns(4)P	PH (78)
PtdIns(5)P	none identified
PtdIns(3,4)P ₂	PH (PX?)
PtdIns(3,5)P ₂	none identified
PtdIns(4,5)P ₂	PH, FERM, ANTH, ENTH, tubby (PX?), AP2- α , plus several cytoskeletal proteins
PtdIns(3,4,5)P ₃	PH

Figure 9 : Les domaines d'interaction directe avec la membrane lipidique

Certaines protéines sont capables d'interagir dans une bicouche lipidique grâce à des domaines particuliers contenus dans leurs séquences protéiques. Ces domaines reconnaissent plus ou moins spécifiquement certains phosphoinositides composant la membrane cible. **A**) Différents types de phosphoinositides existent en fonction du degré et de la position de phosphorylation. Toutes ces réactions sont réversibles et sont catalysées par des kinases et des phosphatases. **B**) Le tableau récapitule l'affinité des différents types de domaines protéiques connus pour les différents types de phosphoinositides. (Lemmon, 2003)

L'hormone de croissance humaine hGH, transfectée dans les cellules MDCK est sécrétée de façon non polarisée. Cependant, l'ajout d'une ancre GPI va alors induire une localisation apicale de cette protéine fusion (Lisanti M.P., et al., 1989).

Ce type de modification post-traductionnelle tout comme la palmitoylation ou encore la farnésylation sont des processus alternatifs aux protéines transmembranaires pour deux aspects biologiques majeurs. C'est en premier lieu une stratégie pour permettre à une protéine soluble, cytosolique de se fixer à une membrane lipidique. D'autre part, cela permet à ces protéines cytosoliques de se comporter comme des protéines transmembranaires : ces modifications lipidiques leur permettent d'emprunter la voie de sécrétion à travers le RE vers le Golgi et enfin le transport post-Golgi pour un tri correct. Il est très important de noter que seules les protéines transmembranaires ou les protéines sécrétées sont normalement capables d'emprunter la voie de sécrétion.

II.2 Les domaines protéiques d'association aux phosphoinositides

II.2.1 Les phosphoinositides et les domaines remarquables

D'autres protéines à localisation membranaire ne subissent pas de modifications co- ou post-traductionnelles mais présentent dans leurs séquences protéiques, des domaines remarquables qui permettent leur accrochage directement à la membrane. Les protéines possédant ces types de domaines interagissent avec des formes phosphorylées du Phosphatidyl Inositol (PtdIns) que l'on appelle des phosphoinositides, composant la membrane cible. Ces phosphoinositides sont des phospholipides remarquables du fait de leur aptitude à être modifiés par une balance de phosphorylation et de déphosphorylation (Figure 9A). Cette modulation permet notamment de recruter des protéines spécifiquement à un domaine membranaire précis. Il existe différents phosphoinositides qui diffèrent selon leur statut de phosphorylation qui survient sur le résidu inositol du groupement phosphatidyl Inositol. Ce PtdIns peut être phosphorylé en position 3, 4 ou 5 donnant ainsi lieu à plusieurs phosphoinositides tels que le PtdIns(3)P, le PtdIns(4)P, le PtdIns(5)P, le PtdIns(3,4)P₂, le PtdIns(3,5)P₂, le PtdIns(4,5)P₂ ainsi que le PtdIns(3,4,5)P₃ (Figure 9A). Ces réactions de phosphorylations sont catalysées par des kinases nommées selon la position qu'elles phosphorylent telles que la PI3-K, PI4-K ou encore la PI(3)P5-K (Lemmon, 2003). A titre d'exemple, pour passer de PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂) à PtdIns(3,4,5)P₃

(PIP3), c'est la kinase PI3-K qui intervient. La réaction inverse est quant à elle catalysée par la phosphatase PTEN.

Par ailleurs, PTEN possède une activité suppresseur de tumeurs qui est directement dépendante de son activité phosphatase, en régulant négativement la voie PI3K-AKT-mTOR. Ainsi, des mutations perte de fonction de PTEN ont été identifiées dans différents cancers tels que le cancer du sein ou de la prostate (Hollander et al.).

Différents domaines protéiques interagissant directement avec les phosphoinositides ont été identifiés avec une affinité plus ou moins forte (Figure 9B). Parmi ces domaines, le domaine PH (**P**leckstrin **H**omology), le domaine FYVE (**F**ab1p **Y**otb **V**ac1p **E**EA1) ainsi que le domaine PX (**P**hagocyte **N**ADPH **o**Xidase).

II.2.2 Les domaines de liaison aux phosphoinositides

Le domaine PH a été découvert la première fois pour la protéine Pleckstrine qui, par ailleurs est une des rares protéines à en posséder deux. La structure de ce domaine est bien caractérisée et est formée par approximativement 120 acides aminés (Lemmon and Ferguson, 2000). Ce domaine PH reconnaît principalement le PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂ et PtdIns(4,5)P₂ alors qu'une proportion très faible de domaine PH du protéome humain est capable de reconnaître le PtdIns(3,4,5)P₃ (Isakoff et al., 1998). Il existe ainsi une spécificité de reconnaissance de certaines protéines à domaine PH pour certains types de phosphoinositides. Par exemple, de nombreux domaines PH interagissant avec le PtdIns(3,4,5)P₃ sont également capables d'interagir avec PtdIns(3,4)P₂ tels que le domaine PH des protéines PKB ou DAPP mais pas des protéines Btk ou Grp1 qui sont complètement spécifiques de PtdIns(3,4,5)P₃ (Kavran et al., 1998).

Les protéines qui possèdent un domaine PH sont nombreuses et interviennent dans divers processus biologiques. Parmi elles, la protéine phare pleckstrine, substrat de la Protéine Kinase C dans les plaquettes sanguines (Baig et al., 2009). On peut également évoquer la GTPase dynamine qui intervient dans le trafic vésiculaire et précisément dans l'incurvation et dans la scission des vésicules de sécrétion (Ramachandran et al., 2009).

Quant aux domaines PX, ils ont été identifiés en 1996 comme étant une séquence de 130 acides aminés détectée dans deux composants du complexe protéique **PhoX** (phagocyte NADPH oxidase) mais également dans de nombreuses autres protéines à fonctions biologiques diverses (Ponting, 1996). Des études récentes montrent que les protéines à

domaine PX peuvent se lier avec le phosphoinositide PtdIns(3,4)P₂ bien que la plupart de ces protéines s'associent préférentiellement au PtdIns(3)P (Kanai et al., 2001). Une large proportion de protéines à domaines PX constitue une famille de protéines appelée Sorting NeXin ou protéines SNX, impliquées dans le trafic endocytaire (Ponting, 1996). Parmi les Sorting NeXin on peut citer certaines sous-unités du complexe Retromer, Vps5p et Vps17p qui possèdent des domaines PX à affinité pour PtdIns(3)P. Le complexe retromer intervient dans le trafic endocytaire permettant un trafic rétrograde d'une protéine cargo depuis les endosomes vers le Golgi (Seaman et al., 1998).

Le domaine FYVE possède approximativement 60 à 70 acides aminés et est appelé ainsi pour les quatre protéines dans lesquelles ce domaine a été identifié pour la première fois chez la levure : Fab1p, YOTB, Vac1p et EEA1 (Stenmark et al., 2002). Ce domaine s'associe exclusivement et spécifiquement au phosphoinositide PtdIns(3)P. Chez les mammifères, PtdIns(3)P est abondamment retrouvé dans les membranes des endosomes précoces ainsi que sur les corps multivésiculaires. EEA1 par exemple est localisé au niveau des endosomes précoces alors que Hrs se trouve sur les corps multivésiculaires (Stenmark et al., 2002). Chez la levure, on retrouve ce phosphoinositide sur des vacuoles ou encore sur la membrane des endosomes (Gillooly et al., 2000).

Les protéines possédant un tel domaine s'associe avec des compartiments du trafic intracellulaire tels que les endosomes précoces et les corps multivésiculaires. Ainsi, la mutation de la PI3K Vps34, inhibe la production de PtdIns(3)P et affecte le trafic intracellulaire (Gillooly et al., 2000). Cela montre clairement que les protéines à domaines FYVE sont impliquées dans le trafic membranaire vésiculaire ou vacuolaire. D'autres évidences confirment cette fonction comme la protéine à domaine FYVE Vac1p qui régule la fusion des vésicules issues de la membrane plasmique ou du Golgi avec les endosomes (Peterson et al., 1999). Fab1p quant à lui, qui est une PI3P 5-Kinase, contrôle la formation des corps multivésiculaires (MVBs). Pour ce dernier aspect, on peut citer la protéine VPS27 qui régule également le trafic entre les endosomes et la vacuole. Ces domaines, de par leur affinité avec un type de phosphoinositides peuvent servir de sondes pour localiser ces différents lipides. Par exemple, le domaine FYVE sert à localiser les endosomes (Stenmark et al., 2002) alors que la sonde à domaine PH telle que la phospholipase C δ permet de marquer le phosphoinositide PIP₂.

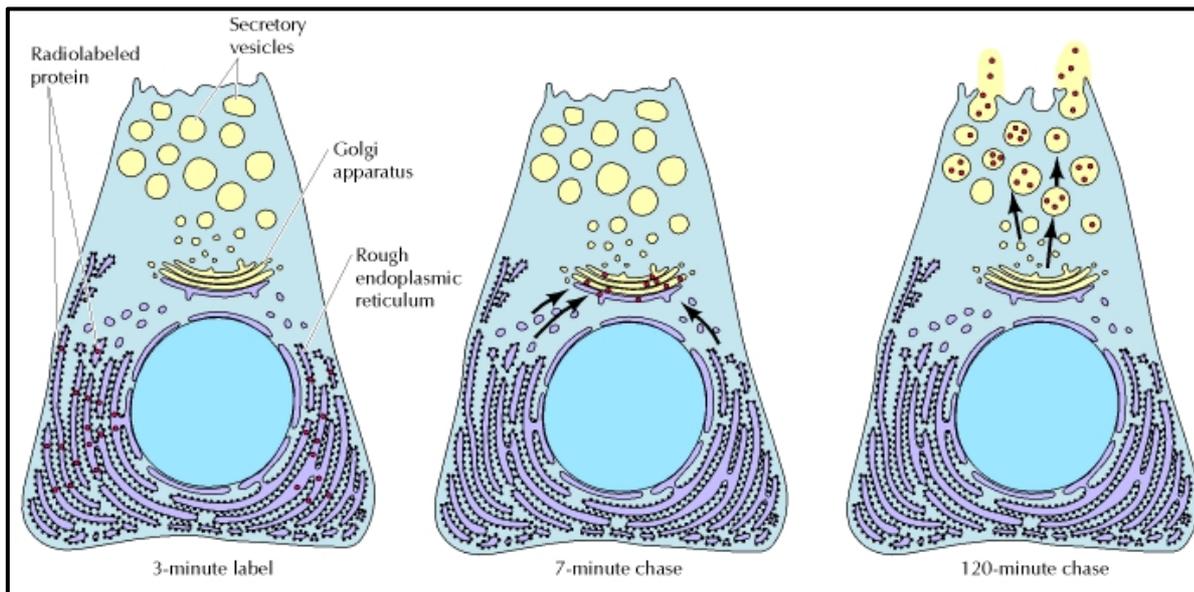


Figure 10 : La voie de sécrétion ou le trafic membranaire : expérience de Palade

Palade et ses collaborateurs ont pu suivre en 1964 le devenir d'une protéine, le zymogène, depuis sa synthèse jusqu'à sa sécrétion extracellulaire. Pour cela, ils ont radiomarqué la protéine (point rouge) et grâce à la méthode du « Pulse-Chase » ont pu suivre l'acheminement de la protéine. Ainsi, la protéine est d'abord adressée au RE où elle achève sa synthèse (3-minute label), puis elle voyage dans les différents saccules du Golgi, du site Cis vers le site Trans (7-minute chase) avant d'être empaquetée dans des vésicules en route vers la membrane plasmique (120 minute chase). A ce niveau la vésicule fusionne avec la membrane plasmique et déverse la protéine dans le milieu extracellulaire. (Figure d'après Caro and Palade, 1964).

II.2.3 Les domaines non encore caractérisés

Outre les domaines particuliers cités plus haut, il en existe certainement d'autres qui n'ont pas été caractérisés. C'est notamment le cas pour la protéine de polarité Par3. Par3 est une protéine échafaudage à domaine PDZ, permettant des interactions protéines-protéines. Cette protéine fait partie d'un module protéique formée par Par3/Par6/aPkc qui se localise à la membrane apicale d'une cellule et est essentiel pour la polarité épithéliale (Krahn et al., 2010). Les travaux de Krahn et collaborateurs ont montré que l'association de la protéine cytosolique Par3 (Bazooka chez la drosophile) à la membrane apicale se fait directement grâce à une séquence en C-terminale et est indépendante de son domaine PDZ. L'analyse de cette séquence C-terminale n'a révélé aucun domaine remarquable évoqué précédemment mais cette séquence est suffisante et nécessaire pour sa localisation membranaire apicale (Krahn et al., 2010). Des études approfondies ont montré que ce domaine se lie au PtdIns(4,5)P₂ et au PtdIns(3,4,5)P₃ et l'analyse effectuée sur les liposomes indique que ce domaine C-terminal de Par3 se lie préférentiellement au PtdIns(3,4,5)P₃, ce qui est contradictoire avec la localisation basolatérale de PIP3 dans les MDCK (Fields et al., 2010).

Au cours de cette première partie, nous avons vu que les protéines cytosoliques à destinée membranaire adoptent différentes stratégies afin de s'associer à une couche lipidique. Certaines de ces modifications, outre l'association avec la membrane, permettent également à la protéine cytosolique d'emprunter la voie de la sécrétion endomembranaire depuis le RE vers l'appareil de Golgi jusqu'au transport à la membrane plasmique. Les protéines à domaines remarquables sont essentiellement impliquées dans le trafic post-Golgi en régulant notamment des processus d'endocytose, de dégradation ou de scission vésiculaire.

III. Transport des protéines transmembranaires et des protéines sécrétées.

La voie de sécrétion appelée également trafic membranaire ou trafic intracellulaire, correspond à l'ensemble des processus permettant à une protéine sécrétée ou à une protéine transmembranaire (protéine intégrale) d'être acheminée à son site de destination (Figure 10). Ce processus antérograde démarre depuis la synthèse dans le RE, la maturation dans le Golgi et le tri sélectif vers les compartiments cibles en sortie du Golgi. Il faut également signaler le

cheminement rétrograde qui démarre depuis la membrane plasmique vers les endosomes et les lysosomes ou l'appareil de Golgi. Je reviendrai plus tard sur ces différents compartiments. Pour simplifier, je parlerai de la voie de sécrétion qui englobera donc également l'acheminement des protéines transmembranaires.

Ce fut dans les années 60 que le groupe de Palade a démontré pour la première fois le rôle du réticulum endoplasmique dans la synthèse et le tri de protéines (Caro and Palade, 1964). Il utilisa un modèle cellulaire spécialisé dans la sécrétion, la cellule acineuse pancréatique, afin de mettre en évidence le processus de sécrétion des granules de zymogène par autoradiographie. L'autoradiographie en microscopie électronique a permis de révéler les sites ou les compartiments qui sont impliqués dans la sécrétion protéique (Figure 10). Ainsi, après une brève exposition de la cellule acineuse du pancréas à l'acide aminé radioactif (« pulse »), les protéines néosynthétisées sont détectées au niveau du réticulum endoplasmique qui est le site de la synthèse de protéines destinées à la sécrétion (Caro and Palade, 1964). Puis, lorsque les cellules sont incubées (période courte) avec l'acide aminé non radioactif (« chase »), les protéines radio-marquées se trouvent localisées dans l'appareil de Golgi. Enfin, lorsqu'on effectue un « chase » sur une période plus longue, on remarque que les protéines radio-marquées traversent le Golgi pour être transportées vers la surface cellulaire par l'intermédiaire de vésicules de sécrétion. Ces dernières fusionnent avec la membrane plasmique afin de déverser leur contenu à l'extérieur de la cellule (figure 10).

III.1 Synthèse et transport des protéines transmembranaires et des protéines sécrétées dans le RE

Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, toutes les protéines débutent leur synthèse dans le cytosol mais uniquement les protéines résidentes dans le cytosol et les protéines nucléaires et mitochondriales achèveront leur synthèse dans le cytosol. Ce n'est pas le cas des protéines transmembranaires ou sécrétées. Ces deux types de protéines suivent la voie de sécrétion connue également sous le terme de trafic membranaire. La voie de sécrétion concerne toutes les protéines qui transitent depuis le réticulum endoplasmique rugueux vers le Golgi et depuis le Golgi vers les compartiments cibles tels que les lysosomes, les endosomes, la membrane plasmique ou encore le milieu extracellulaire.

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite essentiel, uniquement retrouvé chez les eucaryotes. Il est formé par un réseau membranaire de tubules, de vésicules et de citernes

interconnectés avec la présence d'une lumière distincte du cytosol. Cet organite a été vu pour la première fois en 1945 par l'équipe de Claude Albert (Porter et al., 1945) et on distingue deux types de RE selon sa morphologie : le Réticulum Endoplasmique Lisse (REL) et le Réticulum Endoplasmique Rugueux (RER). Quant à la fonction associée au réticulum endoplasmique, elle dépend directement du type de RE en présence.

III.1.1 Le Réticulum Endoplasmique Lisse

En continuité avec le feuillet cytosolique de l'enveloppe nucléaire, le réticulum endoplasmique lisse (REL) est un site majeur de la synthèse de lipides membranaires dans les cellules eucaryotes. Dû à leur extrême hydrophobicité, les lipides sont synthétisés en association avec des membranes cellulaires préexistantes plutôt que dans un environnement aqueux que forme le cytosol. La membrane des cellules eucaryotes est principalement composée de trois types de lipides : les phospholipides, les glycolipides et le cholestérol. La plupart des phospholipides qui sont les constituants de base des membranes cellulaires, dérivent du glycérol. De plus, le REL sert également de site majeur de synthèse de deux autres composants de lipides membranaires, à savoir le cholestérol et la céramide. Notons que la céramide est convertie en glycolipides ou bien en sphingomyéline dans l'appareil de Golgi. On remarque ainsi que le REL est aussi bien responsable de la synthèse du produit final tel que les glycérophospholipides et le cholestérol que de la synthèse de précurseurs lipidiques majeurs tels que les glycolipides et les sphingomyélines dont le produit final sera achevé ultérieurement dans l'appareil de Golgi.

III.1.2 Le Réticulum Endoplasmique Rugueux

Ce réticulum est dit "rugueux" (RER) ou encore "granuleux" (REG) du fait de la présence de nombreux ribosomes sur la membrane face cytosolique de cet organite. Ces ribosomes ne font pas partie intégrante du RER : en effet, les ribosomes ne sont pas liés de façon stable au réticulum et y sont constamment associés puis dissociés. Le ribosome ne s'associe au RER qu'une fois la synthèse protéique commencée puis celui-ci se dissocie lorsque la traduction s'achève et il est libéré dans le cytosol. Seules les protéines luminales ou les protéines transmembranaires sont adressées vers le RER grâce à une séquence particulière portée par l'extrémité N-terminale de celles-ci. Sur un plan structural, le Réticulum endoplasmique

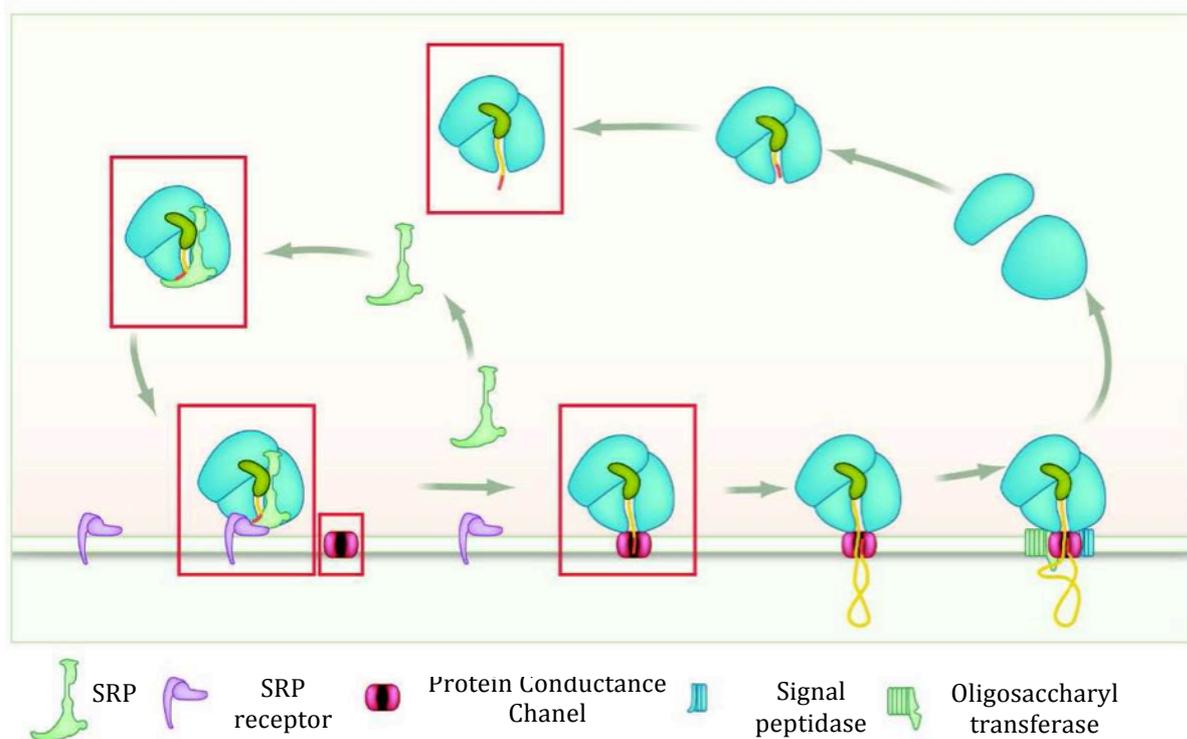


Figure 11 : Adressage d'une protéine à la membrane du RE

La protéine vouée à emprunter la voie de sécrétion démarre sa synthèse sur un ribosome libre dans le cytosol. Cette protéine en cours de synthèse exhibe une séquence signal qui est reconnue par le complexe ribonucléoprotéique SRP. L'ensemble ribosome, polypeptide en cours de synthèse et le complexe SRP est adressé vers la membrane du RE grâce au récepteur SR qui reconnaît le complexe SRP. Puis, le processus de translocation démarre grâce à un canal le « Protein Conductance Chanel » dans lequel la synthèse protéique se poursuit et la protéine est soit déversée dans la lumière soit insérée dans la membrane du RE. Une enzyme « signal peptidase » permettra de cliver la séquence signal pour libérer la protéine. (Kampmann and Blobel, 2009)

possède une bicouche lipidique d'environ 30 Å en continuité avec le feuillet externe de l'enveloppe nucléaire. Le RER est le premier compartiment à être emprunté par la voie de la sécrétion. Une fois que la protéine d'intérêt a achevé sa traduction dans ce compartiment, elle sera envoyée vers l'appareil de Golgi, deuxième compartiment impliqué dans ce processus de trafic membranaire. Ce deuxième compartiment se trouve à proximité du RER et n'est pas en continuité avec ce dernier. Par conséquent, la communication entre le RER et le Golgi s'effectue à travers un trafic vésiculaire hautement régulé.

III.1.3 Reconnaissance et acheminement des protéines vers le RE

Afin d'être correctement acheminée vers le RE rugueux, la protéine transmembranaire doit exhiber une petite séquence peptidique d'environ 30 à 60 acides aminés à son extrémité N-terminale. Cette séquence signal N-terminale constitue un premier étiquetage, formée d'une séquence linéaire et hydrophobe.

III.1.3.1 « La séquence signal » et le complexe SRP

L'hypothèse de la séquence signal a émergé en 1971 grâce à Günter Blobel qui se demandait comment une protéine vouée à la sécrétion était initialement adressée au RE (Blobel and Sabatini, 1971). Blobel a basé ses recherches sur les observations de Georges Palade qui, à travers des études de biochimie et de microscopie électronique avait brillamment démontré l'acheminement d'une telle protéine depuis le RE vers le Golgi puis vers les vésicules de sécrétion, les lysosomes ou encore vers la membrane plasmique. Blobel conclut ainsi que cette protéine possédait une séquence intrinsèque lui permettant d'atteindre la membrane du RE (Blobel and Dobberstein, 1975). Cette découverte est universelle car elle est aussi bien conservée chez la levure que chez les végétaux et les animaux. Pour cette découverte et pour l'ensemble de ces travaux, Günter Blobel a été récompensé en 1999 par le prix Nobel de Physiologie et Médecine.

Lorsque la séquence signal du polypeptide en cours de synthèse émerge du ribosome, elle est reconnue par un complexe ribonucléoprotéique appelé SRP pour **S**ignal **R**ecognition **P**article (Saraogi and Shan, 2010) (Figure 11). Cette association va inhiber temporairement la traduction de la protéine. L'ensemble ribosome, chaîne polypeptidique en cours de synthèse et le complexe SRP est transporté vers la membrane du RE grâce à la reconnaissance du

complexe SRP avec son récepteur SR (Kampmann and Blobel, 2009). Chez les mammifères, le complexe SRP pour **S**ignal **R**ecognition **P**article est un complexe ribonucléoprotéique formé par 6 polypeptides ainsi qu'un petit ARN cytoplasmique, l'ARN 7S SRP (Saraogi and Shan, 2010). Le complexe SRP chez la bactérie, appelé Ffh, sert à adresser des protéines vers la membrane plasmique interne, car le RE est complètement inexistant chez les procaryotes (Luirink and Dobberstein, 1994).

III.1.3.2 Le récepteur SR et le processus de translocation

Chez les eucaryotes, le récepteur du complexe SRP, appelé SR pour **S**RP **R**eceptor, est constitué d'un complexe hétérodimérique (Saraogi and Shan, 2010). Lorsque le complexe SRP est reconnu par son récepteur, l'ensemble ribosome protéine cargo couplée à la protéine SRP-SR va alors se fixer sur un complexe protéique de translocation appelé également « Translocon » situé sur la membrane du RE. (Figure 11). Chez les mammifères comme chez la levure, le canal de translocation, appelé aussi translocon ou encore la « protein-conducting-channel » est présent au niveau du RE (Kampmann and Blobel, 2009 ; Van den Berg et al., 2004). Le transfert du ribosome depuis le SRP-SR vers le translocon va dès lors autoriser la reprise de la traduction de la chaîne polypeptidique qui est directement déversée à travers la membrane du RE. Si c'est une protéine liminale, elle sera libérée dans la lumière du RE. Par contre s'il s'agit d'une protéine transmembranaire, elle sera insérée dans la membrane du RE. Concernant la protéine transmembranaire à destination de la membrane plasmique, l'extrémité de la protéine qui se trouve dans la lumière du RE lors de la synthèse se trouvera exposée à l'extérieur de la cellule.

III.2 Fonctions sommaires du Réticulum Endoplasmique Rugueux

III.2.1 Le RE est le site de la N-glycosylation

Une des fonctions importantes du RE réside dans une modification co-translationnelle par l'ajout d'un oligosaccharide aux protéines transmembranaires et secrétées. Il s'agit de la N-glycosylation qui intervient sur le groupement NH_2 d'un résidu Asparagine. L'oligosaccharide appelé « core N-glycan » correspond à 14 résidus glucidiques formés par 2 acétylglucosamine, 3 glucoses et 9 mannoses. Ce core N-glycan est préassemblé dans le RE et l'ajout de celui-ci sur la protéine cible est catalysé par l'oligosaccharyltransférase. Cette

modification est importante car elle permet de recruter des protéines chaperonnes pour un repliement optimal de la protéine cible (Rothman, 1994). Les protéines d'adhésion telles que la E-cadhérine et la nectine subissent une N-glycosylation et cette modification est nécessaire pour le processus d'adhésion intercellulaire et *in fine* pour la formation d'un épithélium mature (Vagin et al., 2008). D'autres études menées par le laboratoire de Sachs indiquent l'importance de ce résidu N-glycan pour correctement adresser des protéines à la membrane apicale. En effet, l'altération de la N-glycosylation induit une accumulation cytoplasmique de protéines normalement apicales dans les cellules polarisées LLC-PK1 (Vagin et al., 2004).

III.2.2 L'ajout des ponts disulfures et de l'ancre GPI se déroule dans le RE

Certaines protéines nécessitent la formation de ponts disulfures afin de murer. La formation de ces ponts peut s'opérer entre les cystéines de certaines protéines arrivées dans le RE. Les ponts disulfures sont nécessaires pour réguler la conformation tridimensionnelle de la protéine d'intérêt. Cette réaction est médiée par une Protein Disulfure Isomérase (PDI) qui va oxyder les groupements SH (SH-SH dithiols) de deux cystéines, créant ainsi un pont disulfure (S-S). Comme je l'ai évoqué précédemment, la modification lipidique par ajout d'ancre GlycosylPhosphatidyl Inositol (GPI) s'opère dans le RE. La protéine d'intérêt est normalement synthétisée dans le RE, déversée dans la lumière du RE. A ce niveau, elle s'associe avec l'ancre qui est préfabriquée dans la membrane face luminale du RE.

III.3 ERGIC : compartiment intermédiaire RE-Golgi

Lorsque la protéine arrive au niveau du site de sortie du RE, ERES (ER Exit Sites), elle sera adressée vers un nouveau compartiment (Palade, 1975). Des vésicules COP-II contenant les protéines P24 et ERGIC53, associées aux protéines cargos bourgeonnent à partir du site ERES. Ces vésicules sont ensuite envoyées vers ce nouveau compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi appelé ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment). Ce compartiment fut identifié en microscopie électronique dans les cellules de rein de hamster BHK-21 (Saraste and Kuismanen, 1984) et son existence fut confirmée par des méthodes d'imagerie en temps réel et sa localisation est définie par le marqueur ERGIC53 (Ben-Tekaya et al., 2005).

III.4 L'appareil de Golgi

Découvert en 1898 par l'histologiste italien Camillo Golgi qui lui donna son nom, l'appareil de Golgi est un organite essentiel dans la voie de sécrétion. Cette découverte est majeure car c'est le premier compartiment endomembranaire autre que le noyau à avoir été identifié. Camillo Golgi fut récompensé par un prix Nobel de Physiologie et de Médecine décerné en 1906 pour cette découverte. L'appareil de Golgi se présente comme un empilement de saccules dont les extrémités bourgeonnent de vésicules. L'appareil de Golgi est divisé classiquement en trois régions : la face Cis, la région Médiane et la face Trans. La face Cis correspond au site d'entrée des protéines en provenance du RE grâce à un transport vésiculaire. Quant à la face Trans, elle correspond à la phase finale de maturation golgienne. A ce niveau, les protéines vont être adressées vers un dernier compartiment, le réseau trans-Golgien ou TGN (Trans-Golgi Network) qui se présente comme une plateforme de sortie des protéines (Griffiths and Simons, 1986). Cette sortie se fait à travers un transport tubulo-vésiculaire, pour un tri sélectif vers les compartiments cibles tels que la membrane plasmique, les lysosomes ou encore les endosomes.

III.4.1 Fonctions sommaires du Golgi

III.4.1.1 Modification protéique par ajout de glucides

Les protéines qui seront acheminées vers le Golgi depuis le RE vont subir des modifications lipidiques, glucidiques mais également des clivages afin de les rendre actives et aptes à assurer leurs fonctions biologiques. Concernant les modifications lipidiques, elles ont été abordées précédemment (c.f. palmitoylation). L'ajout de chaînes glucidiques initié dans le RE tels que la N-glycosylation se poursuit dans le Golgi. Certaines protéines peuvent également être O-glycosylées par des branches oligosaccharidiques sur des résidus thréonine ou sérine. Les enzymes qui catalysent ces modifications sont les glycosidases comme la glucosyltransférase et les glycosyltransférases telles que la glucosidase I et II et la mannosidase I. Notons que la mannosidase, du fait de sa localisation exclusivement Golgienne, est utilisée comme un marqueur de ce compartiment cellulaire.

III.4.1.2 L'étiquette Mannose-6-Phosphate

Cette modification glucidique post-traductionnelle correspond à une étiquette qui permet de diriger spécifiquement les protéines solubles vers les lysosomes (Le Borgne and Hoflack, 1997). Cette modification se déroule dans l'appareil de Golgi et est catalysée par l'enzyme N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase qui ajoute un résidu N-acétyl-glucosamine-phosphate sur le carbone 6 d'un ou plusieurs mannoses sur la protéine cible (généralement noté M6P). Toutes les enzymes lysosomiales telles que les cathepsines ou les hydrolases subissent ce type de modification dite « glucide de destination » par opposition au « peptide de destination » abordé précédemment. Ce motif est ensuite reconnu par des récepteurs spécifiques cations-dépendants ou -indépendants appelés les récepteurs au mannose-6-phosphate (M6PR) (Ghosh and Kornfeld, 2004). Cet ensemble motif M6P et récepteur transmembranaire est ensuite véhiculé grâce à des vésicules qui émanent du TGN pour être spécifiquement adressé vers le compartiment lysosomal (Ludwig et al., 1995). Je reviendrai sur le transport de protéines ayant ce type de motif ultérieurement.

III.4.1.3 Protéines portant une signature KDEL

Certaines protéines sont acheminées dans l'appareil de Golgi pour subir une maturation. Cependant ces protéines ne sont pas destinées à la sécrétion mais sont résidentes du RE. Il est donc impératif de ré-envoyer ces protéines vers le RE. C'est notamment le cas de la protéine chaperonne BiP (Yamamoto et al., 2001) ainsi que de la Protéine Disulfure Isomerase (PDI) précédemment abordées. Ce sont des protéines résidentes du RE qui possèdent toutes les deux un motif lys/his-asp-glu-leu ou encore K-D-E-L au niveau de l'extrémité C-terminale. Le récepteur à 7 domaines transmembranaires ERD2 (Pelham, 1996) reconnaît spécifiquement ce motif et permet de renvoyer ces protéines vers le RE à travers un transport vésiculaire rétrograde dépendant de COPI (Orci et al., 1997). Une mutation sur le gène ERD2 est à l'origine de la sécrétion aberrante de la protéine BiP au lieu d'une rétention dans le RE (Pelham, 1996).

III.4.1.4 Le Golgi est également un site de clivage protéique

De nombreuses protéines qui atteignent l'appareil de Golgi ne sont pas encore dans leur conformation active et se trouvent sous forme de pro-protéine ou de pré-pro-protéine. Pour

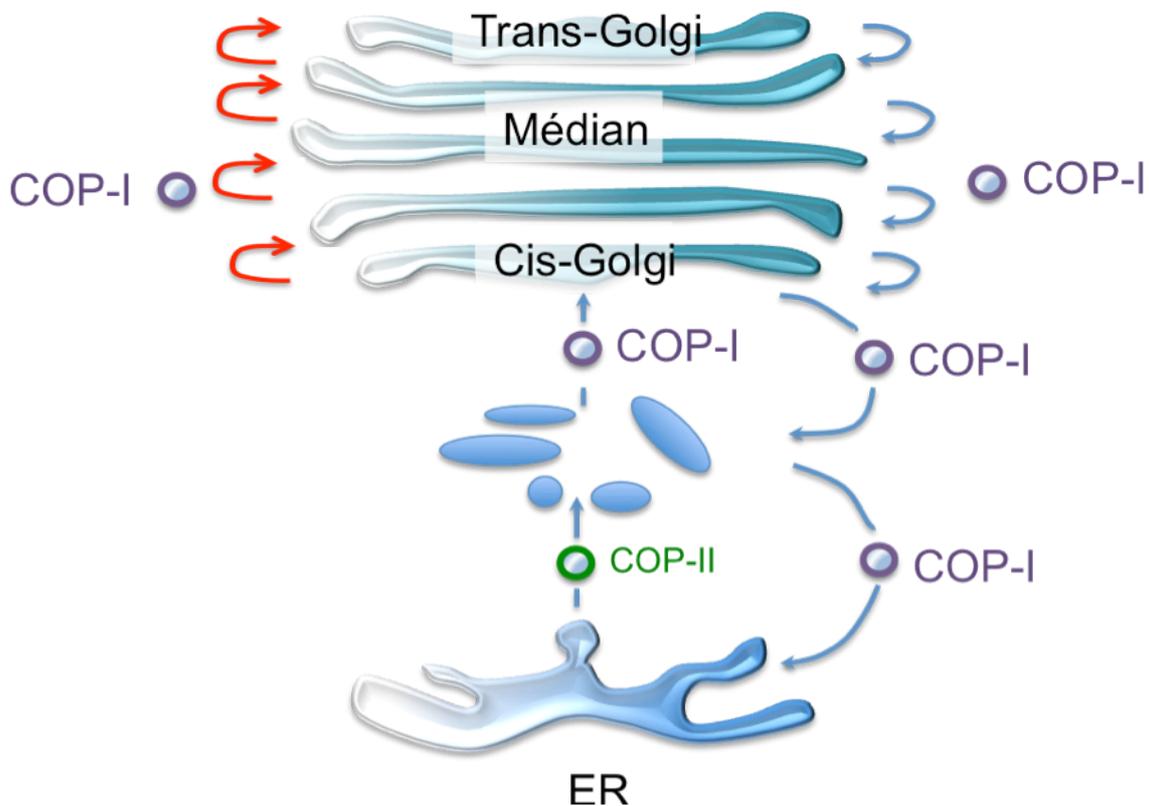


Figure 12 : Vue d'ensemble du transport entre le RE et le Golgi

Deux types de transports existent entre le RE et le Golgi. Le trafic antérograde : les protéines destinées à la sécrétion, à la membrane plasmique ou au lysosome sont synthétisées dans le RE et sont transportées vers le site cis-Golgi grâce aux vésicules tapissées de COP-II (en vert). Le trafic rétrograde : certaines protéines résidentes du RE mûrent dans le Golgi et nécessitent un retour vers le RE. Ces protéines possédant une signature KDEL seront prises en charge par des vésicules COP-I et seront rétro-adressées au RE (Vésicule violette, flèche bleue)

activer ces protéines, il est indispensable de les cliver. Un exemple célèbre est la maturation de l'insuline. Cette hormone est synthétisée sous forme d'une longue chaîne polypeptidique appelé préproinsuline dans le RE. Ici, le clivage du peptide signal intervient et il y a création de trois ponts disulfures ; la protéine est alors appelée proinsuline. Dans l'appareil de Golgi, cette proinsuline sera clivée pour donner l'insuline, l'hormone active qui sera formée par deux chaînes polypeptidiques reliées par 3 ponts disulfures. D'autres protéines telles que les collagènes ou le facteur de Von Willebrand subissent également des processus de clivage pour leur maturation protéique (Myllyharju and Kivirikko, 2004 ; Hollestelle et al., 2011).

III.5 Mécanismes de communication entre le RE et le Golgi

Afin de permettre une bonne régulation dans la communication entre ces deux compartiments, il est nécessaire qu'un échange mutuel et dynamique puisse s'y opérer. On distingue ainsi deux types de transport : le transport antérograde et le transport rétrograde (Figure 12). Le transport antérograde débute dans le RE, suivi du Golgi et enfin du TGN vers le compartiment de destination (endosomes, lysosomes, membrane plasmique, milieu extracellulaire). Quant au transport rétrograde, il concerne le transport depuis le Golgi vers le RE.

III.5.1 Le transport antérograde

Le transport antérograde du RE vers le Golgi est notamment assuré par les vésicules recouvertes du manteau protéique COP-II (COatmer Protein-II). D'une façon générale, la polymérisation des protéines du manteau telles que COP-II, COP-I ou encore la clathrine induit une force qui permet de déformer et d'incurver la membrane, ceci dans le but de générer des vésicules. COP-II est responsable de la biogenèse des vésicules issues du RE (60-70 nm de diamètre) à destination du Cis-Golgi (Fromme et al., 2008) et est donc exclusivement impliqué dans le transport antérograde (Figure 12). Il est composé de 5 sous-unités, la petite GTPase Sar1, le complexe Sec23-Sec24 formant le manteau interne et le complexe Sec13-Sec31 formant le manteau extérieur. Sar1 sous sa forme GTP active se fixe à la membrane du RE et recrute alors le complexe Sec23-Sec24 (Figure 13). Sec24 interagit avec le domaine cytoplasmique de la protéine transmembranaire « cargo » et de ce fait est responsable de la concentration de ces cargos et de leur incorporation dans les vésicules COP-II. Notons que Sar1 a également été impliquée dans ce processus (Fromme et al., 2008). Le

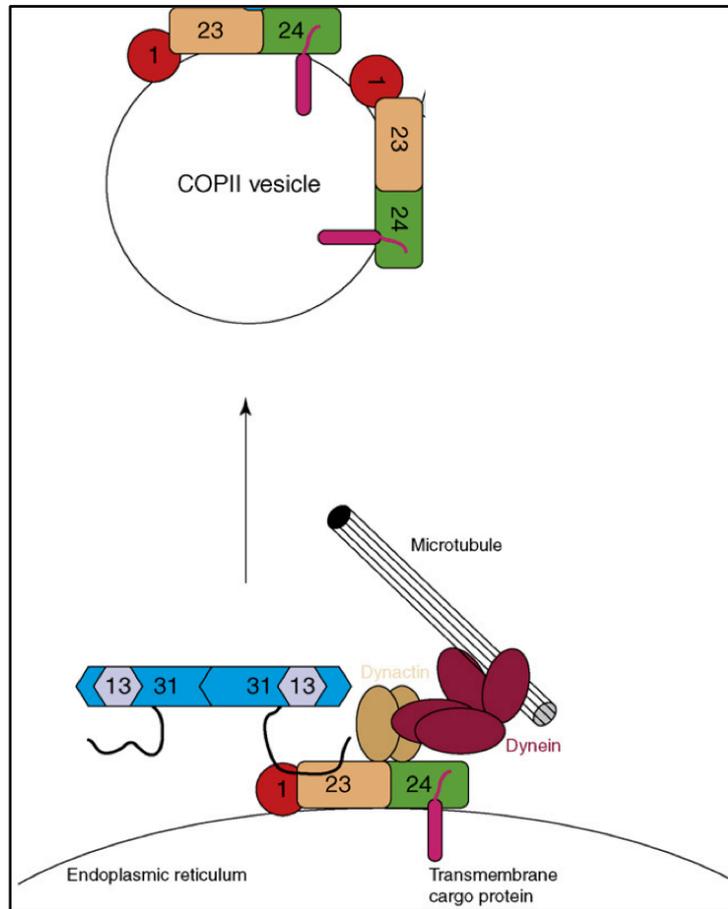


Figure 13 : Formation de vésicule à manteau COP-II

La vésicule COP-II est synthétisée au niveau du RE et est formée d'un complexe à 5 sous-unités : une petite GTPase Sar1 (boule rouge), le dimère Sec23-Sec24, et le dimère Sec13-Sec31. Sec23-Sec24 forme le manteau interne et Sec-13-Sec31 le manteau externe. Sar1 sous sa forme GTP se lie à la membrane et recrute, de concert avec la protéine cargo, le complexe COP-II. La vésicule est transportée sur des microtubules grâce à des moteurs moléculaires tels que la dynéine (Fromme et al., 2008).

mécanisme de recrutement de COP-II au niveau de la membrane du RE est cependant encore mal compris. Bien qu'il est admis que la protéine cargo sert d'adaptateur comme décrit ci-dessus, il a été montré que la formation du manteau COP-II pouvait être complètement indépendante du cargo et qu'un liposome enrichi en PIP ou en PIP2 était suffisant pour cet assemblage (Nickel et al., 1998). Notons que le même constat a été observé avec le manteau protéique clathrine. Lorsque la vésicule COP-II contenant la protéine cargo est formée, elle sera arrimée au site Cis d'entrée du Golgi grâce aux complexes t- et v-SNARES (Spang, 2009). Les SNARES sont responsables de la reconnaissance et de la fusion des vésicules sur un compartiment membranaire cible. Lorsque la protéine cargo arrive au niveau du site d'entrée cis-Golgi grâce à une vésicule COP-II, elle continuera sa route de la face cis puis médiane jusqu'à la face trans-Golgienne.

La question qui reste débattue au jour d'aujourd'hui est de comprendre comment se fait le transport intra-Golgien de la face cis à la face trans. Suite à un symposium, des spécialistes du Golgi se sont réunis afin d'établir un consensus sur le transport intra-Golgien et sont arrivés à la conclusion suivante : il n'y a pas de consensus (Emr et al., 2009). Trois hypothèses qui ne sont pas forcément exclusives existent : la maturation des citernes golgiennes, le trafic vésiculaire et le transport tubulaire.

La thèse de la maturation des citernes repose sur l'étude du procollagène I mammalien qui se forme sous forme d'un trimère dans le RE puis qui s'assemble dans le Golgi sous forme d'agrégats cylindriques volumineux (Beck et al., 1996). Le transport intra-Golgien du procollagène I se fait de façon indépendante du transport vésiculaire notamment à cause de la taille de ces agrégats, mais cette protéine traverse le Golgi sans même quitter la face luminale des citernes (Bonfanti et al., 1998). Ceci suggère que le transport du procollagène se fait par la progression des saccules de la face Cis à la face Trans, autrement dit grâce à la maturation des citernes. Cette maturation des citernes golgiennes a été visualisée chez la levure grâce à un marquage fluorescent des citernes précoces (en vert) et des citernes tardives (en rouge) (Losev et al., 2006). Le résultat de cette expérience indique que lorsqu'on regarde le devenir des marqueurs, on constate une conversion du vert en rouge, ce qui prouve qu'un processus de maturation des citernes s'opère au fur et à mesure qu'on passe d'une citerne Cis vers une citerne Trans (Losev et al., 2006).

La thèse du trafic vésiculaire vient du fait que des protéines transmembranaires résidentes du Golgi sont capables de se déplacer d'une citerne à l'autre, ce qui implique la possibilité d'un trafic vésiculaire et/ou tubulaire (Emr et al., 2009). D'autre part, le complexe COP-I a été

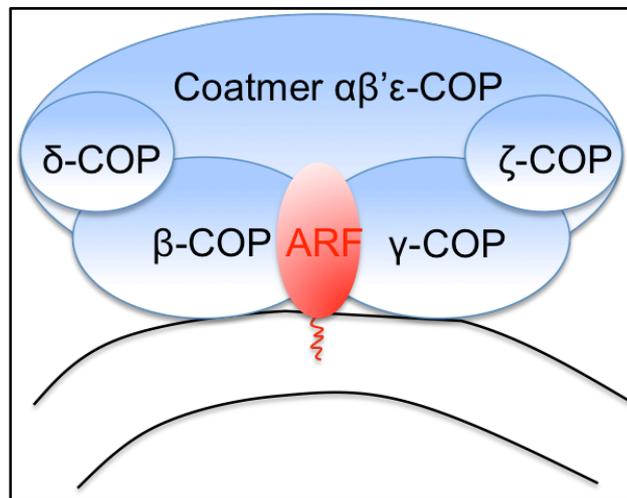


Figure 14 : Le complexe COP-I

Le transport rétrograde est assuré par des vésicules COP-I. Le COatmer COP-I est formé par un complexe heptamérique formé par les sous-unités α -COP, β -COP, β' -COP, γ -COP, δ -COP, ε -COP et ζ -COP ainsi que de la petite GTPase Arf1. C'est cette dernière qui sous sa forme GTP, va se lier à la membrane et initier l'assemblage du manteau protéique COP-I.

potentiellement décrit dans le transport antérograde ce qui est inattendu sachant que COP-I est largement impliqué dans le trafic rétrograde. Des études ultrastructurales ont montré que des vésicules COP-I issues du Golgi contenaient la protéine VSV-G et la proinsuline, marqueurs du transport antérograde (Orci et al., 1997). De plus pour appuyer cette hypothèse, des études ont montré que le transport antérograde de VSV-G depuis le cis vers le trans-Golgi est dépendant de la t-SNARE GS27, suggérant que le trafic vésiculaire est crucial dans le transport intra-Golgien (Nickel et al., 1998). Enfin, la perte de fonction de la sous-unité β -COP du complexe COP-I induit une accumulation de la protéine VSV-G dans le site cis du Golgi (Styers et al., 2008). Cependant chez la levure *S. cerevisiae*, des souches mutantes thermosensibles pour COP-1 ne présentent pas un arrêt de la maturation des citernes golgiennes et la sécrétion des cargos apparaît normale (Gaynor and Emr, 1997).

La troisième hypothèse concernant un trafic tubulaire repose sur l'observation de la morphologie des différentes citernes du Golgi, présentant des tubules membranaires qui peuvent faire la connexion entre ces saccules (Mironov et al., 1997). Des études de tomographie électronique ont révélé que les différentes citernes peuvent être connectées et que de petites molécules telles que l'albumine et la proinsuline peuvent emprunter ces tubules pour diffuser d'une citerne à l'autre (Emr et al., 2009).

III.5.2 Le transport rétrograde

Les protéines résidentes du RE (telle que BiP) qui sont adressées au Golgi doivent faire le cheminement inverse pour retourner au RE. Ces protéines possèdent un motif K-D-E-L reconnu par le récepteur-KDEL et sont transportées grâce à des vésicules tapissées de la protéine d'enveloppe COP-I au niveau de l'appareil de Golgi. COP-I est un complexe protéique heptamérique formé du COatmer composé des sous-unités α -COP, β -COP, β' -COP, γ -COP, δ -COP, ϵ -COP et ζ -COP, ainsi que de la GTPase Arf1 (Figure 14). Arf1 et les sous-unités du COatmer sont des protéines cytosoliques solubles, qui sont recrutées sur la membrane du Golgi à travers une réaction dépendante du GTP. Ici, c'est la GTPase Arf1 myristoylée qui, en se fixant sur la membrane du Golgi sous sa forme GTP, va recruter l'heptamère coatmer et donc initier la formation des vésicules COPI (Nickel et al., 2002). Ce recrutement n'est pas dépendant de la composition lipidique de la membrane donneuse ni de la présence de la protéine cargo. Seuls le COatmer, la protéine Arf1 et le GTP sont suffisants pour former des vésicules tapissées de COP-I d'un diamètre de 50 nm à partir de liposomes à

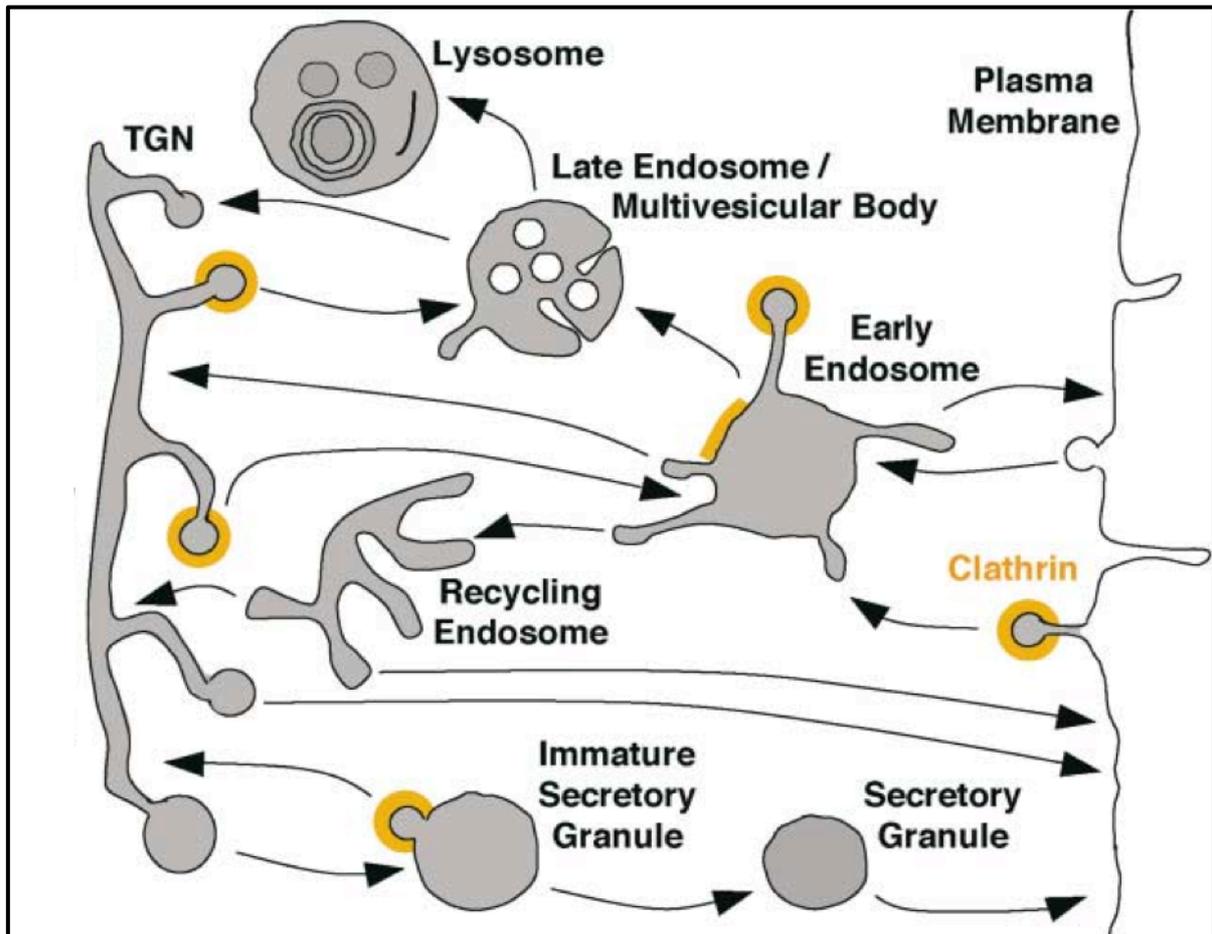


Figure 15 : Vue d'ensemble du trafic post-Golgi

Le TGN constitue le site de sortie des protéines issues de l'appareil de Golgi. Dans cette région, les protéines ont terminé leur maturation et sont biochimiquement actives et prêtes à être envoyées dans les compartiments cibles. Le TGN se présente donc comme une plateforme de tri protéique. Selon la nature de la protéine cargo, elle sera sélectivement envoyée vers la membrane plasmique (sécrétion constitutive), dans les granules de sécrétion (sécrétion contrôlée), vers les endosomes/lysosomes. (Bonifacino and Glick, 2004)

composition lipidique très variée (Nickel et al., 2002). Des études en microscopie électronique ont montré que le récepteur au KDEL, impliqué dans le transport rétrograde vers le RE (cas de la protéine BiP) est empaqueté dans des vésicules positives pour COP-I.

III.6 Le trafic post-Golgi

Les protéines destinées à la sécrétion, les protéines lysosomales et les protéines transmembranaires à destination de la membrane plasmique, continuent leur cheminement antérograde et atteignent le TGN. Le TGN constitue « une plateforme de tri » à partir de laquelle bourgeonnent de nombreuses vésicules en direction des compartiments cibles (Figure 16).

III.6.1 Le trafic post-Golgi COP-I dépendant

Outre son implication dans le transport intra-Golgien, COP-I intervient dans le transport post-Golgi. La protéine transmembranaire Cav1 est produite au niveau du TGN et est transportée à la membrane plasmique. La déplétion de COP-I perturbe le transport de Cav1 à la membrane plasmique et perturbe la morphologie des endosomes de recyclage (Styers et al., 2008). Enfin, en 2009, l'équipe de Sharon Tooze a démontré le rôle de COP-I dans la maturation des endosomes précoces et dans la formation d'autophagosomes. En effet, la perte de fonction de COP-I résulte en l'accumulation d'autophagosome, un défaut de recyclage de la transferrine et perturbe l'internalisation et la dégradation de l'EGF (Razi et al., 2009).

III.6.2 Le trafic post-Golgi clathrine dépendant

La clathrine est un complexe structural multiprotéique impliqué dans la formation de vésicules de transport. Elle est largement impliquée dans la formation de vésicules au niveau du trafic post-Golgi, contrôlant ainsi le transport de protéines cargos depuis le TGN vers les endosomes/lysosomes et vers la membrane plasmique. Elle intervient également dans l'endocytose à la membrane plasmique (Figure 15).

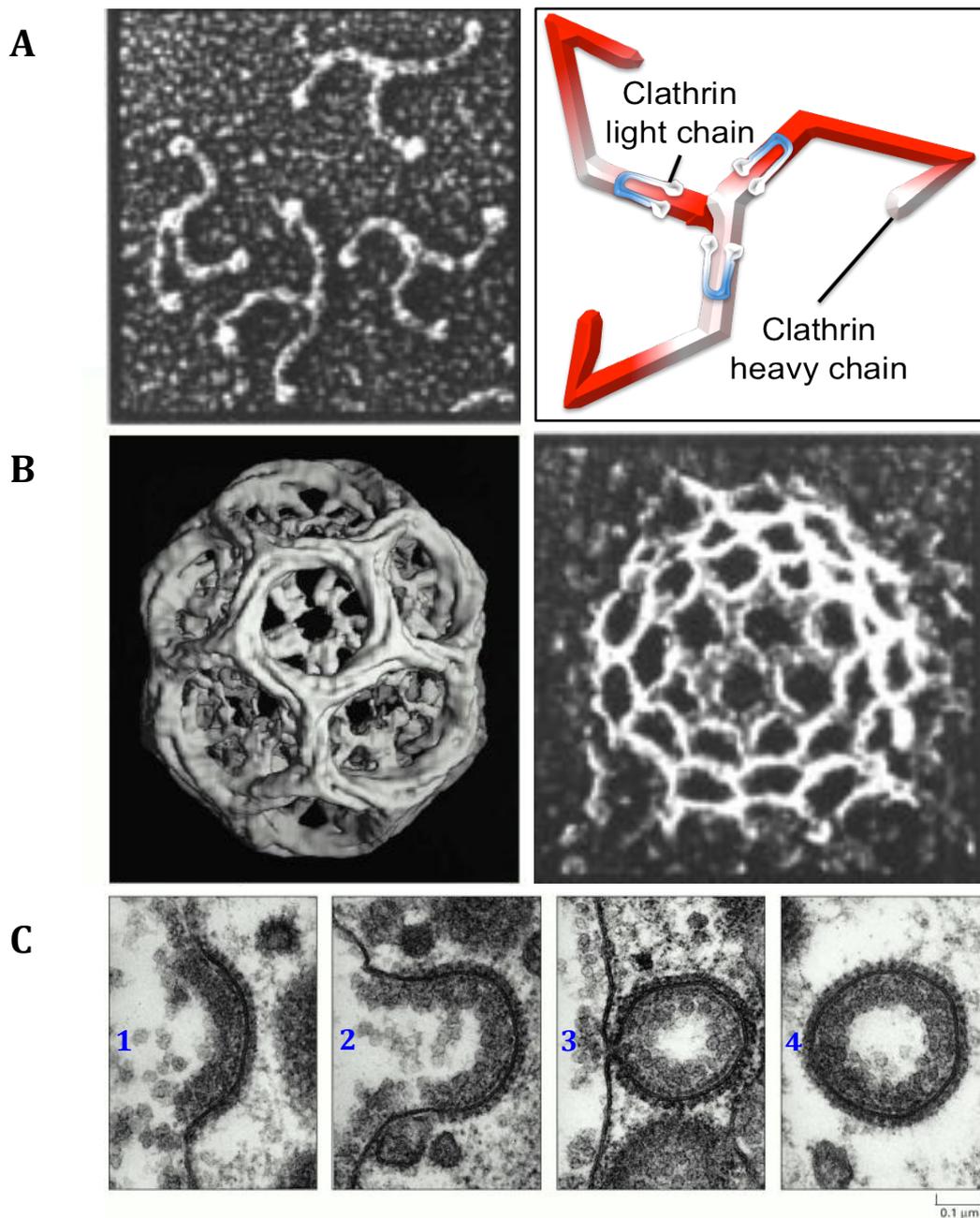


Figure 16 : Conformation de la « cage » de clathrine

A) Structure en triskelion de la clathrine en microscopie électronique. Elle est constituée de trois chaînes légères et de trois chaînes lourdes. **B)** Structure d'une vésicule tapissée de clathrine « cage de clathrine » modélisée (à gauche) et observée en microscopie électronique (à droite). **C)** Biogenèse de la vésicule à clathrine : la clathrine s'accumule au niveau de la membrane (1) et la polymérisation va induire une courbure de celle-ci (2). Ensuite, une constriction ou « cou » se forme entre la vésicule et la membrane donneuse (3) à ce niveau, le processus de scission régulé par la dynamine permettra de libérer la vésicule (4) (Schmid, 1997).

III.6.2.1 Conformation structurale de la clathrine

La clathrine fut caractérisée par Barbara Pearse en 1975. En purifiant des vésicules de différents tissus tels que le cerveau ou la glande surrénale, elle nota la présence d'une structure tapissant les vésicules qu'elle nomma « clathrine ». En microscopie électronique, le manteau de clathrine se présente sous forme d'un réseau d'hexagones ou de pentagones (Pearse, 1976) et la vésicule forme un diamètre d'environ 100 à 200 nm (Figure 16B). Des études ultérieures ont par la suite montré que la clathrine est constituée d'un hexamère de trois chaînes légères et de trois chaînes lourdes qui s'associent entre elles au niveau de leurs extrémités C-terminales, dessinant un triskélion de clathrine (Crowther and Pearse, 1981) (Figure 16A). La clathrine est essentielle chez *C. elegans* et la drosophile alors que les organismes eucaryotes unicellulaires tels que la levure et *Dictyostelium* sont capables de survivre sans (Robinson, 1994).

A l'instar des manteaux protéiques COP-I et COP-II, la polymérisation de la clathrine initie la formation de vésicule enveloppée de clathrine dont la conformation en microscopie électronique ressemble à une cage, d'où l'appellation « cage de clathrine » très caractéristique (Figure 16B-C). De par sa conformation tridimensionnelle, la polymérisation de la clathrine va induire une courbure de la membrane dans le but de produire une vésicule qui bourgeonne de la membrane donneuse (Figure 16). La clathrine se localise aussi bien au niveau du TGN qu'au niveau de la membrane plasmique et sur les endosomes (Traub et al., 1993) (Burtey et al., 2007).

III.6.2.2 Formation de la vésicule à clathrine

La clathrine est produite dans le cytosol et est incapable de se lier directement à une membrane lipidique. Elle nécessite donc la présence d'adaptateurs qui eux sont recrutés au niveau de la membrane et à leur tour vont permettre de recruter la clathrine. Les adaptateurs qui remplissent cette fonction sont des complexes monomériques ou multimériques connus sous le nom de complexes adaptateurs pour la clathrine ou « AP complex ». Ces complexes AP sont eux mêmes cytosoliques et nécessitent d'autres protéines pour être recrutés à la membrane. Le mécanisme de recrutement du complexe AP et ensuite de la clathrine est bien caractérisé (Figure 17). La GTPase myristoylée Arf1 sous sa forme liée à un GTP activé par la GEF Big1/2 s'associe à la membrane cible et initie ce processus. C'est elle, ainsi que la présence de la protéine cargo dont la queue cytosolique se lie au complexe AP, qui permettent

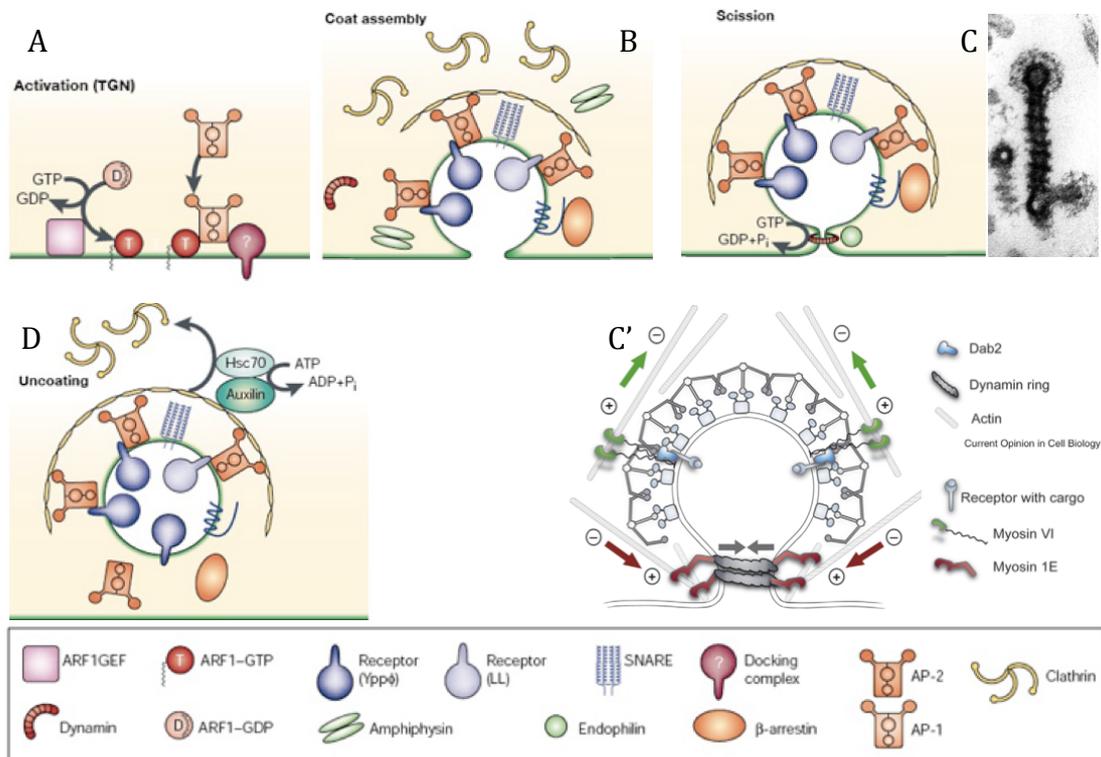


Figure 17 : Formation d'une vésicule à clathrine

La GTPase Arf1 sous sa forme GTP, catalysée par une Arf-GEF, se lie à la membrane et initie la biogenèse de la vésicule (A). Arf1-GTP fixée à la membrane va recruter le complexe adaptateur AP-1 qui va à son tour recruter la protéine cargo (ici Receptor). Les complexes APs vont à leur tour recruter la clathrine qui se polymérise et induit une force mécanique pour générer une vésicule caractéristique (B). L'étape tardive de ce processus consiste à libérer la vésicule de la membrane dont elle est issue. Au niveau de la constriction, l'endophiline va faciliter le recrutement de la GTPase dynamine, qui de concert avec les forces opposées de l'actine et des myosines va induire la scission de la vésicule (C et C'). Lorsque la vésicule est libérée elle va perdre son manteau de clathrine selon le processus de « uncoating » catalysé par la protéine chaperonne Hsc70 et son cofacteur l'auxilin selon une réaction dépendante de l'ATP. (Kirchhausen, 2000)

ainsi de recruter le complexe AP au niveau de la membrane (Figure 16C-1 et figure 17A) (Le Borgne and Hoflack, 1997). Enfin, lorsque le complexe AP se localise sur la membrane d'intérêt, il recrute la clathrine par interaction directe (Figure 17B) (Robinson, 1994). Le triskélion de clathrine s'assemble pour former un tapis de clathrine qui polymérise et grâce à sa conformation polyédrale, la clathrine va induire une force mécanique qui va incurver la membrane et produire une structure vésiculaire attachée à la membrane donneuse (Figure 17B-C et Figure 16-2) (Kirchhausen, 2000 ; Schmid, 1997 ; Mellman, 1996).

III.6.2.3 Scission de la vésicule

La libération de la vésicule tapissée de clathrine va être médiée par une GTPase à domaine PH, la dynamine, qui va se localiser au niveau de l'espace formé entre la vésicule et la membrane de laquelle elle est issue. La dynamine par son activité GTPase va jouer un rôle mécano-chimique en dimérisant puis en polymérisant et ainsi induire une constriction à ce niveau, formant un anneau autour du « cou » de la vésicule (Figure 16C-3 et Figure 17C) (Mellman, 1996). Des études récentes montrent l'implication de l'endophiline qui facilite le recrutement de la dynamine dans cette région du « cou » permettant ainsi la libération de la vésicule recouverte de clathrine (Sundborger et al.). D'autres études ont montré l'implication de WASP et de Arp2/3 au niveau du puits de clathrine, induisant ainsi l'accumulation de l'actine à ce niveau et donc potentialisant la formation et la scission de la vésicule à clathrine (Benesch et al., 2005). Enfin, des moteurs moléculaires sont également impliqués dans ce processus. La Myosine VI qui se déplace vers l'extrémité (-) du filament d'actine, se lie à l'enveloppe de clathrine via la protéine Dab2, ce qui aura pour effet de tirer la vésicule vers le cytoplasme (Ungewickell and Hinrichsen, 2007). Tandis que la Myosine 1E qui se déplace vers l'extrémité (+) de l'actine se lie à la dynamine, ce qui permettra de tirer l'anneau de dynamine vers la membrane du Golgi ou la membrane plasmique (Ungewickell and Hinrichsen, 2007). L'ensemble Dynamine, actine et les moteurs myosine va permettre de détacher la vésicule de la membrane.

III.6.2.4 Processus de « désassemblage » et motilité de la vésicule

La vésicule ainsi libérée va ensuite rapidement perdre son enveloppe de clathrine. Ce processus de « désassemblage » se déroule grâce à la protéine chaperonne Hsc70 qui est

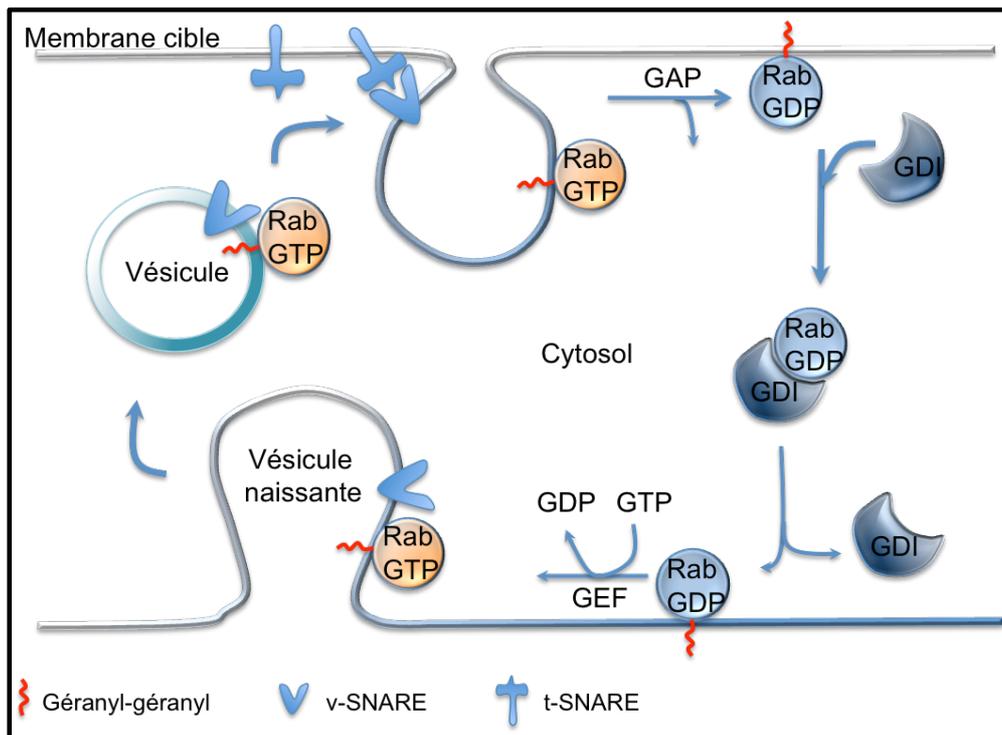


Figure 18 : Les protéines Rabs sont essentielles au trafic vésiculaire

Les protéines Rabs sont des protéines cytosoliques qui sous leur forme activée liée à un GTP s'associe à la membrane grâce à un motif gényl-gényl. Ces protéines oscillent entre une forme liée à un GTP catalysée par une GEF et une forme GDP catalysée par une GAP. Sous forme GDP, les Rabs sont séquestrées par la RhoGDI dans le cytoplasme. Les Rabs sont impliquées dans la biogenèse des vésicules mais aussi dans la motilité des vésicules ainsi que dans l'arrimage de celles-ci sur la membrane receveuse. Notons l'implication aussi importante de la t-SNARE et de la v-SNARE dans l'arrimage et dans la fusion de la vésicule à la membrane cible. (Adapté d'après Pfeffer, 1994)

recrutée sur la vésicule à clathrine par son cofacteur l'auxilin, suivant une réaction ATPase dépendante (Figure 17D) (Massol et al., 2006).

Le transport de protéine cargo dans les vésicules issues du Golgi nécessite le réseau d'actine et les microtubules ainsi que les protéines moteurs qui leur sont associées. Les microtubules servent de rails pour transporter la vésicule vers un compartiment donné. Ce processus est assuré par les moteurs kinésines et dynéines. Les kinésines se déplacent vers l'extrémité (+) des microtubules et sont impliquées dans le transport des vésicules à partir du Golgi vers la surface cellulaire tandis que les moteurs dynéines se déplacent vers l'extrémité (-) des microtubules, contrôlant ainsi le transport de vésicules vers le Golgi (Caviston and Holzbaur, 2006 ; Hehnly and Starnes, 2007). D'autres études ont démontré l'implication des protéines GTPases Ras-like de la famille des Rab dans la régulation fonctionnelle de la myosine et dans le processus de transport des organites (Seabra and Coudrier, 2004). Les protéines Rab sont essentielles et très largement impliquées dans le processus de transport vésiculaire entre les différents organites. Ces études démontrent donc un rôle émergent des GTPases Rab dans le recrutement des moteurs myosines au niveau de la membrane des organites tels que le mélanosome, les vésicules de sécrétion ou encore les endosomes de recyclage, facilitant ainsi leur motilité (Seabra and Coudrier, 2004).

III.6.3 Arrimage des vésicules sur la membrane cible

Après avoir été générées à travers un processus de bourgeonnement au niveau d'une membrane donneuse, les vésicules sont transportées vers un compartiment cible avec lequel elles vont fusionner (Bonifacino and Glick, 2004). Cette fusion requiert des machineries moléculaires très conservées : les Rab-GTPases et les SNAREs.

III.6.3.1 Les Rab-GTPases : des éléments clés du trafic vésiculaire

Les protéines Rab-GTPases sont des membres de la grande famille Ras et sont essentielles pour le trafic membranaire. Découvertes dans les années 80, ce sont des protéines cytosoliques qui ont subi une modification de prénylation par l'ajout de résidu géranylgeranyl décrits précédemment. Ces protéines oscillent entre une forme liée à un GTP catalysée par une Rab-GEF et une forme GDP catalysée par une Rab-GAP (Figure 18). C'est sous sa forme Rab-GTP active que cette protéine se fixe à une membrane et facilite la biogenèse de la

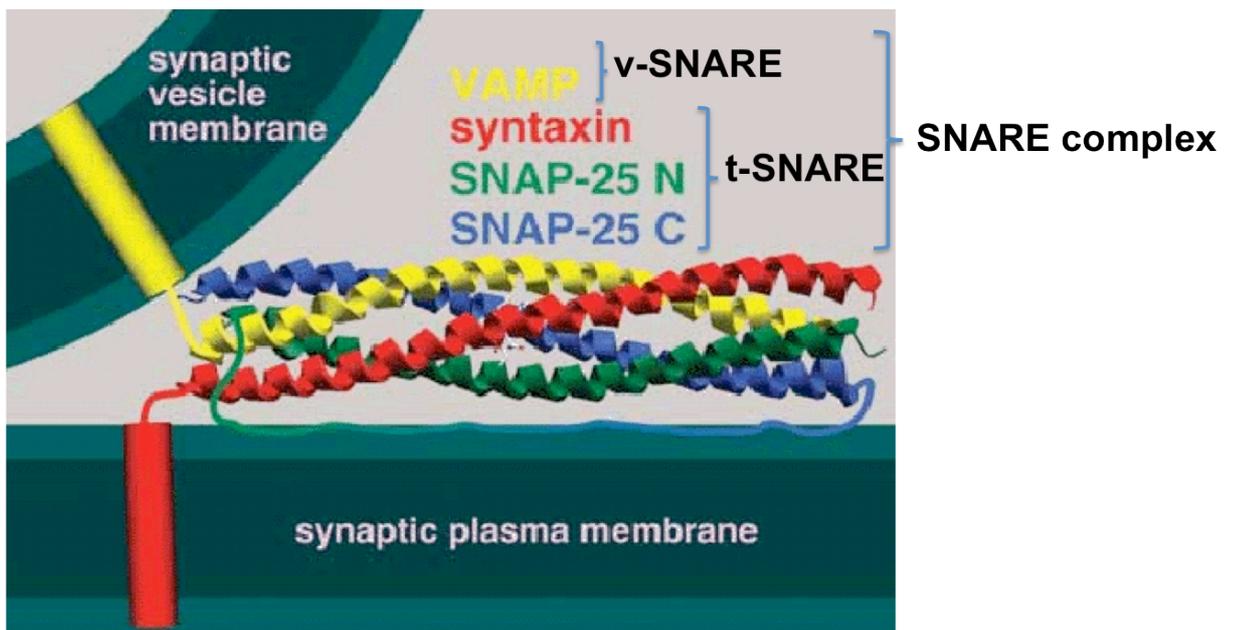


Figure 19 : Le complexe SNARE

Le complexe SNARE est composé de la v-SNARE localisée sur la vésicule et de la t-SNARE située sur la membrane cible (target). La t- et la v-SNARE s'associent étroitement, permettant l'accrochage de la vésicule sur la membrane cible afin de permettre la fusion subséquente des deux membranes. La v-SNARE est composée de la protéine transmembranaire VAMP et la t-SNARE est constituée de la protéine intégrale Syntaxine ainsi que de deux protéines palmitoylées SNAP-25. (D'après Bonifacino and Glick, 2004)

vésicule depuis la membrane donneuse ainsi que l'arrimage et la fusion de cette vésicule sur la membrane receveuse (Pfeffer, 1994). La modification lipidique (géranyl-géranyl) est essentielle afin de permettre l'association de la protéine Rab à la membrane. Quant à la forme Rab-GDP, elle interagit avec une protéine cytosolique RabGDI pour « Rab GDP Dissociation Inhibitor » qui la séquestre lorsqu'elle est inactive (Figure 18). Cette GDI joue un rôle important dans l'adressage de Rab-GDP vers la membrane d'intérêt où elle est requise et, grâce à la Rab-GEF, elle sera activée pour assurer son activité biologique. Comme je l'ai évoqué précédemment, les RabGTPases sont également impliquées dans la motilité des vésicules/organites (Seabra and Coudrier, 2004).

Ce qu'il y a de remarquable dans la localisation des protéines Rabs c'est leur distribution subcellulaire distincte. Chaque Rab se trouve associée spécifiquement à un stade particulier du transport intracellulaire. Ainsi, la GTPase Rab1 localisée au niveau du RE est impliquée dans le trafic entre le RE et le Golgi, Rab5 associée avec les endosomes précoces, dans le processus d'endocytose précoce et Rab8 dans le transport du TGN vers la membrane plasmique basolatérale (Novick and Brennwald, 1993). De la même façon Rab7 se localise sur les endosomes tardifs alors que Rab27 est présente sur des organites assimilés aux lysosomes (Seabra and Coudrier, 2004). Rab4 et en particulier Rab35 sont impliquées dans la voie de recyclage rapide et cette fonction de recyclage de Rab35 est requise pour la division cellulaire et plus particulièrement pour la cytokinèse (Kouranti et al., 2006). D'autres protéines Rabs telles que Rab11 et Rab25 ont été décrites associées avec des endosomes de recyclage apical dans les cellules polarisées MDCK (Casanova et al., 1999). Concernant les endosomes de recyclage basolatéraux, c'est la GTPase Rab10 conservée, qui est impliquée dans ce processus tant chez les mammifères que chez le nématode *C. elegans* (Schuck et al., 2007 ; Chen et al., 2006). Quant à Rab8, elle a été décrite aussi bien dans un processus de transport vers la membrane apicale des cellules intestinales de souris (Sato et al., 2007 ; Kato et al., 2009) que vers la membrane basolatérale des cellules MDCK (Huber et al., 1993 ; Ang et al., 2003). Le fait qu'il y ait une Rab-GTP spécifique localisée sur un organite particulier (ER, Golgi, endosome précoce, tardif, de recyclage), fait des protéines Rabs de véritables marqueurs des compartiments endomembranaires.

III.6.3.2 Attachement et fusion de la vésicule sur la membrane receveuse

Outre les Rab-GTPases impliquées dans l'arrimage et la fusion des vésicules sur la membrane cible, on trouve également un rôle essentiel du complexe multiprotéique appelé SNARE



Figure 20 : Structure de l'adaptateur monomérique GGA

L'adaptateur monomérique GGA pour Golgi-localised, Gamma adaptin-ear-containing, Arf-binding est constitué de trois domaines et d'une région charnière qui possèdent tous une fonction particulière. Ainsi, le domaine VHS situé en N-terminale reconnaît spécifiquement le motif cytoplasmique « dileucine » de la protéine cargo alors que le domaine GAT est spécialisé dans l'interaction avec Arf1 et avec la membrane du Golgi grâce à l'affinité que possède cette région pour PI4P. Enfin la région charnière (Hinge) et le domaine GAE permettent l'association avec la clathrine ainsi qu'avec le cargo.

(Pevsner and Scheller, 1994). Deux types de complexes SNARE sont caractérisés selon leur localisation : la v-SNARE (v = vésicule) qui se localise sur la vésicule et la t-SNARE (t = target) qui elle se localise sur la membrane cible (Figure 19) (Bonifacino and Glick, 2004). Les SNAREs sont des protéines transmembranaires ancrées à la membrane lipidique au niveau de l'extrémité C-terminale. La v-SNARE est constituée de la protéine intégrale VAMP/Synaptobrevin alors que la t-SNARE est formée par un complexe multiprotéique (Figure 19). En effet, cette dernière est constituée de la protéine intégrale Syntaxine ainsi que d'un dimère de la protéine non intégrale SNAP-25 qui néanmoins s'associe à la membrane du fait qu'elle soit palmitoylée (Gonzalo et al., 1999). Le complexe SNARE correspond à l'association de la v- et de la t-SNARE qui forme alors une « grappe » d'accrochage stable permettant d'associer la vésicule à la membrane. Cette étape d'accrochage de la vésicule sur la membrane est cruciale car ce contact étroit entre ces deux entités permet par la suite la fusion des deux membranes. Ainsi, au vue de la fonction biologique remplie par le complexe SNARE, on comprend son implication essentielle dans le transport et dans la sécrétion protéique médiés par des vésicules.

Des études récentes chez *C. elegans* ont permis de caractériser la fonction d'un membre de la famille de SNAP-25, appelé SNAP-29 (Kang et al.). Kang et collaborateurs ont montré l'implication de SNAP-29 dans le processus de sécrétion et de transport de protéines transmembranaires qu'elles soient apicales ou basolatérales. Par ailleurs, cette étude a révélé l'existence d'une interdépendance entre SNAP-29 et les endosomes de recyclage et en particulier son rôle en amont de RME-1 impliqué dans le processus de recyclage basolatéral chez *C. elegans* (Chen et al., 2006).

III.6.4 Les complexes adaptateurs pour la clathrine

Le recrutement et l'assemblage de la clathrine sur une membrane d'intérêt, nécessitent le recrutement des complexes adaptateurs. Ces adaptateurs ont la capacité de se lier à la clathrine et peuvent être soit monomériques soit multimériques.

III.6.4.1 Les adaptateurs monomériques

La protéine GGA (pour Golgi-localised, Gamma adaptin-ear-containing, Arf-binding) définit une nouvelle famille de protéines adaptatrices ubiquitairement exprimées chez les

mammifères (3 GGAs) et chez la levure (2 GGAs). Cette protéine a une structure modulaire formée par un domaine VHS en N-terminale, une région appelée GAT et un domaine GAE qui présente une similitude avec « l'oreille » de la sous unité γ du complexe adaptateur AP-1 (Figure 20) (Dell'Angelica et al., 2000). GGA est un composant du complexe d'enveloppe associé au niveau du TGN et dépendant de la GTPase Arf1 aussi bien chez les mammifères que chez la drosophile (Dell'Angelica et al., 2000 ; Kametaka et al., 2010). Le domaine VHS est le site de reconnaissance du motif cytoplasmique « dileucine » de la protéine cargo alors que le domaine GAT est impliqué dans diverses interactions : notamment avec la forme active de Arf1 mais aussi avec la membrane du Golgi (Dell'Angelica et al., 2000). En effet, la membrane du Golgi est particulièrement enrichie en PhosphoInositide-4-Phosphate (PI4P) et récemment il a été montré que GGA se lie avec ce phosphoinositide grâce a son domaine GAT (Wang et al., 2007). Ces mêmes auteurs on démontré que ce domaine GAT est également responsable de l'interaction avec l'ubiquitine, qui ici se présente comme un motif signalétique de transport notamment pour le transporteur GLUT-4. Quant à la région charnière « hinge domain » elle permet l'association avec la clathrine et accessoirement l'interaction avec la protéine cargo (Kametaka et al., 2010). Kametaka et collaborateurs ont démontré que la protéine adaptatrice GGA se localise au niveau du TGN suivant une réaction dépendante d'Arf1 où elle s'associe avec le motif dileucine de la queue cytoplasmique de la protéine cargo Lerp, l'homologue drosophile du récepteur mannose 6 phosphate. Ainsi GGA est impliqué dans le transport de Lerp entre le TGN et le lysosome (Kametaka et al., 2010).

La β -arrestine est une autre protéine monomérique capable de recruter la clathrine au niveau de la membrane (Robinson M.S., 2004). Elle a été caractérisée pour la première fois dans l'internalisation du récepteur β 2-adrénergique. En effet, ce récepteur activé recrute la β -arrestine au niveau de la face cytoplasmique de la membrane plasmique. La β -arrestine recrute à son tour la clathrine pour former un puits suivi de la formation de la vésicule tapissée de clathrine (Goodman et al., 1996). La β -arrestine se comporte donc comme un adaptateur pour la clathrine et est impliquée dans l'endocytose à la membrane du récepteur β 2-adrénergique. Il a été également montré que la chaîne β 2 du complexe adaptateur pour la clathrine AP-2 interagit avec la β -arrestine en double hybride (Kirchhausen, 1999) et nous savons qu'AP-2 est largement impliqué dans l'endocytose à la membrane plasmique, suggérant que la β -arrestine pourrait fonctionner de concert avec AP-2 pour promouvoir l'internalisation du récepteur β 2-adrénergique selon une réaction qui dépend de la clathrine. Il existe également des adaptateurs monomériques capables d'interagir avec AP-1 : EpsinR

interagit avec la sous-unité γ d'AP-1 et est capable de recruter la clathrine et de lier le phosphoinositide PI(4)P. EpsinR serait donc recruté au niveau du TGN mais n'est cependant pas essentiel pour correctement adresser les enzymes lysosomales (Hirst et al., 2003). Cependant, EpsinR est requis pour le transport rétrograde de toxine depuis les endosomes vers le TGN (Saint-Pol et al., 2004).

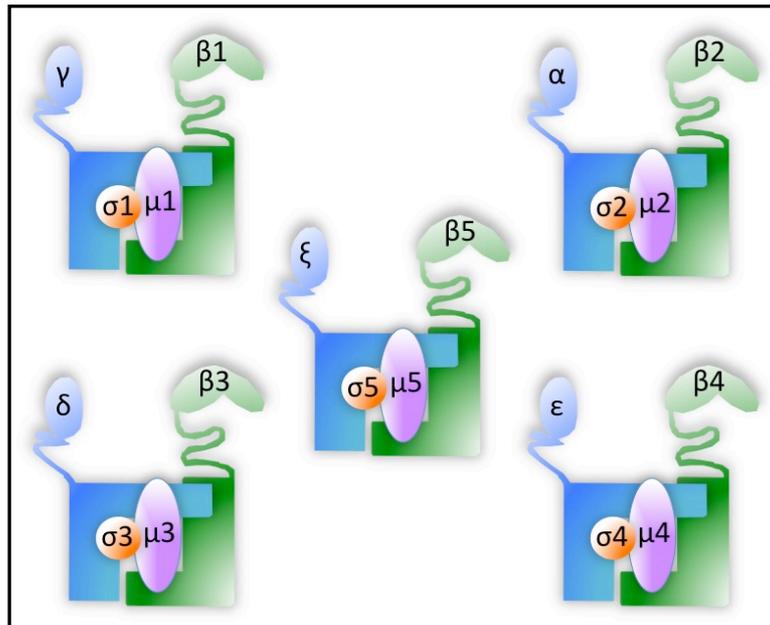
La γ Synergine représente un autre adaptateur qui interagit avec la sous-unité γ du complexe AP-1 mais ne lie ni la clathrine ni PI(4)P (Page et al., 1999).

III.6.4.2 Les adaptateurs multimériques : les complexes APs

Un second groupe d'adaptateurs est constitué par une famille de complexes protéiques hétérotétramériques d'environ 300 kDa appelé «Adaptor Protein complex» (Complexes APs). A l'origine appelés Assembly Polypeptide, ces complexes sont capables de réassembler le triskélion de clathrine en une structure vésiculaire de taille homogène (Zaremba and Keen, 1983). Les premiers adaptateurs identifiés dans la formation de vésicules furent AP-1 impliqué dans le trafic entre le TGN et les endosomes et AP-2 concernant le trafic initié au niveau de la membrane plasmique (Robinson, 2004). Deux autres adaptateurs ont été par la suite découverts par homologie de séquence pour les sous-unités d'AP-1 et AP-2 (Robinson and Bonifacino, 2001) : il s'agit d'AP-3 et AP-4 qui sont localisés au niveau du TGN et au niveau des endosomes avec un enrichissement spécifique d'AP-3 aux endosomes et AP-4 au TGN. Très récemment un cinquième complexe adaptateur AP-5 a été caractérisé chez les mammifères par le laboratoire de Robinson (Hirst et al., 2011). Ce nouveau complexe ne semble pas colocaliser avec la clathrine, faiblement avec les endosomes tardifs et est impliqué dans le transport du récepteur au mannose-6-Phosphate cation-indépendant.

Concernant l'organisation structurale de ces complexes hétérotétramériques, ils sont constitués de deux grandes chaînes (γ et $\beta 1$ pour AP-1, α et $\beta 2$ pour AP-2, δ et $\beta 3$ pour AP-3, ϵ et $\beta 4$ pour AP-4), d'une chaîne moyenne ($\mu 1$ pour AP-1, $\mu 2$ pour AP-2, $\mu 3$ pour AP-3, $\mu 4$ pour AP-4) et enfin d'une petite chaîne ($\sigma 1$ pour AP-1, $\sigma 2$ pour AP-2, $\sigma 3$ pour AP-3 et $\sigma 4$ pour AP-4) (Figure 21). Notons que chez les vertébrés, il existe 3 gènes codant pour la sous-unité $\sigma 1$ concernant le complexe AP-1. Tous ces complexes APs ressemblent à une tête de « Mickey » constituée des chaînes moyennes et petites ainsi que du domaine N-terminal des deux grandes chaînes. L'extrémité C-terminale flanquante des deux grandes chaînes forment les oreilles de Mickey (Boehm and Bonifacino, 2001 ; Robinson and Bonifacino, 2001).

A



B

Complex	Subunit	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>
AP-1	Large	<i>ap1g1</i> (γ1) <i>ap1g2</i> (γ2)	<i>ap1g1</i> (γ1) <i>ap1g2</i> (γ2)	<i>cg9113</i> (γ)	<i>y105e8e.j</i> (γ)
	Medium	<i>ap1b1</i> (β1) <i>ap1m1</i> (μ1A) <i>ap1m2</i> (μ1B)	<i>ap1b1</i> (β1) <i>ap1m1</i> (μ1A) <i>ap1m2</i> (μ1B)	<i>cg12532</i> (β1/2 ^a) <i>cg9388</i> (μ1)	<i>y71h2b.10</i> (β1/2 ^a) <i>k11d2.3</i> (Unc-101) <i>f55a12.7</i> (Apm-1)
	Small	<i>ap1s1</i> (σ1A) <i>ap1s2</i> (σ1B) <i>ap1s3</i> (σ1C)	<i>ap1s1</i> (σ1A) <i>ap1s2</i> (σ1B) <i>ap1s3</i> (σ1C)	<i>cg5864</i> (σ1)	<i>f29g9.3</i> (σ1)
AP-2	Large	<i>ap2a1</i> (α1) <i>ap2a2</i> (α2) <i>ap2b1</i> (β1)	<i>ap2a1</i> (α1) <i>ap2a2</i> (α2) <i>ap2b1</i> (β1)	<i>cg4260</i> (α) <i>cg12532</i> (β1/2 ^a)	<i>t20b5.1</i> (α) <i>y71h2b.10</i> (β1/2 ^a)
	Medium	<i>ap2m1</i> (μ2)	<i>ap2m1</i> (μ2)	<i>cg7057</i> (μ2)	<i>r160.1</i> (Apm-2)
	Small	<i>ap2s1</i> (σ2)	<i>ap2s1</i> (σ2)	<i>cg6056</i> (σ2)	<i>f02e8.3</i> (Aps-2)
AP-3	Large	<i>ap3d1</i> (δ) <i>ap3b1</i> (β3A) <i>ap3b2</i> (β3B)	<i>ap3d</i> (δ) <i>ap3b1</i> (β3A) <i>ap3b2</i> (β3B)	<i>cg11197</i> (δ) <i>cg11427</i> (β3)	<i>w09g10.4</i> (δ) <i>r11a5.1a</i> (β3)
	Medium	<i>ap3m1</i> (μ3A) <i>ap3m2</i> (μ3B)	<i>ap3m1</i> (μ3A) <i>ap3m2</i> (μ3B)	<i>cg3035</i> (μ3)	<i>f53h8.1</i> (μ3)
	Small	<i>ap3s1</i> (σ3A) <i>ap3s2</i> (σ3B)	<i>ap3s1</i> (σ3A) <i>ap3s2</i> (σ3B)	<i>cg3029</i> (σ3)	n/a (σ3)
AP-4	Large	<i>ap4e1</i> (ε) <i>ap4b1</i> (β4)	<i>ap4e1</i> (ε) <i>ap4b1</i> (β4)	n.p. ^b	n.p. ^b
	Medium	<i>ap4m1</i> (μ4)	<i>ap4m1</i> (μ4)		
	Small	<i>ap4s1</i> (σ4)	<i>ap4s1</i> (σ4)		

Figure 21 : Structure hétérotétramérique des complexes APs

(A) Les complexes adaptateurs pour la clathrine « AP complex » ont tous une organisation structurelle identique : ce sont des complexes hétérotétramériques, composés par deux grandes chaînes (sous-unités bleues et vertes), d'une petite chaîne (sous-unité orange) et d'une chaîne moyenne (sous-unité violette). La sous-unité β et plus particulièrement sa région charnière permet de recruter la clathrine, les sous-unités μ et β contribuent à la sélection du cargo. (B) Tableau récapitulatif représentant les 4 complexes APs ainsi que les gènes codant les différentes sous-unités dans les différentes espèces (D'après Bohem et Bonifacino, 2002).

Chaque sous-unité a une fonction bien précise dans le processus de formation de vésicule à clathrine. Ainsi, le domaine charnière de la sous-unité β est particulièrement important pour l'association avec la clathrine à travers une séquence consensus nommée « Clathrin Box » (Dell'Angelica et al., 1998), cependant les domaines charnières des sous-unités γ et α contribuent également à cette association (Goodman and Keen, 1995). Les sous-unités μ et β sont largement impliquées dans la sélection de la protéine cargo grâce aux motifs signalétiques présents au niveau de la queue cytoplasmique du cargo (Robinson and Bonifacino, 2001). AP-1 et AP-2 sont capables d'interagir avec la clathrine grâce à la séquence consensus contenue dans la sous-unité β « clathrin Box » et de la recruter au niveau de la membrane (Gallusser and Kirchhausen, 1993) alors qu'AP-4 ne présente pas cette séquence et est probablement impliqué dans un processus vésiculaire clathrine indépendant au niveau du TGN (Hirst et al., 1999). En effet, le groupe de Robinson a identifié AP-4 comme un nouveau complexe adaptateur qui cependant est incapable de recruter la clathrine et des études d'immuno-microscopie électronique n'ont montré aucun enrichissement d'AP-4 sur les vésicules à clathrine. Néanmoins, la sous-unité μ_4 d'AP-4 est capable de reconnaître un motif de transport de cargo, le signal tyrosine YXX Φ , suggérant que ce complexe est tout de même impliqué dans le transport de protéine cargo issue du TGN suivant une réaction dépendante d'Arf1 (Dell'Angelica et al., 1999 ; Boehm and Bonifacino, 2001). AP-4 a seulement été identifié chez l'homme et chez la souris.

Quant à AP-3, sa fonction adaptatrice pour la clathrine est très discutée. Chez les mammifères, AP-3 possède bien la séquence consensus nécessaire à l'interaction avec la clathrine et une colocalisation entre AP-3 et la clathrine a été observée tant en microscopie photonique qu'électronique (Dell'Angelica et al., 1998). Enfin, AP-3 est capable de recruter la clathrine sur des liposomes synthétiques (Drake et al., 2000). Cependant, AP-3 n'est pas enrichi sur des vésicules de clathrine purifiées et une déplétion d'AP-3 chez la levure présente un phénotype différent d'une déplétion de la clathrine (Robinson and Bonifacino, 2001). Notons que ce dernier aspect est cohérent car chez la levure, le domaine de liaison à la clathrine n'est pas conservé. Enfin, dans des cellules PC12, le bourgeonnement de vésicules dépend d'AP-3 mais ne requiert pas la clathrine (Robinson and Bonifacino, 2001).

Le recrutement à la membrane des complexes APs et en particulier AP-1 et AP-2 est également dépendant de la composition lipidique de la membrane cible. Le phosphoinositide PIP2 enrichi à la membrane plasmique est crucial dans le recrutement d'AP-2 (Beck and Keen, 1991). En effet, des sites d'interaction avec PIP2 ont été caractérisés dans les sous-

unités α et $\mu 2$ du complexe AP-2 et des mutations dans ces sites vont altérer la capacité d'AP-2 à se localiser correctement à la membrane plasmique (Gaidarov and Keen, 1999).

Quant à AP-1, des études récentes *in vitro* ont montré une interaction directe et spécifique avec le phosphoinositide PtdIns(4)P que l'on trouve majoritairement à la membrane du TGN. La déplétion de la kinase PI4KIIa qui permet de produire du PtdIns(4)P, induit une relocalisation cytosolique d'AP-1 au détriment d'une localisation au TGN ; ce phénotype peut être sauvé par l'ajout de PtdIns(4)P exogène (Wang et al., 2003).

Enfin, la possibilité que des hémicomplexes AP-1 et AP-2 puissent exister a été abordée par le laboratoire de Stuart Kornfeld (Doray et al., 2007). Doray et collaborateur ont montré que l'expression ectopique des hémicomplexes $\gamma/\sigma 1$ ou $\alpha/\sigma 2$ dans les cellules d'insectes sont capables de lier fortement le motif dileucine de nombreux cargos tandis que les hémicomplexes $\beta 1/\mu 1$ et $\beta 2/\mu 2$ sont peu ou pas capables de lier ce motif (Doray et al., 2007).

III.6.4.3 Sélection des protéines cargos

Les complexes APs, outre leur rôle dans la formation de vésicule, assurent le recrutement des protéines cargos. Ce recrutement se fait grâce aux motifs signalétiques retrouvés sur les queues cytosoliques des protéines cargo. Le motif le mieux caractérisé est celui basé sur la tyrosine reconnu par la sous-unité μ : le motif YXX Φ (où Φ est un acide aminé hydrophobe, Y la tyrosine et X n'importe quel acide aminé). Ce motif fut identifié pour la première fois dans la queue cytosolique du récepteur de la transferrine où il est utilisé pour permettre l'internalisation clathrine dépendante de ce récepteur depuis la membrane plasmique (Collawn et al., 1990). Ce motif est également impliqué dans le transport intracellulaire de LAMP-1 (Lysosome Associated Membrane protein-1) vers la membrane du lysosome (Robinson, 2004).

Un second motif basé également sur la tyrosine, NPXY a été identifié dans le récepteur au LDL, et ce fut par ailleurs le premier motif de transport dépendant de la clathrine identifié par Anderson et collaborateurs (Anderson et al., 1977). Il a ainsi montré qu'une mutation dans ce motif empêche toute internalisation du LDL à la membrane plasmique.

Un autre motif phare correspond à la séquence consensus dileucine : DXXLL, préférentiellement reconnu par la sous-unité β (Rapoport et al., 1998). Dès 1992, Letourneur a montré l'importance de ce motif Dileucine dans l'adressage correct des protéines lysosomales

(AP-1) et dans l'endocytose de CD3 (AP-2) (Letourneur and Klausner, 1992). C'est d'ailleurs sur la queue cytosolique de la protéine CD3 que le motif dileucine fut découvert pour la première fois et depuis d'autres protéines à motif dileucine ont été identifiées telles que le récepteur au mannose 6 phosphate, le transporteur de glucose Glut4 ou encore la protéine Nef (Robinson, 2004 ; Singh et al., 2009). Le cas de la protéine Nef, une protéine essentielle du HIV, est assez original : c'est la seule protéine non-transmembranaire connue possédant un motif dileucine dont le transport vers les endosomes est dépendant de la clathrine. Nef est une protéine cytosolique qui s'ancre à la membrane grâce à un résidu myristoyl en N-terminale (Robinson, 2004).

III.6.5 Fonctions non exhaustives des complexes APs

Dans ce paragraphe, je présenterai les fonctions des complexes adaptateurs AP-2, AP-3 et AP-4. J'aborderai ensuite dans le prochain chapitre de façon plus détaillée le cas d'AP-1, qui est le sujet principal de ma thèse.

III.6.5.1 AP-2 est impliqué dans l'endocytose à la membrane plasmique

Le complexe AP-2 est très largement impliqué dans l'endocytose à la membrane plasmique. AP-2 recrute la clathrine et possède une grande affinité pour le phosphoinositide PIP₂ (Gaidarov and Keen, 1999). Des kinases se lient avec le complexe AP-2 et phosphorylent la sous-unité μ 2 ce qui va permettre le recrutement d'AP-2 à la membrane plasmique, l'interaction avec la protéine cargo ainsi que son association avec la clathrine (Conner and Schmid, 2003). Les motifs dileucine et tyrosine sont tous deux reconnus par AP-2. Comme exemple d'internalisation de protéines transmembranaires nécessitant AP-2, nous pouvons citer les récepteurs au LDL et à la transferrine (LDLR et TfnR) qui sont localisés au niveau de la membrane plasmique. Tous les deux nécessitent une internalisation pour être ensuite recyclés à la membrane plasmique. Cette étape d'internalisation est médiée par la clathrine et par AP-2. L'inactivation de la sous-unité μ -2 induit une accumulation cytosolique de la sous-unité σ -2, ce qui, par ailleurs, est un constat général lorsqu'on analyse les complexes AP : la déplétion d'une sous-unité du complexe induit la dissociation de l'ensemble du complexe (Lui-Roberts et al., 2005 ; Meyer et al., 2000). Ainsi, la déplétion d'AP-2 cause un défaut d'internalisation de ces récepteurs (Boucrot et al., 2010). La molécule d'adhésion CAM-L1 est internalisée et recyclée de façon dynamique au cours du développement neuronal. Elle

possède un motif basé sur la tyrosine qui interagit avec la sous-unité μ -2, ce qui indique que cette internalisation est assurée par la clathrine de façon dépendante d'AP-2 (Kamiguchi et al., 1998). Cependant d'autres études ont montré qu'AP-2 n'est pas essentiel pour la formation de vésicule à clathrine issue de la membrane plasmique dans les cellules HeLa : l'internalisation du LDL et de l'EGF se fait aussi efficacement en présence ou en absence d'AP-2 (Motley et al., 2003). Ceci montre clairement que des adaptateurs alternatifs peuvent palier l'absence d'AP-2. Parmi ces protéines adaptatrices, Dab2 est capable de reconnaître le motif NPXY des protéines cargo et de concert avec AP-2 avec lequel elle interagit, elle va promouvoir l'internalisation du LDLR (Morris and Cooper, 2001).

Enfin, un processus d'endocytose dans lequel AP-2 est requis concerne les infections virales. C'est notamment le cas de l'internalisation de la protéine enveloppe virale (Env) Gp41 du virus HIV. Cette protéine transmembranaire possède un motif dileucine et un motif basé sur la tyrosine qui interagissent avec la sous-unité μ -2 d'AP-2 et les deux motifs sont essentiels à l'internalisation de Env-HIV (Byland et al., 2007).

III.6.5.2 AP-3 est impliqué dans le trafic entre le TGN et les endo-lysosomes

Le complexe AP-3 est un complexe hétérotétramérique dont la sous-unité μ -3 est codée par deux gènes, μ -3A et μ -3B qui ont un profil d'expression distinct. La sous-unité μ -3A est ubiquitairement exprimée tandis que μ -3B est spécifique du tissu neuronal (Pevsner and Scheller, 1994). AP-3 se localise au niveau du TGN et colocalise avec des marqueurs des compartiments endosomaux (Simpson F., et al., 1996). L'étude de la fonction d'AP-3 est simplifiée du fait de l'apparition spontanée de mutations chez les organismes modèles. Chez la drosophile par exemple, la couleur des yeux est largement dépendante des mutations touchant le complexe AP-3 alors que chez la souris et chez l'homme des mutations affectant les sous-unités β -3A et δ sont responsables du syndrome d'Hermansky Pudlak (HPS). Ce syndrome se traduit par une combinaison d'albinisme associée à une hémorragie prolongée, conséquences d'une anomalie affectant les lysosomes ou les organites assimilés aux lysosomes tels que les mélanosomes et les granules des plaquettes (Dell'Angelica et al., 1999). Sur un plan fonctionnel, la déplétion d'AP-3 est responsable d'un défaut de transport de protéines membranaires du lysosome telles que Lamp-1, Lamp-2, Limp-2 et CD63 en culture cellulaire (Robinson and Bonifacino, 2001). Chez la levure, la perte de fonction d'AP-3 induit une délocalisation des protéines membranaires de la vacuole, l'alkaline phosphatase

et Vam3p. Enfin, chez *C. elegans*, la formation des granules intestinaux, qui sont assimilés aux lysosomes, est dépendante d'AP-3 (Hermann et al., 2005). L'ensemble des données indique clairement un rôle essentiel du complexe AP-3 dans le transport entre les endosomes (Dell'Angelica, 2009) : transport depuis l'endosome précoce vers les endolysosomes et les endosomes assimilés aux lysosomes tels que les mélanosomes. Cependant AP-3 est également impliqué dans le transport entre le TGN et la vacuole chez *S. cerevisiae* (Dell'Angelica, 2009).

III.6.5.3 AP-4 : Trafic vers les endosomes et transport polarisé

Le complexe AP-4 se localise au niveau du TGN et il a été montré qu'ici encore la sous-unité μ -4 est impliquée dans la reconnaissance du motif basé sur la tyrosine de la protéine cargo. C'est notamment le cas de la protéine lysosomale LAMP-2 (et de façon moindre LAMP-1 et CD63) qui possède ce motif et colocalise avec AP-4 (Aguilar et al., 2001). En outre, la protéine chimère Tac dépourvue de tout autre motif signalétique auquel ce motif tyrosine est greffé, est reconnue par AP-4 et un traitement à la leupeptin, inhibiteur du lysosome, induit une accumulation intracellulaire de vésicules positives pour la protéine chimère. Par ailleurs, certaines de ces vésicules sont également positives pour les marqueurs des lysosomes LAMP-2 et CD63, ce qui suggère que ce motif est suffisant pour le transport vers les endosomes tardifs et vers les lysosomes.

AP-4 est exprimé dans les neurones et contrôle le transport du récepteur glutamate AMPA depuis le TGN vers le domaine somatodendritique post-synaptique. La déplétion d'AP-4 cause une microcéphalie ainsi qu'une déficience intellectuelle (Moreno-De-Luca et al.). De plus, AP-4 assure le transport de la protéine APP (Amyloid Precursor Protein) depuis le TGN vers les endosomes (Burgos et al., 2010). La dissociation d'AP-4 et d'APP stimule le clivage d'APP via la γ -secrétase qui ne peut plus être transporté vers les endosomes et ainsi la production pathologique de peptides β -amyloïde, responsable de la neurodégénérescence observée lors de la maladie d'Alzheimer (Burgos et al., 2010). Outre cette fonction de transport vers les endolysosomes, AP-4 joue également un rôle majeur dans le transport polarisé vers la membrane basolatérale dans les cellules épithéliales. Dans les cellules MDCK, la déplétion d'AP-4 inhibe le transport basolatéral de protéines cargos qui s'accumulent alors à la membrane apicale (Simmen et al., 2002).

III.7 Fonctions connues du complexe AP-1

III.7.1 AP-1 est un complexe essentiel au développement des organismes modèles

Le complexe AP-1 est un complexe hétérotétramérique composé de quatre sous-unités, les grandes chaînes β et γ , la chaîne moyenne μ et la petite chaîne σ . Il existe deux gènes codant pour la sous-unité μ chez l'homme et la souris $\mu 1A$ et $\mu 1B$ (Meyer et al., 2000) et chez *C. elegans* μ -*apm-1* et μ -*unc-101* (Shim et al., 2000). Alors qu'une seule sous-unité μ a été identifiée chez la drosophile μ -AP-47 (Benhra et al., 2011). AP-1 recrute la clathrine grâce à sa chaîne β (Gallusser and Kirchhausen, 1993) au niveau du TGN suivant une réaction dépendante d'Arf1 (Traub et al., 1993 ; Zhu et al., 1998).

Le complexe AP-1 est essentiel au développement de nombreux organismes modèles. Ainsi, la déplétion de la γ -adaptin ou de $\mu 1A$ induit une létalité embryonnaire à 3,5 jours au cours de la prénidation et 13,5 jours post-coïtus respectivement (Zizioli et al., 1999 ; Meyer et al., 2000). Cette létalité s'accompagne notamment d'une hémorragie visible (Meyer et al., 2000). La perte de fonction du complexe AP-1 affecte sévèrement la croissance de la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Ma et al., 2009) et un retard du cycle de développement de *Dictyostelium* (Lefkir et al., 2003). Chez *Drosophila melanogaster*, la perte de fonction de la sous-unité μ -AP-47 cause un arrêt du développement au stade larvaire précoce (Benhra et al., 2011).

Chez le nématode *C. elegans*, la déplétion d'AP-1- γ ou d'AP-1- σ induit également une létalité embryonnaire. La déplétion des sous-unités μ , μ -*apm-1* et μ -*unc-101* donnent respectivement 100% et 50% de létalité larvaire précoce (Shim et al., 2000 ; Shafaq-Zadah et al., soumis). Lee et collaborateurs ont également démontré que le phénotype Vulvaless (absence de vulve), causé par la mutation du récepteur EGF (*let-23* chez *C. elegans*), peut être sauvé par des mutants nuls d'*unc-101*, ce qui indique qu'*unc-101* régule négativement la signalisation EGF en aval du récepteur EGF (Lee et al., 1994). De plus, cette perte de fonction d'*unc-101* peut être sauvée par surexpression d'*apm-1*. Ensemble, ces résultats indiquent que les sous-unités μ -*apm-1* et μ -*unc-101* partagent des fonctions potentiellement redondantes et spécifiques (Shim et al., 2000). Ce sauvetage doit être néanmoins pris avec précaution puisque la réexpression de la protéine chimère *apm-1* est un hybride entre une séquence particulière d'*unc-101* fusionnée avec une région d'*apm-1* (Shim et al., 2000). Enfin, les sous-unités AP-47 de la souris et *unc-101* de *C. elegans* sont fonctionnellement équivalentes et AP-47 peut sauver le phénotype Unc-101 du nématode (Lee et al., 1994).

III.7.2 AP-1 assure le transport de protéines lysosomales ou assimilées

III.7.2.1 Le Récepteur au mannose-6-Phosphate est un « célèbre cargo » d'AP-1

Les enzymes à destination du lysosome sont transportées grâce au récepteur mannose 6 Phosphate (MPR pour Mannose 6-Phosphate Receptor). Deux types de MPR ont été identifiés, le MPR cation dépendant (CDMPR) et le MPR cation indépendant (CIMPR) (Stockli et al., 2004 ; Ghosh and Kornfeld, 2004). Les deux MPRs sont retrouvés au niveau du TGN et possèdent des motifs cytoplasmiques reconnus par AP-1 et GGA. Ainsi, le groupe de Ghosh et de Stöckli a montré qu'AP-1 se lie préférentiellement au motif tyrosine de CIMPR mais reconnaît également le motif dileucine. Quant à l'adaptateur GGA, il reconnaît le motif dileucine de CDMPR (Stockli et al., 2004). AP-1 et GGA sont tous deux impliqués dans le transport des cargos depuis le TGN vers les lysosomes à travers une réaction qui est dépendante d'Arf1. Enfin, il a été montré qu'Arf1 et la protéine cargo MPR sont toutes deux requises pour recruter le complexe AP-1 à une membrane cible (Le Borgne et al., 1996).

III.7.2.2 La protéine Lerp joue le rôle du MPR chez la drosophile

Le MPR n'existe pas chez la drosophile mais néanmoins, c'est le récepteur Lerp pour « Lysosomal enzyme receptor protein » qui assure le transport d'hydrolases vers le compartiment lysosomal (Hirst et al., 2009). Ce récepteur possède un motif dileucine en C-terminale reconnu par AP-1 et GGA. La distribution de Lerp est affectée lorsque AP-1 et GGA sont inhibés et l'adressage des hydrolases tels que la cathepsine D vers le lysosome, est sévèrement compromis. Notons que MPR et Lerp possèdent une similitude partielle de séquence et de façon intéressante Lerp peut restaurer le transport d'enzymes lysosomales dans des cellules de mammifères déficientes pour MPR (Hirst et al., 2009).

III.7.2.3 Transport vers le lysosome indépendant de MPR/Lerp

Chez d'autres espèces telles que *Dyctyostellium* et *C. elegans*, un tel récepteur n'a pas été identifié. Chez *Dyctyostellium*, AP-1 se localise au niveau du Golgi et recrute la clathrine. La déplétion d'AP-1 induit un défaut de transport de protéines lysosomales telles que la cathepsine D et l' α -mannosidase depuis le TGN vers le lysosome (Lefkir et al., 2003). Ce qui suggère que cette fonction de transport lysosomal est conservée.

De la même façon il n'existe pas de MPR chez *C. elegans*. Cependant, AP-1 semble être impliqué dans ce processus de transport lysosomal. En effet, au cours de ma thèse j'ai pu montrer que la perte de fonction d'AP-1 induit la formation de vésicules élargies positives pour LAMP-1 et CUP-5, deux marqueurs du compartiment lysosomal. Nous pensons que ces lysosomes élargis reflètent une incapacité du lysosome à dégrader son contenu de par l'absence d'enzymes lysosomales assuré normalement par AP-1. De plus, nos observations en microscopie électronique ont montré une accumulation massive d'endolysosomes.

III.7.2.4 Transport de cargos vers le mélanosome

Les mélanosomes sont appelés « LRO » pour Lysosome Related Organelles. Le groupe de Raposo a démontré le rôle essentiel du complexe AP-1 dans le transport de cargo mélanosomal tel que Tyrp1 depuis les endosomes vers le mélanosome (Delevoeye et al., 2009). Le domaine cytoplasmique de Tyrp1 et le moteur kinésine KIF13A se lient à AP-1 et l'ensemble est requis pour adresser correctement les protéines cargos destinées au mélanosome en cours de maturation (Delevoeye et al., 2009). Les endosomes positifs pour Rab11 sont également requis dans ce processus de transport qui conduit *in fine* à la maturation du mélanosome (Delevoeye et al., 2009). Ce transport du cargo mélanosomal est dépendant d'AP-1, de la clathrine et d'Arf1 (Chapuy et al., 2008).

L'association du moteur kinésine KIF13A avec la sous-unité β 1 d'AP-1 avait été établie précédemment par le laboratoire de Hirokawa (Nakagawa T., et al., 2000). Il a ainsi montré que KIF13A transporte la vésicule positive pour MPR depuis le TGN vers la membrane plasmique à travers une interaction directe avec AP-1 (Nakagawa et al., 2000). Ceci suggère que le complexe AP-1 est aussi bien un adaptateur pour la clathrine que pour les moteurs moléculaires.

III.7.3 AP-1 est impliqué dans la biogenèse de granules denses de sécrétion

III.7.3.1 Formation des « Weibel-Palade Bodies » dans les cellules endothéliales

La formation de granules denses correspond à l'accumulation sélective de cargos au niveau du TGN. La formation des WPB (Weibel Palade Bodies) est médiée par l'accumulation de cargos, en forme de cigare long de 5 μ m. Le cargo essentiel des WPB est le facteur de Von Willebrand (VWF) (Metcalf et al., 2008). L'exocytose des WPB est essentiel pour permettre

le recrutement de plaquettes afin de permettre une réaction d'haemostasie (Lui-Roberts et al., 2005). L'étude en ultrastructure a montré que ces WPB sont recouverts de manteau de clathrine et que la déplétion d'AP-1 ou la surexpression d'AP-180 bloque la formation des WPB (Lui-Roberts et al., 2005) qui se présentent alors sous forme de petits amas, ne recrutent pas la P-selectin et ne sont pas sécrétés. Par ailleurs, toutes mutations affectant le facteur de Von Willebrand chez l'homme induit un défaut de coagulation appelé « Von Willebrand 's disease » (Lui-Roberts et al., 2005).

III.7.3.2 Formation des « Glue Granules » chez la drosophile

La sécrétion d'hormones ou d'enzymes digestives requiert la formation de granules de sécrétion. Les Glue Granules contenant la mucine se forment au niveau de la cellule épithéliale de la glande salivaire de la larve « 3rd instar » chez la drosophile (Burgess et al., 2011). AP-1 et la clathrine colocalisent avec les cargos de sécrétion tels que les protéines SGS (Salivary Gland Secretion) au niveau du TGN et au niveau des granules immatures (Burgess et al., 2011). Ces auteurs ont ainsi confirmé *in vivo* que l'inhibition de la clathrine ou d'AP-1 bloque la formation des granules de sécrétion, démontrant ainsi un rôle essentiel d'AP-1 et de la clathrine dans la biogenèse des granules contenant la mucine.

III.7.3.3 Incorporation d'un cargo dans les granules matures de sécrétion

La phogrine est une glycoprotéine transmembranaire retrouvée dans les cellules neuroendocriniennes. Elle s'accumule dans les granules denses de sécrétion et possède un motif cytoplasmique dileucine qui interagit avec AP-1 et est nécessaire pour sa localisation dans les granules matures de sécrétion (Torii et al., 2005). Lorsqu'on mute ce motif cytoplasmique, la phogrine n'est plus adressée vers ces granules denses matures dans les cellules β -pancréatiques. De façon concomitante, on constate une accumulation de phogrines au niveau du TGN (Torii et al., 2005).

III.7.3.4 AP-1 et les granules de sécrétion immatures

En plus de sa fonction dans la formation des granules, AP-1 intervient aussi dans leur maturation. Le groupe d'Andreas Dittié a montré la présence de clathrine sur les granules de sécrétion immatures (ISG pour **I**mature **S**ecretory **G**ranule). En effet, en isolant des ISG à

partir de la lignée cellulaire endocrine de rat (PC12), ils ont pu observer la présence de l'enveloppe clathrine (Dittie et al., 1996). Ils ont ensuite démontré que le complexe AP-1 est capable de se lier aux ISG, cela de façon indépendante de l'ATP mais nécessitant un GTP. Enfin, l'adition de la GTPase myristoylée Arf1 stimule cette association (Dittie et al., 1996).

Une fonction bien caractérisée d'AP-1 dans les ISG concerne le « tri de récupération » de MPR incorrectement adressé dans ces granules immatures. Le MPR et AP-1 colocalisent dans ces structures dans les cellules endocrines β -pancréatiques de rat et la concentration en MPR et en AP-1 chute de 90% lorsque le granule mature (Klumperman et al., 1998). De la même façon, dans les cellules à sécrétion exocrine, la proenzyme lysosomale procathepsine B entre dans l'ISG puis est récupérée au fur et à mesure que le granule mature et réadressée vers les endosomes/lysosomes (Klumperman et al., 1998). Cette récupération du MPR assurée par AP-1 et la clathrine, se fait de façon sélective : ainsi la phogrine qui est une protéine résidente des granules de sécrétion matures n'est pas affectée par ce processus (Klumperman et al., 1998). Par ailleurs, dans les cellules neuroendocrines PC12, la protéine convertase furin et le MPR sont récupérés de ces ISG grâce encore une fois à AP-1 et à la clathrine (Dittie et al., 1999).

III.7.4 Fonction polarisée d'AP-1 dans le tissu neuronal

Plusieurs études ont été réalisées chez *C. elegans* concernant le rôle de la sous-unité AP-1- μ -UNC-101. Le récepteur ODR-10 se localise au niveau des cils dendritiques olfactifs et est transporté rapidement grâce à des vésicules dendritiques qui naviguent entre le corps cellulaire et le cil. ODR-10 a une localisation polarisée restreinte à l'extrémité ciliaire de la dendrite mais la perte de fonction d'AP-1-*unc-101* montre une absence de vésicules dendritiques et une distribution homogène d'ODR-10 (dendrite + axone) sur toute la membrane plasmique (Dwyer et al., 2001).

D'autres cargos dendritiques sont également dépendants d'*unc-101* pour leur distribution dendritique polarisée. Notons que les protéines cargos normalement localisées au niveau axonal cette fois-ci ne sont nullement affectées dans ce contexte, mais elles requièrent l'adaptateur AP180 (*unc-11* chez *C. elegans*) pour correctement placer ces protéines exclusivement au niveau de la membrane axonale (Dwyer et al., 2001). On constate que la fonction d'*unc-101* est conservée dans d'autres types de neurones avec d'autres récepteurs. Ainsi, la localisation polarisée dendritique des récepteurs au glutamate (GLR-1), à

l'acétylcholine nicotinique (ACR-16) et à la tyrosine kinase (CAM-1) est directement dépendante de l'intégrité d'*unc-101*. La perte de fonction de cette sous-unité μ induit une relocalisation homogène de ces protéines à la membrane plasmique (Margeta et al., 2009). Cependant, ici encore, la localisation des protéines axonales SNB-1 (synaptobrevin) et SNG-1 (synaptogyrin) n'est pas affectée. Cette étude a par ailleurs démontré l'importance des queues cytoplasmiques des protéines GLR-1, CAM-1 et ACR-16, reconnues par *unc-101*, qui sont nécessaires et suffisantes pour leur localisation dendritique polarisée (Margeta et al., 2009). Ensemble, ces données indiquent que la sous-unité μ -*unc-101* est impliquée dans le tri polarisé de récepteurs neuronaux au niveau de la dendrite.

Outre cette fonction de tri, *unc-101* a une fonction dans la biogenèse du cil dendritique en régulant sa morphologie et son orientation (Kaplan O.I., et al., 2010). La clathrine et *rab-8* phénocopient *unc-101* et inhibent ainsi la formation de vésicules ODR-10 positives et perturbent la localisation dendritique de ce récepteur. Par ailleurs ODR-10 colocalise avec RAB-8 (Kaplan O.I., et al., 2010), suggérant que le transport polarisé dendritique d'ODR-10 est clairement régulé par UNC-101 et la clathrine, de concert avec RAB-8 et les microtubules. Notons que la perte de fonction d'*unc-101* et de *rab-8* altère la morphologie des microtubules au niveau du cil (Kaplan et al., 2010).

Au cours de ma thèse, j'ai pu montrer l'implication spécifique de la sous-unité μ -*unc-101* dans la localisation d'ODR-10 puisque l'autre sous-unité μ -*apm-1* n'intervient pas dans ce processus. Alors que nous avons phénocopié la perte de polarité d'ODR-10 en ciblant la sous-unité unique σ qui altère la formation des complexes AP-1-APM-1 et AP-1-UNC-101.

III.7.5 Fonction d'AP-1 dans la polarisation du tissu épithélial

Le rôle d'AP-1 dans le trafic apicobasal a été très largement étudié dans les cellules épithéliales. Selon la sous-unité μ incorporée dans le complexe, on forme deux complexes AP-1, AP-1A ubiquitairement exprimé et AP-1B spécifique du tissu épithélial (Folsch et al., 1999). En effet, dans les cellules épithéliales MDCK, le complexe AP-1- μ B (AP-1B) contrôle le transport de cargos tels que les récepteurs à la transferrine et au LDL (TfnR et LDLR) vers la membrane plasmique basolatérale (Folsch et al., 1999). Ainsi, dans les cellules rénales de cochon LCC-PK1, dépourvues d'AP-1B, TfnR et LDLR ne sont plus localisés à la membrane basolatérale et deviennent cortical (apical+basolatéral) et apical respectivement (Sugimoto et al., 2002). Cette fonction de transport basolatéral du complexe AP-1 est conservée chez la

drosophile, contrôlant notamment le tri basolatéral du coactivateur de Notch Sanpodo à la membrane basolatérale (Benhra et al., 2011), mais aussi chez *C. elegans* qui fait l'objet de cette étude.

Dans les cellules LLC-PK1, l'organisation des cellules épithéliales en monocouche est compromise. L'organisation des cellules en multicouche dans les cellules dépourvues d'AP-1B témoigne potentiellement d'une perte de polarité et d'une prolifération aberrante des cellules (Folsch et al., 1999). Ce phénotype peut être sauvé par réexpression du complexe AP-1B. Notons que dans ces cellules le transport apical n'est pas affecté (Folsch et al., 1999).

AP-1A et AP-1B sont localisés au niveau de la région périnucléaire et le laboratoire d'Ira Mellman a révélé l'étroite association du complexe exocyste avec AP-1B (Folsch et al., 2003). En effet, les sous-unités de l'exocyste telles que Sec8 et Exo70 s'associent sélectivement à des membranes contenant AP-1B et non AP-1A au niveau du TGN et permettent le transport du TfnR vers la membrane basolatérale (Folsch et al., 2003). Dans les cellules MDCK, le complexe exocyste est impliqué dans le transport basolatéral : Sec6 et Sec8 se localisent à la membrane latérale tandis que dans les cellules LLC-PK1, dépourvues d'AP-1B, cette localisation est inhibée (Folsch et al., 2003). L'exocyste interagit donc spécifiquement avec AP-1B et est impliqué dans le transport basolatéral.

L'extrémité C-terminale de μ 1B est importante pour le recrutement d'AP-1B dans les endosomes de recyclage contenant PIP3 dans les cellules MDCK (Fields et al., 2010). L'enrichissement en PIP3 dans les endosomes de recyclage est stimulé lorsque AP-1B est exprimé dans les cellules épithéliales et toute altération du niveau de PIP3 cause une délocalisation d'AP-1B qui n'est plus présent sur les endosomes de recyclage positifs pour le TfnR et un déroutage des cargos dépendants d'AP-1B vers la membrane plasmique apicale (Fields et al., 2010). La présence de PIP3 dans les endosomes de recyclage est essentielle pour la fonction d'AP-1B et dans les cellules MDCK, la membrane basolatérale est enrichie en PIP3. La surexpression de PTEN qui catalyse la formation de PIP2 à partir de PIP3 inhibe la localisation d'AP-1B sur les endosomes de recyclage et induit un défaut d'adressage des cargos basolatéraux. Ces résultats suggèrent que l'accumulation de PIP3 sur les endosomes de recyclage est essentiel pour le recrutement d'AP-1B et le transport subséquent des cargos dépendants d'AP-1B vers la membrane basolatérale (Fields et al., 2010).

III.7.6 L'implication d'AP-1 dans les maladies

La première maladie humaine associée à une mutation du complexe AP-1 fut la maladie du retard mental liée au chromosome X. En effet, il a été montré qu'une mutation dans le gène AP1S2 codant pour la sous-unité σ 1B du complexe AP-1 peut être à l'origine de cette maladie (Tarpey et al., 2006). Les phénotypes associés correspondent à un retard dans la locomotion et un défaut de développement et de fonction des processus synaptiques (Tarpey et al., 2006).

En 2008, il a été montré qu'une mutation affectant le gène AP1S1 codant, cette fois, la sous-unité σ 1A du complexe AP-1, cause le syndrome MEDNIK (Montpetit et al., 2008). Des études en parallèle chez le zébrafish ont montré que la déplétion d'AP1S1 par morpholino induit les mêmes phénotypes : un défaut de la formation de la peau, une hypopigmentation et des défauts locomoteurs, suggérant une altération du développement neuronal (Montpetit et al., 2008). Notons enfin que le gène AP1S1 humain peut sauver le phénotype du zébrafish.

Le complexe AP-1B, spécifique du tissu épithélial est clairement impliqué dans un aspect majeur de la polarité épithéliale : la polarité apico-basale. Il n'est donc pas étonnant que ce complexe soit impliqué dans un processus cancéreux. La perte de la polarité est un événement qui peut déclencher un processus tumorigénique (Stengel and Zheng, 2011). C'est notamment le cas dans les carcinomes et en particulier dans la tumorigenèse intestinale dans laquelle la polarité épithéliale est perdue où l'expression d'AP-1B est négativement régulée (Mimura et al., 2011). AP-1B se présente donc comme un biomarqueur pour certains cancers intestinaux (Mimura et al., 2011). Enfin, dans les cellules LLC-PK1 dépourvues d'AP-1B, la β -caténine et la E-cadhérine sont enrichies dans le cytoplasme alors qu'elles sont sur la membrane basolatérale dans les cellules exprimant AP-1B (Mimura et al., 2011).

Au cours de ce chapitre nous avons exploré la fonction essentielle du complexe adaptateur pour la clathrine AP-1 dans la viabilité de nombreux organismes modèles. Sur un plan moléculaire, AP-1 intervient dans le recrutement du manteau protéique clathrine nécessaire à la formation de vésicules de transport à clathrine dans le trafic post-Golgi. Enfin, quant à sa fonction cellulaire, AP-1 est impliqué dans le transport entre le TGN et les endosomes mais intervient également dans le trafic polarisé.

Au cours de ma thèse, j'analyserai les fonctions essentielles d'AP-1 dans le contexte d'un organisme modèle vivant, le nématode *C. elegans*. J'aborderai également l'importance du complexe AP-1 et plus généralement du trafic membranaire dans la régulation de la polarité épithéliale.

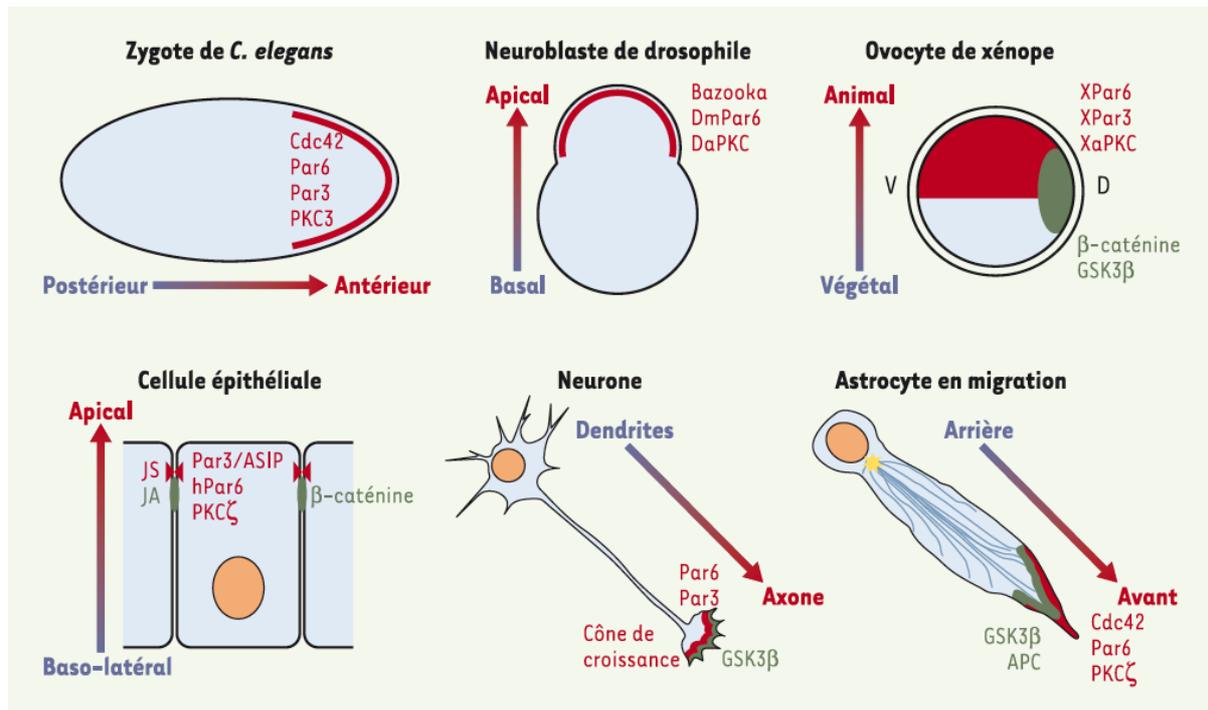


Figure 22 : Les cellules polarisées et les déterminants de polarité

La polarité cellulaire est un processus essentiel au cours du développement et dans différents types cellulaires. Elle intervient notamment dans l'embryon précoce de *C. elegans* afin de spécifier l'axe antéro-postérieur et la division asymétrique subséquente. Dans les neuroblastes de drosophile, cette polarité est également responsable de la division asymétrique. Les neurones et les astrocytes en migration présentent eux aussi une polarisation avec un cône de croissance et un front de migration respectivement. Enfin, la cellule épithéliale présente un pôle apical et un pôle basolatéral. Des déterminants de polarité essentiels sont nécessaires pour spécifier un pôle donné. Ainsi, le module Par antérieur formé par Par6/Par3/aPKC/Cdc42 spécifie le cortex antérieur de l'embryon, le pôle apical du neuroblaste de drosophile et de la cellule épithéliale. Dans les neurones et dans l'astrocyte, ces déterminants de polarité se localisent au niveau du cône de croissance et au front de migration respectivement (Etienne-Manneville S., 2003).

IV. Relation étroite entre le trafic membranaire et la polarité épithéliale

Dans ce chapitre j'introduirai les mécanismes contrôlant la mise en place et le maintien de la polarité en particulier en ce qui concerne l'implication du trafic membranaire dans la régulation de cette polarité cellulaire.

IV.1 Les cellules polarisées

La polarité est une caractéristique essentielle des cellules qui contrôle de très nombreuses fonctions biologiques. La polarité consiste à créer une asymétrie membranaire, protéique ou morphologique au sein d'une cellule et plus généralement dans un tissu afin de permettre une fonction biologique particulière. Elle permet par exemple la mise en place de l'axe antéro-postérieur de l'œuf une-cellule et donc l'orientation du futur embryon aussi bien chez la drosophile que chez *C. elegans* (Figure 22) (Cuenca et al., 2003; Morais-de-Sa et al., 2010). Les neuroblastes de la drosophile sont un autre exemple de cellules polarisées, et présentent un pôle apical et un pôle basolatéral régulant la division asymétrique de ces cellules (Prehoda, 2009). Dans les astrocytes, cette polarité est nécessaire cette fois à l'induction de la migration en réponse à une lésion (Figure 22) (Osmani et al., 2010). Les neurones sont également polarisés et une analogie entre membrane basolatérale et dendrite d'une part, et membrane apicale et axone d'autre part, a été proposée (Figure 22) (Dotti and Simons, 1990). Enfin, les cellules épithéliales, qui font l'objet de ma thèse, présentent une membrane apicale qui fait face à l'extérieur et une membrane basolatérale qui repose sur la lame basale. Il existe différents critères nécessaires à la mise en place et au maintien de la polarité épithéliale. Différents modules sont nécessaires pour spécifier l'identité apicale ou basolatérale d'une membrane : ce sont les modules Crumbs, Par et Scribble. L'établissement des jonctions apicales et un trafic polarisé différentiel sont également requis afin de maintenir cette polarité. Les jonctions d'adhérence sont établies entre la membrane apicale et basolatérale afin d'empêcher physiquement toute diffusion latérale de composants membranaires apicaux et basolatéraux, prévenir la diffusion paracellulaire et permettre aux cellules d'être jointives. Quant au rôle du trafic membranaire polarisé, il est responsable du transport spécifique de protéines (cargos) ou de lipides vers la membrane apicale ou vers la membrane basolatérale. Les lipides présentent en effet une polarisation : le phosphoinositide PIP2,

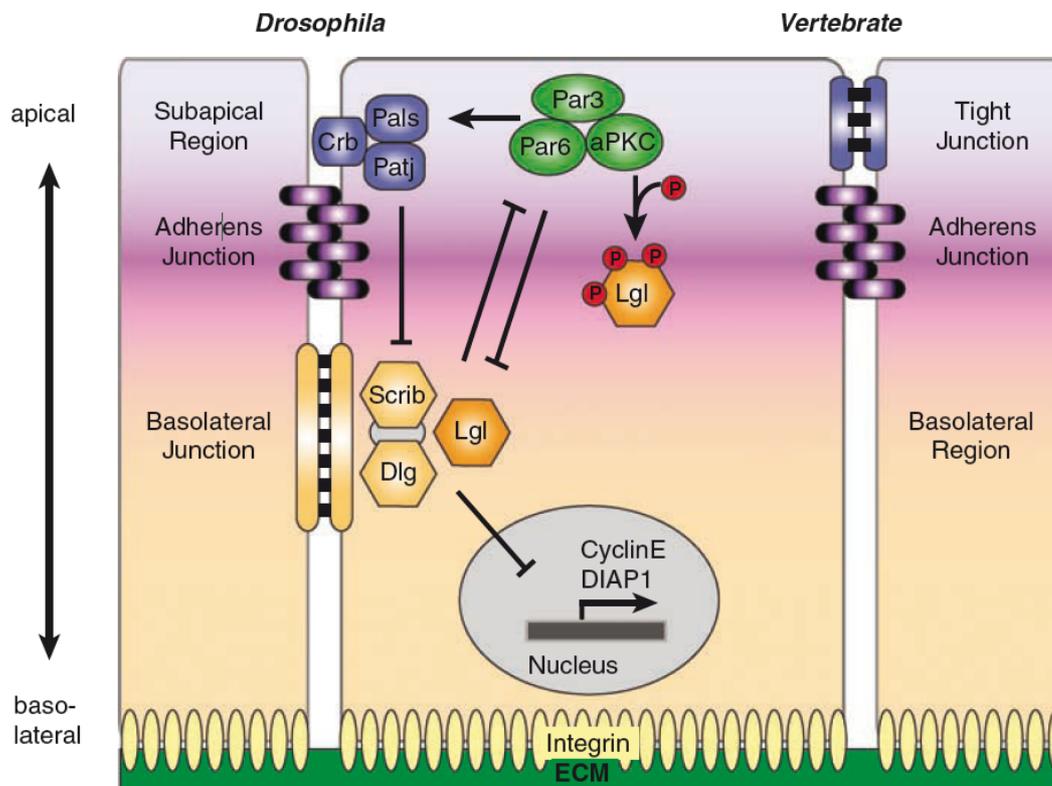


Figure 23 : Les modules contrôlant la polarité épithéliale

Trois modules ont été identifiés comme étant essentiels pour l'établissement et le maintien de la polarité épithéliale. Les modules apicaux Crumbs formés par Crb, Pals1(Stardust) et Patj ; et le module Par antérieur formé de Par6, Par3 et aPKC. A la membrane latérale, on retrouve le module Scribble formé de Scrib, Dlg et Lgl. Les modules apicaux et basolatéraux s'excluent mutuellement pour maintenir cette asymétrie cellulaire. Pour séparer la membrane apicale de la membrane basolatérale, s'établissent les jonctions cellulaires qui remplissent une fonction de barrière de diffusion membranaire et d'adhérence. Chez les vertébrés, ces jonctions sont formées par les jonctions serrées en position apicale puis plus latéralement par les jonctions d'adhérence. Chez la drosophile, il n'y a pas de jonctions serrées mais à la place on retrouve une région subapicale (SubApical Region SAR) où se localisent les modules Par et Crb. En dessous de cette région, on retrouve les jonctions d'adhérence et plus basalement les jonctions septées (basolateral junction). Chez *C. elegans*, il existe deux complexes de jonction d'adhérence formés par CCC et DAC (voir figure 29). Notez que ces jonctions d'adhérence sont également appelées Zonula Adherens ou ZA (Humbert P.O., et al., 2008).

glycosphingolipides ainsi que les radeaux lipidiques sont enrichis à la membrane apicale tandis que PIP3 se localise préférentiellement au pôle basolatéral dans les cellules MDCK.

IV.2 Les différents modules contrôlant la polarité épithéliale

Dans les cellules épithéliales, trois groupes de protéines jouent un rôle central dans l'établissement et le maintien de la polarité antéro-postérieure ou apico-basale. Le module Par3(Bazooka)/Par6/aPKC et le module Crumbs/Pals1(Stardust)/Patj se localisent à la membrane apicale et contrôlent ainsi l'identité apicale de cette membrane. De façon mutuellement antagoniste à ces deux précédents modules, (Scrib)/Discs large(Dlg)/Lethal giant larvae(Lgl) se localise à la membrane basolatérale et spécifie l'identité basale de cette membrane (Figure 24).

IV.2.1 Le module Par3/Par6/aPKC

Les protéines PAR (pour PARTitioning-defective) ont été identifiées dans l'embryon précoce de *C. elegans* induisant une létalité embryonnaire avec la première division qui devient symétrique (Kemphues et al., 1988). Elles ont été par la suite retrouvées dans la plupart des eucaryotes supérieurs (Ohno, 2001 ; Watts et al., 1996). Six protéines PAR ont ainsi été identifiées (PAR-1 à PAR-6) et hormis PAR-4 et PAR-5, les autres protéines PAR possèdent une localisation polarisée dans l'embryon précoce. Ainsi, PAR-1 et PAR-2 se localisent au cortex postérieur alors que PAR-3, PAR-6 et aPKC se localisent au cortex antérieur (Tabuse et al., 1998 ; Kay and Hunter, 2001 ; Gotta et al., 2001 ; Goldstein and Macara, 2007). Par1 et Par4 sont des sérine/thréonine kinases, Par3 et Par6 sont des protéines « scaffold » à domaines PDZ permettant des interactions protéiques (Prehoda, 2009). Ensemble, PAR-3, PAR-6 et la protéine kinase atypique aPKC (PKC-3 chez *C. elegans*) interagissent et forment un complexe ternaire (Figure 23) (Nagai-Tamai et al., 2002 ; Tabuse et al., 1998).

Dans les cellules épithéliales, on ne parle pas de « complexe » PAR-3/PAR-6/aPKC mais bien de « module », car PAR-3 est exclue de ce complexe par phosphorylation (Figure 24). Dans les cellules MDCK, la phosphorylation de Par3 rompt l'affinité de celle-ci pour le complexe Par6/aPKC (Nagai-Tamai et al., 2002). De la même façon, chez la Drosophile, la phosphorylation de Par3-Baz par aPKC est nécessaire pour l'exclure du complexe Par (Morais-de-Sa et al., 2010). De plus, la localisation de Baz ne requiert pas Crumbs alors que

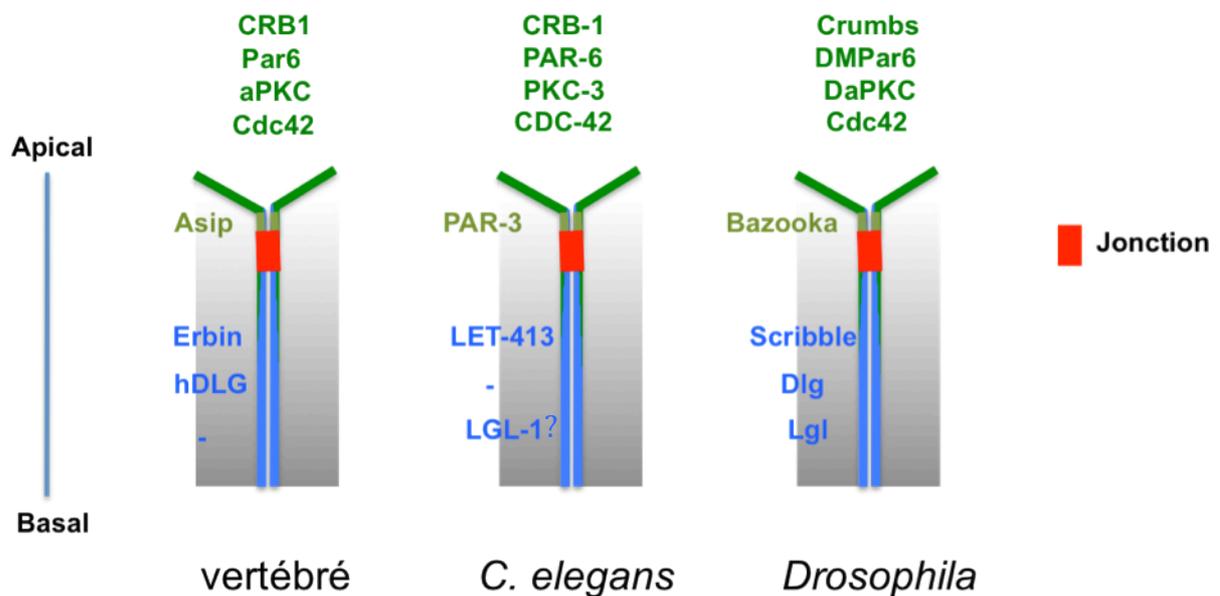


Figure 24 : Localisation des modules de polarité dans l'épithélium

Représentation schématique de la localisation du module Par, Crumbs et Scribble dans les cellules épithéliales de vertébrés, de *C. elegans* et de drosophile. Pour chaque protéine, son homologue est présenté sur une même ligne. Notons que Par3 se localise subapicalement et que chez *C. elegans*, Disc large DLG-1 ne fait pas partie du module basolatéral Scribble-LET-413 mais se localise au niveau de la jonction d'adhérence.

la localisation apicale de par6 et d'aPKC dépend de Crumbs. Cette dernière protéine est elle-même impliquée dans ce processus d'exclusion de Par3 (Morais-de-Sa et al., 2010). Dans les cellules épithéliales de l'épiderme ou de l'intestin de *C. elegans*, PAR-3, PAR-6 et PKC-3 se localisent sur la membrane apicale avec une localisation plus latérale pour PAR-3 (Totong et al., 2007 ; Achilleos et al., 2010). Par ailleurs, dans ces cellules intestinales, la perte de fonction de *par-6* altère la localisation de PKC-3 mais n'affecte pas celle de PAR-3 (Totong et al., 2007), suggérant que PAR-3 ne fait pas partie du complexe PAR-6/PKC-3.

IV.2.1.1 Le module Par régule la polarité

Le module Par6/Par3/aPKC se localise au cortex antérieur de l'embryon une-cellule et établit ainsi la polarité antéro-postérieure de l'embryon de *C. elegans* (Cuenca et al., 2003 ; Kumfer et al., 2010). Ce module est également impliqué dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'embryon de drosophile (Morais-de-Sa et al., 2010 ; Doerflinger et al., 2010). Ces mêmes protéines se localisent au pôle apical du neuroblaste de la drosophile régulant la division asymétrique de ces cellules (Prehoda, 2009), au niveau du cône de croissance de l'axone des cellules neuronales (Shi et al., 2003), au niveau du front de migration de l'astrocyte en migration (Osmani et al., 2010) et enfin au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales (Goldstein and Macara, 2007). Ces protéines sont communément appelées « déterminants de polarité » car leur localisation coïncide avec la spécification d'un domaine polarisé (ici le cortex antérieur ou le domaine apical/axonal).

IV.2.1.2 Le module apical Par3/Par6/aPKC se lie à Cdc42 pour réguler la polarité

La Rho GTPase Cdc42, sous sa forme liée à un GTP, est un acteur majeur de l'initiation de la polarité et intervient en amont du complexe Par (Etienne-Manneville, 2004). Comme toutes les GTPases, elle oscille entre une forme active liée à un GTP, catalysée par une GEF et une forme inactive associée avec un GDP catalysée par une GAP (Figure 19). Notons que Cdc42 peut se lier à une membrane lipidique du fait qu'elle possède une modification lipidique géranyl-géranyl en C-terminale (Nomanbhoy et al., 1999). Des études chez les mammifères puis confirmées chez *C. elegans* indiquent que la Rho GTPase Cdc42 interagit avec le module Par3/Par6/aPKC grâce au domaine d'interaction semi-CRIB de Par6 (Joberty et al., 2000 ; Gotta et al., 2001 ; Lin et al., 2000) et l'ensemble contrôle la polarité dans divers types

cellulaires notamment chez *C. elegans* (Welchman et al., 2007). L'interaction de CDC-42 avec PAR-6 est essentielle pour le maintien de la localisation asymétrique de PAR-6 dans l'embryon une-cellule de *C. elegans* (Aceto et al., 2006) et le module formé de Par3, Par6, aPKC et Cdc42 contrôle la formation des jonctions serrées dans les cellules MDCK (Joberty et al., 2000).

Dans l'embryon une-cellule de *C. elegans*, *cgef-1* et *chin-1*, une GEF et une GAP de CDC-42 respectivement ont été identifiées et régulent la localisation et l'activité de CDC-42 (Kumfer et al., 2010). Cdc42 se localise au pôle apical dans les neuroblastes et se trouve au cortex de façon symétrique dans l'embryon de *C. elegans* (Prehoda, 2009 ; Aceto et al., 2006) avec un enrichissement antérieur observé pour la forme active (Kumfer et al., 2010). L'inhibition de *cdc-42* empêche la localisation polarisée des protéines PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-6 et induit une division symétrique et une perte de la polarité de l'embryon de *C. elegans* (Gotta et al., 2001 ; Kay and Hunter, 2001). Inversement l'inhibition de *par-6* et de *par-2* perturbent la localisation de CDC-42 (Kumfer et al., 2010).

Une étude en 2008 a démontré que l'exclusion de PAR-6 et de CDC-42 de la membrane basolatérale (contact cellule-cellule) est assuré par la RhoGAP *pac-1* (Anderson et al., 2008). La protéine à domaine PH PAC-1 se localise à la membrane basolatérale et inactive CDC-42 à ce niveau. CDC-42 est alors maintenue active uniquement à la membrane apicale où elle peut se fixer à PAR-6 et donc la recruter spécifiquement au niveau de la membrane libre de contact cellule-cellule (Anderson et al., 2008). Dans les cellules épithéliales du notum de drosophile, l'activité de Cdc42 est requise pour la localisation apicale de Par6 et d'aPKC mais pas de Par3-Baz (Georgiou et al., 2008).

IV.2.1.3 Maintien du module Par antérieur

Le maintien de la localisation polarisée de ce module est régulé par les différents membres du complexe Par antérieur mais aussi par une action négative des protéines Par postérieures. Chez *C. elegans* l'association spécifique de PAR-6 avec PKC-3 est essentielle pour la mise en place de la polarité et à la localisation corticale antérieure de PAR-6 dans l'embryon une-cellule (Li et al., 2010). Il a été montré que la perte de fonction de *par-6* par exemple perturbe la localisation asymétrique de PAR-3 et induit une relocalisation corticale homogène des protéines PAR-1 et PAR-2 normalement postérieures (Watts et al., 1996). Et inversement, l'inhibition de *par-2* relocalise la protéine PAR-6 sur tout le cortex de l'embryon de *C.*

elegans (Cuenca et al., 2003). Enfin, la phosphorylation de PAR-2 par PKC-3 va empêcher l'association de PAR-2 au cortex antérieur (Nance, 2005) indiquant clairement l'interdépendance et l'exclusion mutuelle du module Par antérieur (Par3/Par6/aPKC) et du module Par postérieur (Par1/Par2/Par5). Ce mécanisme de maintien des Par est également conservé dans l'ovocyte stade 10 de la drosophile où la perte de fonction de Par3 (Bazooka) induit une délocalisation corticale de Par1 au détriment d'une localisation exclusivement postérieure (Doerflinger et al., 2010).

Outre l'embryon précoce, le module Par est également requis lors de la gastrulation et les mécanismes de localisation et d'exclusion des protéines Par sont conservés. Au cours du stade 8-cellules, PAR-3 et PAR-6 se localisent au cortex « apical » ou encore au cortex libre de tout contact cellule-cellule, alors que PAR-1 et PAR-2 sont exclusivement localisées au niveau des contacts cellule-cellule (Nance et al., 2003). Lorsqu'on déplete *par-3* ou *par-6*, PAR-1 et PAR-2 se délocalisent de façon homogène sur tout le cortex, suggérant que *par-3* et *par-6* sont nécessaires pour restreindre la localisation de PAR-1 et de PAR-2 au cortex « basal » (Nance et al., 2003). La perte de fonction de *par-3* empêche toute association de PAR-6 et de PKC-3 avec la membrane apicale. Enfin, une perte d'adhésion entre les cellules est observée en lumière blanche polarisée (espace intercellulaire) et confirmée par microscopie électronique montrant des cellules non adhésives (Nance et al., 2003). Enfin, la myosine non musculaire NMY-2 est enrichie au cortex apical et est nécessaire à la migration des cellules lors de la gastrulation (Nance et al., 2003). Ce processus est altéré lorsque *par-3* n'est plus exprimé, NMY-2 n'est plus enrichie apicalement et le processus de migration est ralenti. L'ensemble de ces résultats indique que le complexe Par est certes impliqué dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur de l'embryon mais contrôle également la polarité apicobasale associée à l'adhésion cellulaire lors de la gastrulation (Nance et al., 2003).

Enfin, dans les cellules épithéliales de l'épiderme et de l'intestin de *C. elegans*, l'inhibition de *par-3* altère la localisation apicale de PAR-6 et de PKC-3 (Achilleos et al., 2010) et la déplétion de *par-6* inhibe la localisation de PKC-3 à la membrane apicale (Totong et al., 2007).

IV.2.2 Le module Crb/Pals1/Patj recrute le complexe Par antérieur

Le module Crumbs formé par CRB3(Crb)/PALS1(Stardust)/PATJ est conservé au cours de l'évolution et largement impliqué dans la polarité épithéliale et dans l'assemblage des

jonctions cellulaires (Figure 23-24-25). Ce n'est cependant pas le cas chez *C. elegans* où la protéine Crumbs n'est pas essentielle.

IV.2.2.1 Le complexe apical Crb/Pals1/Patj

La protéine Crumbs (Crb) est une protéine transmembranaire qui se localise à la membrane sub-apicale, une région au dessus de la ceinture jonctionnelle zonula adherens, encerclant l'apex de l'épithélium (Wodarz et al., 1995). Chez la drosophile, Crb est un déterminant de polarité apical car la présence de celui-ci, et en particulier de sa région cytoplasmique, est suffisante pour conférer des propriétés apicales à la membrane plasmique (Wodarz et al., 1995) : sa surexpression induit notamment une expansion du domaine apical au détriment de la membrane basolatérale dans les cellules épithéliales de l'ectoderme de drosophile (Wodarz et al., 1995 ; Grawe et al., 1996).

Il existe 3 protéines Crumbs chez les mammifères CRB1, CRB2 et CRB3 mais seulement CRB1 et CRB3 ont été fonctionnellement caractérisées. CRB1 est exprimée dans l'œil et son inhibition cause une *retinis pigmentosa* alors que les souris KO pour CRB1 montrent des défauts d'adhésion et de polarisation des cellules photoréceptrices (van de Pavert et al., 2004). Quant à CRB3, elle est principalement exprimée dans les cellules épithéliales et se localise à la membrane apicale et est concentrée au niveau des jonctions serrées où elle interagit avec PALS1 (Makarova et al., 2003). La perte de fonction de CRB3 induit des défauts de formation des jonctions serrées et affecte ainsi la polarité épithéliale (Fogg et al., 2005). Ce défaut de jonction et de polarité observé lorsqu'on inhibe CRB3 semble être associé à une impossibilité de recruter le module Par3/Par6/aPKC au niveau des jonctions serrées (Straight et al., 2004). Cette fonction de CRB3 est conservée dans les cellules épithéliales du rein de souris et son inhibition empêche la formation du complexe CRB3/PALS1/PATJ et affecte donc la polarité et la formation des jonctions serrées (Karp et al., 2008). Ce phénotype est associé à une prolifération aberrante de cellules en multicouches due à une transition épithélio-mésenchymateuse, au cours de laquelle, la cadhérine est notamment sous-régulée et les jonctions serrées sont abolies (Karp et al., 2008). CRB3 est donc essentielle pour prévenir la formation de tumeurs mais aussi pour éviter que les cellules n'adoptent des caractéristiques métastatiques. Le module Crumbs est donc un déterminant de polarité apical et remplit une fonction de suppresseur de tumeurs (Lu and Bilder, 2005).

Chez le nématode *C. elegans*, *crb-1*, l'homologue de Crumbs n'est pas un gène essentiel. En effet, le marqueur de la zonula adherens AJM-1 exhibe une localisation normale lorsque *crb-1* est déplété chez le nématode (Bossinger et al., 2001). Cette absence de phénotype est très différente de ce qui est observé chez la drosophile où la perte de Crumbs entraîne un défaut de formation de la zonula adherens et une dégénération subséquente des épithéliums dérivés de l'ectoderme induisant une létalité (Grawe et al., 1996). Il existe une autre protéine CRumbs Like appelée CRL-1 ou encore EAT-20 chez le ver (Shibata et al., 2000). Afin d'analyser d'éventuelles redondances fonctionnelles entre *eat-20* et *crb-1*, une déplétion simultanée a été réalisée par le groupe de Karin Theres, n'induisant aucun phénotype sur la viabilité et la fertilité de l'animal (Bossinger et al., 2001). CRB-1 se localise à la membrane apicale juste au dessus de la zonula adherens et cette localisation est dépendante de DLG-1 (Disc-Large de *C. elegans*) (Bossinger et al., 2001). EAT-20 se localise et se maintient au pôle apical du pharynx et de l'intestin et n'est pas essentielle à la survie du ver (Shibata et al., 2000). Néanmoins, le mutant *eat-20* présente un défaut de nutrition dû à un problème de pompage pharyngal caractéristique des mutants Eat et d'une prolongation de période de ponte (Shibata et al., 2000). Ces données indiquent que CRB-1 se localise à la membrane apicale comme chez les mammifères et la drosophile, par contre sa fonction vitale et essentielle dans la formation des jonctions d'adhérence n'est pas conservée chez le nématode. Il s'agit probablement de redondances fonctionnelles entre les différents modules.

Stardust l'homologue drosophile de PALS1 est une protéine de la famille MAGUK. L'interaction physique de Crumbs avec Stardust est requise pour la biogenèse de la zonula adherens (ZA) nécessaire à l'établissement de la polarité (Grawe et al., 1996). En effet, la déplétion de Stardust phénocopie celle de Crumbs concernant le processus de polarité. De plus, Crumbs et Stardust sont mutuellement dépendantes pour leur stabilité et pour leur localisation apicale : la déplétion de l'une induit une diminution d'expression de l'autre et réciproquement (Bachmann et al., 2001). Par ailleurs, l'orthologue de PALS1 chez le poisson zèbre, appelé Nok, est essentiel pour la morphogenèse des cellules photoréceptrices de la rétine et l'équipe de Abdelilah-Seyfried a montré l'implication de Nok et d'aPKC (Heart and Soul chez le zébrafish) dans la morphogenèse du cœur (Rohr et al., 2006).

Enfin, PATJ est une protéine à multiple domaine PDZ qui est également impliquée dans le maintien des jonctions serrées. Elle se localise au niveau des jonctions serrées et interagit avec ZO-3 (Zonula Occludens 3) et la claudin-1 (Lemmers et al., 2002). Des études récentes ont impliqué PATJ dans le développement de la polarité épithéliale chez les mammifères. En

effet, Shin et collaborateurs ont montré que la perte de fonction de PATJ induit des défauts de polarité cellulaire dans les cellules MDCK cultivées en kyste (Shin et al., 2005). Dans la cellule MDCK non encore polarisée, PATJ se localise dans des compartiments intracellulaires apicaux puis au cours de la polarisation cellulaire, cette protéine quitte ce compartiment et se relocalise à la membrane apicale puis se concentre au niveau des jonctions serrées. Lorsque la fonction de PATJ est altérée, l'établissement des jonctions est retardé et la polarisation du kyste est compromise (Shin et al., 2005). La perte de fonction de PATJ dans les cellules Caco-2 induit une déstabilisation du complexe Crumbs qui se manifeste par la délocalisation de PALS1 et de ZO-3 qui ne sont plus recrutées au niveau des jonctions serrées (Michel et al., 2005). Ce phénotype est associé à une délocalisation de CRB3 dans des compartiments intracellulaires (Michel et al., 2005). Ces données démontrent l'implication de PATJ dans la polarité apico-basale et dans le recrutement de CRB3 lors de la polarisation des cellules épithéliales de mammifères.

IV.2.2.2 Interdépendance entre le module Par et le module Crumbs

Dans les cellules épithéliales de mammifères MDCK, PALS1 peut physiquement interagir avec Par6 grâce à la région N-terminale de PALS1 et au domaine PDZ de Par6, ce qui permet de faire un lien direct entre CRB3 et Par6 (Hurd et al., 2003). De plus le domaine PDZ de Par6 peut également interagir directement avec CRB3 et contrôler la formation des jonctions serrées dans les cellules épithéliales de mammifères (Lemmers et al., 2004). De la même façon, chez la drosophile, Par6 est capable de se lier à Stardust (Wang et al., 2004) et à la protéine PATJ et cette interaction est cruciale pour la morphogenèse des cellules photoréceptrices (Nam and Choi, 2003).

Le module Par et le complexe Crumbs sont mutuellement dépendants l'un de l'autre pour leur localisation polarisée apicale (Nam and Choi, 2003). Plus particulièrement, chez la drosophile, les mutants Crumbs *crb* montrent une délocalisation d'aPKC et de Par6 alors que la distribution de Par3-Baz reste inchangée (Morais-de-Sa et al., 2010). De plus, la protéine kinase aPKC se lie à Crumbs et à PATJ et phosphoryle Crumbs chez la drosophile (Sotillos et al., 2004). Cette phosphorylation est essentielle : une version non-phosphorylable de Crumbs se comporte comme un dominant négatif et désorganise la polarité épithéliale, tout comme la surexpression d'une forme inactive d'aPKC (Sotillos et al., 2004). Il est maintenant admis que le module Crumbs est recruté au domaine apical grâce au module Par au cours du

développement précoce de l'épithélium de la drosophile. La localisation initiale du complexe Par n'est pas altérée dans les embryons mutants *crb* mais le complexe Crumbs est nécessaire au maintien du complexe Par dans les stades tardifs de la polarisation (Shin et al., 2006).

IV.2.3 Le module basolatéral Scribble/Disc Large/Lgl

Un autre module essentiel dans la mise en place et le maintien de la polarité épithéliale est composé de Scrib (LET-413 chez *C. elegans*) Disc Large (DLG-1 chez *C. elegans*) et Lgl (LGL-1 chez *C. elegans*). Il faut noter que chez *C. elegans* DLG-1 ne fait pas partie de ce module (McMahon et al., 2001) (Figure 25).

Chez la drosophile, l'inhibition de scrib induit un défaut de morphologie de la cellule ainsi qu'une perte de l'organisation en monocouche, une prolifération des cellules épithéliales embryonnaires qui ne sont plus jointives (Bilder and Perrimon, 2000). Cet aspect suggère une fonction suppresseur de tumeurs pour cette protéine. Scrib se localise au niveau des jonctions septées, basalement à la localisation de la β -caténine Armadillo, à la frontière entre la membrane apicale et basolatérale (Bilder and Perrimon, 2000). L'inhibition de Scrib résulte en la redistribution des protéines apicales et des jonctions d'adhérence à la surface basolatérale alors que les protéines basolatérales ne sont pas affectées. Parmi les protéines jonctionnelles qui se délocalisent ectopiquement en basolatéral, on trouve la DE-cadhérine (*Drosophila* E-cadhérine) et Armadillo (Bilder and Perrimon, 2000). Bilder et collaborateurs ont également démontré que la perte de fonction de Scrib induit une perte de la localisation asymétrique apicale de Crumbs qui se localise de façon homogène à la membrane apicale et basolatérale. Ceci suggère que c'est précisément la délocalisation basolatérale de Crumbs qui serait initiatrice de la délocalisation des protéines normalement apicales (Bilder and Perrimon, 2000). La fonction de Scrib serait donc de restreindre Crumbs au pôle apical.

LET-413 est l'homologue de Scribble chez *C. elegans*, elle se localise à la membrane basolatérale et est essentielle pour l'assemblage des jonctions d'adhérence (Legouis et al., 2000). La déplétion de LET-413 induit la formation de jonctions étendues et discontinues qui apparaissent le long de la membrane latérale résultant en un défaut d'adhésion et de polarité (Legouis et al., 2000 ; McMahon et al., 2001). LET-413 permet de compacter correctement les jonctions d'adhérence au pôle apical.

DLG-1, l'homologue de Discs-Large chez *C. elegans*, est une protéine essentielle qui colocalise avec AJM-1 qui est un membre du complexe de jonction apicale appelé "*C. elegans*

Apical Junction" (CeAJ) situé en dessous du complexe cadhérine-caténine mais au dessus du module latéral Scribble-LET-413 (McMahon et al., 2001). La perte de fonction de *dlg-1* délocalise AJM-1, induit la disparition des structures denses aux électrons, caractéristiques du CeAJ mais affecte peu l'adhésion et la polarité des cellules épithéliales (McMahon et al., 2001).

L'homologue *C. elegans* de Lgl, LGL-1 a une fonction dans la polarité mais elle n'est pas essentielle (Beatty et al., 2010 ; Hoege et al., 2010). LGL-1 se localise asymétriquement au cortex postérieur de l'embryon une-cellule et à la membrane basolatérale de la cellule épithéliale de façon dépendante de PKC-3 et fonctionne de façon redondante avec PAR-2 pour le maintien de la polarité (Beatty et al., 2010). De plus, la surexpression de LGL-1 peut sauver le phénotype de perte de polarité induit par l'inhibition de PAR-2 (Hoege et al., 2010).

Les modules apicaux Crumbs et Par antagonisent le module basolatéral Scrib et vice versa. Par exemple, Lgl et la protéine Par1 sont phosphorylées par aPKC et cette phosphorylation est essentielle pour les exclure de la membrane apicale (Figure 24-25) (Betschinger et al., 2003). Inversement, à la membrane basolatérale, Par1 phosphoryle Baz qui interagit alors avec la protéine 14-3-3 (Par5), empêchant la formation du module Par6/Par3/aPKC à ce niveau (Shin et al., 2006).

IV.3 Les lipides présentent également une localisation polarisée

D'une façon générale, les lipides possèdent une localisation asymétrique au sein même de la bicouche lipidique (Roelofsen et al., 1994) mais aussi d'une membrane polarisée à l'autre. Par exemple, les lipides PIP2 et PIP3 sont largement impliqués dans la polarité épithéliale. La conversion de PIP2 (PtdIns(4,5)P₂) en PIP3 (PtdIns(3,4,5)P₃) est catalysée par la kinase PI3-K alors que la réaction de déphosphorylation est assurée par la phosphatase PTEN (voir le paragraphe II-2-2-1).

Dans les cellules épithéliales MDCK cultivées en kyste, l'utilisation de la sonde à domaine PH de la phospholipase C δ qui reconnaît spécifiquement PIP2, a permis au laboratoire de Keith Mostov de montrer que ce phosphoinositide est enrichi à la membrane apicale (Martin-Belmonte et al., 2007). Et inversement, la sonde à domaine PH de la protéine AKT montre une accumulation de PIP3 spécifiquement à la membrane basolatérale. Cette localisation polarisée s'établit au fur et à mesure que la polarisation du kyste progresse : avant la polarisation, les deux lipides se localisent sur tout le cortex de la cellule mais lorsque la

lumière apicale se met en place, PIP2 se confine à la membrane apicale et de façon concomitante, PIP3 devient exclusivement basolatéral (Martin-Belmonte et al., 2007). Le rôle de PTEN est essentiel dans ce processus car elle permet l'enrichissement de PIP2 au pôle apical et contrôle ainsi la formation de la membrane apicale et donc de la lumière (Martin-Belmonte et al., 2007). D'autres données corroborent cette localisation polarisée. Ainsi, les travaux de Fölsch indiquent que le complexe AP-1B, spécialisé dans le transport basolatéral, est recruté dans les endosomes de recyclage enrichis en PIP3 (Fields et al., 2010). L'altération de la formation de PIP3 induit une délocalisation d'AP-1B des endosomes de recyclage et un défaut de transport des cargos dépendants d'AP-1B à la membrane apicale (Fields et al., 2010).

Ces résultats indiquent que dans les cellules épithéliales de mammifères, PIP2 se localise apicalement et PIP3 à la membrane basolatérale. Cependant, il y a des données chez la drosophile montrant que PIP3 serait enrichi apicalement et non basolatéralement (Krahn et al., 2010). De la même façon dans les cellules neuronales de l'hippocampe, PIP3 se localise préférentiellement au niveau du cône de croissance de l'axone qui présente des similitudes avec la membrane apicale (Horiguchi et al., 2006). La polarité des PIP semble donc peu conservé entre les espèces. Ainsi, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, PIP2 ne présente pas ou très peu de distribution polarisée au cours du bourgeonnement. Par contre, la phosphatidylsérine possède elle, une localisation asymétrique (Fairn et al., 2011). Elle se localise au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, enrichie au niveau du "cou (neck)" du bourgeon et sur la membrane du bourgeon elle-même, issue de la cellule-mère (Fairn et al., 2011). Ce phospholipide est synthétisé dans le RE et est transporté de façon polarisée à la membrane plasmique à travers la voie de sécrétion (Fairn et al., 2011). Par ailleurs, Fairn et collaborateurs ont démontré que la GTPase Cdc42 avait une localisation polarisée similaire à celle de la phosphatidylsérine et que la présence de cette dernière est strictement nécessaire pour le recrutement polarisé de Cdc42 (Fairn et al., 2011).

Dans les cellules épithéliales hépatiques, le glycosphingolipide et le cholestérol synthétisés dans le Golgi et le RE respectivement, sont enrichis au niveau du TGN formant des radeaux lipidiques, résistants au détergent, qui sont ensuite adressés à la membrane apicale avec les protéines cargos apicales associées (Zegers and Hoekstra, 1998 ; van Meer and Simons, 1988). Enfin, des études très récentes confirment la localisation polarisée apicale des GlycoSphingoLipides (GSL) dans le transport apical (Zhang et al., 2011). Le laboratoire de Verena Göbel a montré que les GSL sont enrichis à la membrane apicale et dans des

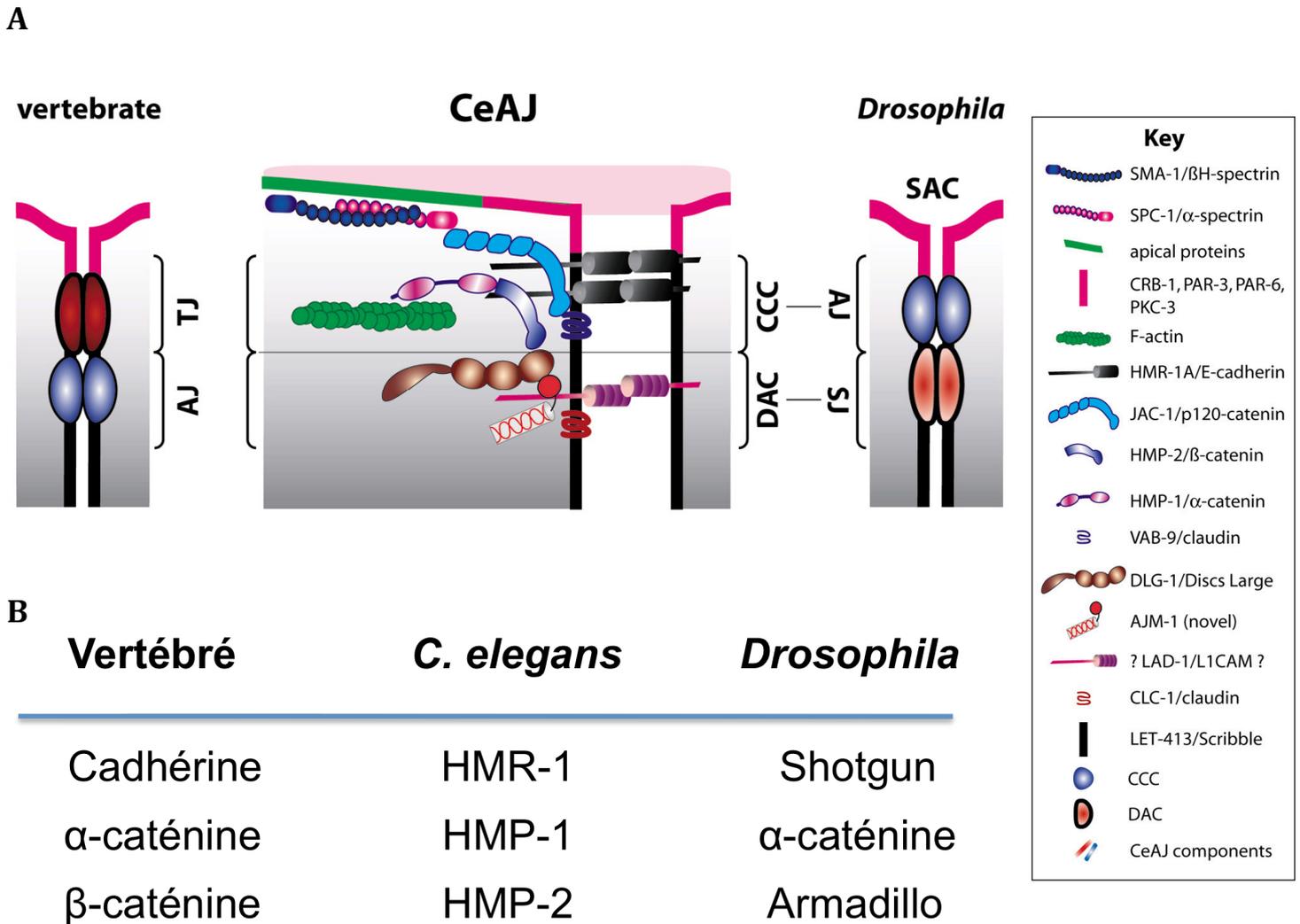


Figure 25 : Les jonctions cellulaires

(A) Schéma comparatif de l'organisation des jonctions cellulaires chez les mammifères, le nématode et la drosophile. Notons que les jonctions serrées des mammifères (tight junction TJ) sont fonctionnellement équivalentes aux jonctions septées (septate junction SJ) de la drosophile. Chez *C. elegans* il n'y a pas de jonctions serrées mais deux complexes forment le *C. elegans* Apical Junction (CeAJ). (B) Composition de la jonction d'adhérence (Adherens Junction AJ) chez les vertébrés, le nématode et la drosophile. Chez *C. elegans* cet AJ correspond au complexe cadhérine/caténine CCC (Cadherin Catenin Complex). (D'après Wormbook)

structures vésiculaires lors de la genèse de la lumière intestinale du nématode *C. elegans*. Ces GSL sont par ailleurs essentiels pour le tri apical que j'aborderai dans le paragraphe « transport apical ».

IV.4 Les jonctions cellulaires

IV.4.1 Généralités sur les jonctions cellulaires chez les vertébrés et les invertébrés

Afin de physiquement séparer la membrane apicale de la membrane basolatérale et éviter toute diffusion aussi bien protéique que lipidique entre ces deux domaines et entre les cellules, il existe une ceinture adhésive qui encercle l'apex de la cellule que l'on appelle "Zonula Adhrens (ZA)" (Figure 26).

Il faut noter que chez *C. elegans* un module formé par deux complexes forme le *C. elegans* Apical junction ou CeAJ qui ressemble au ZA des drosophiles et des vertébrés (Figure 26) (Segbert et al., 2004). Chez les vertébrés, les jonctions serrées remplissent à la fois une fonction de barrière de diffusion intramembranaire ainsi qu'un joint étanche contre la diffusion paracellulaire (Knust and Bossinger, 2002). Ces jonctions serrées sont composées par les protéines transmembranaires occludines mais surtout des claudines qui sont essentielles pour la formation de ces jonctions (Figure 25) (Knust and Bossinger, 2002). Cette fonction de barrière paracellulaire est assurée par les jonctions septées chez la drosophile, qui se situent plus basalement, en dessous de la ZA et sont constituées de Disc large et de Lgl. De plus, au dessus de la ZA on trouve la "Sub-Apical Region (SAR ou SAC)" composé du module Crumbs/Stardust/Disc-lost et du module Par antérieur (Figure 25) (Knust and Bossinger, 2002).

Un composant clé de la ZA dans les trois espèces est la protéine transmembranaire E-cadhérine qui permet la jonction entre les cellules grâce à une interaction homophilique. La cadhérine permet la connexion avec le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de l' α - et de la β -caténine (Armadillo chez la drosophile). La localisation sub-apicale de ces deux protéines est contrôlée par Crumbs et Stardust, dont la déplétion induit une accumulation cytoplasmique sous forme de ponctuations ainsi qu'une localisation membranaire discontinue chez la drosophile (Grawe et al., 1996). En outre, la surexpression de Crumbs induit une localisation anormale d'Armadillo et de la DE-cadhérine, qui ne sont plus uniquement restreintes au niveau sub-apical mais débordent sur la membrane basolatérale (Grawe et al., 1996). La

protéine p120-caténine (p120ctn) est un important régulateur de la cadhérine chez les mammifères et permet de promouvoir l'assemblage latéral de la E-cadhérine et par conséquent une adhérence cellulaire solide (Yap et al., 1998 ; Thoreson et al., 2000). La protéine p120ctn régule la localisation et la stabilité de la VE-cadhérine (Vascular Endothelial) au niveau de la jonction apicale dans les cellules endothéliales (Chiasson et al., 2009). Cependant, chez la drosophile et chez *C. elegans*, Dp120ctn et p120ctn-JAC-1 respectivement ne sont pas essentielles au développement (Myster et al., 2003 ; Pettitt et al., 2003). La perte de fonction de p120ctn augmente la sévérité des défauts morphologiques causée par le mutant hypomorphe *hmp-1/α-caténine* concernant *C. elegans* et par l'inhibition de DE-cadhérine ou armadillo/ β -caténine chez la drosophile (Pettitt et al., 2003 ; Myster et al., 2003). Chez le nématode, ce phénotype s'accompagne d'un arrêt de l'élongation au cours de l'embryogenèse, un détachement de l'actine au niveau de la jonction d'adhérence et un défaut dans le maintien de la cadhérine à la jonction (Pettitt et al., 2003).

Le module Par est largement impliqué dans la formation et dans la stabilisation des jonctions d'adhérence : l'embryon de drosophile privé de Bazooka ou d'aPKC n'est pas capable de maintenir une polarité membranaire après la cellularisation notamment à cause de l'absence de la ZA (Tepass et al., 2001). De plus, la phosphorylation de Baz par aPKC est également essentielle pour réguler la localisation de la DE-cadhérine et d'Armadillo (Morais-de-Sa et al., 2010) et l'inhibition de Par6 empêche l'assemblage d'une ZA fonctionnelle. Enfin, dans les cellules MDCK, la phosphorylation de Par3 par aPKC est nécessaire pour la formation des jonctions serrées (Nagai-Tamai et al., 2002).

IV.4.2 Rôle du trafic dans la formation des jonctions d'adhérence

Cdc42 contrôle la formation des jonctions d'adhérence, en particulier le maintien de la E-cadhérine ainsi que le transport apical de la protéine Crumbs qui toutes deux s'accumulent dans des vésicules Hrs positives élargies lorsque Cdc42 est inhibé (Duncan and Peifer, 2008). Dans ce même contexte, la β -caténine/Armadillo et Par3/Bazooka s'accumulent sous forme de ponctuations cytoplasmiques apicalement localisées alors que Par6 et aPKC se trouvent diffuses dans le cytoplasme (Leibfried et al., 2008), et que la localisation basolatérale de Lgl (Marqueur basolatéral) n'est pas altérée. Chez la drosophile, le laboratoire de Yohanns Bellaïche a également montré l'implication d'un effecteur de Cdc42, Cip4 qui interagit avec la dynamine et l'activateur d'Arp2/3 WASP (Leibfried et al., 2008). Ainsi la perte de fonction

de Cip4, de WASP ou Arp2/3 perturbe l'endocytose de la E-Cadhérine. L'inhibition de Cdc42 et de Cip4 résulte en la formation de tubules endocytiques, un phénotype aussi obtenu lorsqu'on inhibe la dynamine (Leibfried et al., 2008). Ces résultats ont été confirmés par le laboratoire de Buzz Baum, démontrant l'implication de Cdc42/Par6/aPKC dans le maintien des jonctions d'adhérence. Ces données démontrent que l'inhibition séparée de ces trois acteurs induit une discontinuité jonctionnelle, la formation de jonctions ectopiques et un défaut d'organisation du cytosquelette d'actine apical (Georgiou et al., 2008).

Par ailleurs, dans les cellules de mammifères MDCK en monocouche, le compartiment de recyclage apical positif pour Rab11 est nécessaire au transport et au tri de la E-cadhérine issue du TGN vers la membrane basolatérale (Desclozeaux et al., 2008). En effet, la perte de fonction de Rab11 altère l'adressage correct de la E-cadhérine et induit une accumulation de celle-ci dans le cytoplasme et par conséquent une perte de cohésion cellulaire. Enfin, la protéine rab11 est également essentielle au trafic de la E-cadhérine et dans la formation de la lumière au cours de la morphogénèse de cellules MDCK en kyste (Desclozeaux et al., 2008). Chez la drosophile, le complexe exocyste interagit avec Rab11 et est également impliqué dans le transport de la DE-cadhérine au cours de la morphogénèse (Langevin et al., 2005).

La phosphatidylinositol phosphate kinase de type I γ qui catalyse la formation de PIP₂, lie la E-cadhérine et sert d'intermédiaire pour la liaison de la sous-unité μ 1B du complexe AP-1B chez les mammifères. Ceci afin d'assurer le trafic correct de la cadhérine vers les jonctions d'adhérence (Ling et al., 2007).

IV.4.3 Formation des jonctions chez *C. elegans* et implication du complexe Par

Chez *C. elegans* il existe deux jonctions cellulaires regroupées sous le terme de CeAJ (McMahon et al., 2001). Il est constitué du Complexe Cadhérine (HMR-1)-Caténine (α HMP-1 et β HMP-2) et de la claudine VAB-9 (CCC) localisé au pôle sub-apical et du complexe Disc-large1/AJM-1 (DAC) sous-jacent (Figure 26). Les deux complexes forment deux domaines distincts ne présentant pas ou très peu de chevauchement (Segbert et al., 2004). Enfin, à la membrane basolatérale se trouve la protéine Scrib-LET-413 qui permet la compaction du CeAJ (Figure 26). En effet, les embryons déficients pour *let-413* montrent une jonction étendue sur la membrane latérale au détriment d'une localisation restreinte au pôle sub-apical dans un contexte normal (Legouis et al., 2000 ; McMahon et al., 2001).

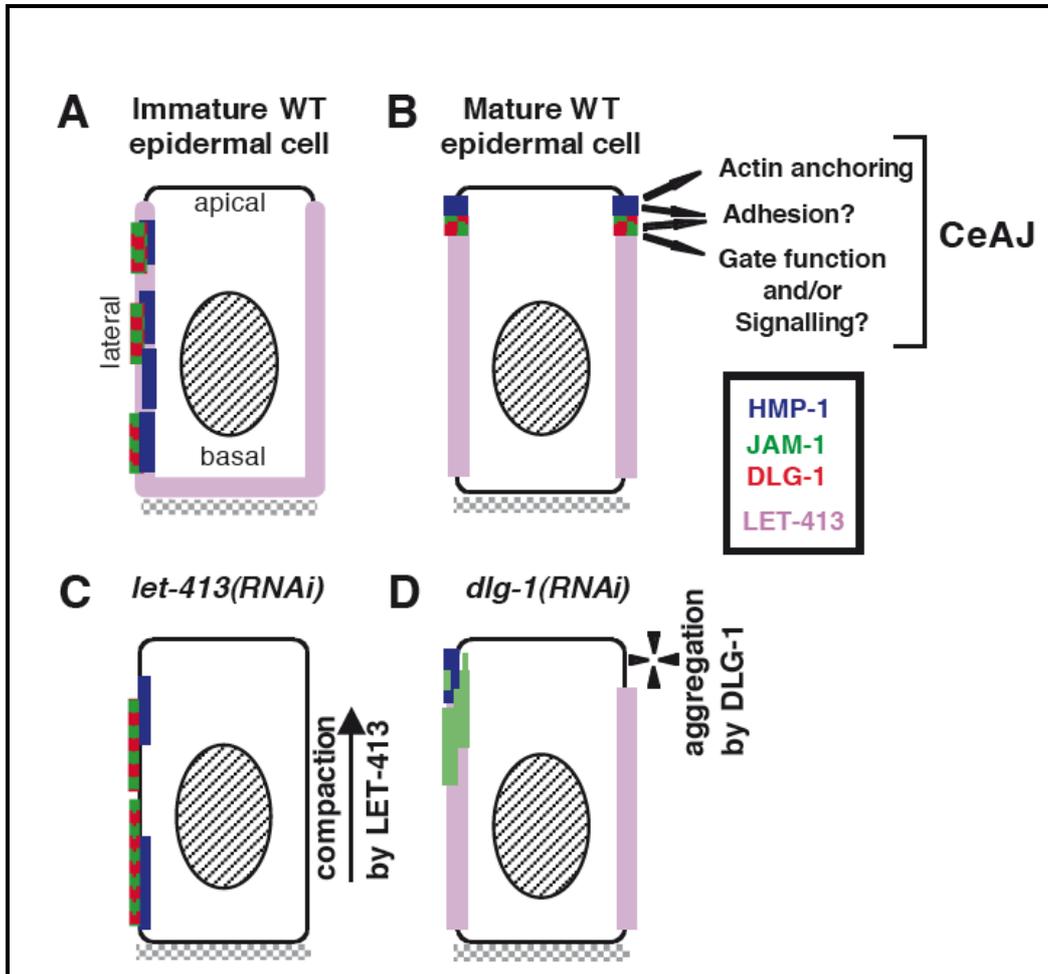


Figure 26 : Formation des jonctions épithéliales chez *C. elegans*

Chez *C. elegans* les jonctions cellulaires sont formées par les complexes CCC et DAC. Le complexe CCC, est formé par la cadhérine-HMR-1, l' α -caténine-HMP-1, la β -caténine-HMP-2 et la claudine VAB-9 alors que le complexe DAC localisé sous le complexe CCC est formé par DLG-1 et AJM-1. L'ensemble CCC et DAC constitue le *C. elegans* Apical Junction ou CeAJ. (A) Dans l'épiderme immature, le CeAJ s'étend latéralement et la protéine Scrib-LET-413 possède une localisation basolatérale. (B) Au fur et à mesure que la cellule se polarise et mature, LET-413 se relocalise à la membrane latérale et remonte vers les jonctions apicales. Cette remontée va permettre de confiner et de concentrer le CeAJ au pôle apical. (C) La perte de fonction de *let-413* induit une descente latérale du CeAJ et le mutant *dlg-1* (DAC) montre une délocalisation latérale d'AJM-1 (D) mais n'affecte que faiblement la localisation d'HMP-1 (CCC). (McMahon et al., 2001)

Au niveau ultrastructural, la protéine AJM-1 est localisée au niveau de la structure dense aux électrons correspondant au CeAJ (Koppen et al., 2001) et l'intégrité de DLG-1 est requise pour correctement localiser AJM-1 (McMahon et al., 2001). Le positionnement de cette jonction est crucial pour restreindre la taille du pôle apical. La protéine transmembranaire CHE-14 (Michaux et al., 2000) et cytosolique PAR-6 normalement à la membrane apicale, descendent à la membrane latérale lorsque les gènes *dlg-1* et *let-413* sont déplétés (McMahon et al., 2001).

Comme je l'ai évoqué précédemment, le module Par régule la formation des jonctions. Totong et collaborateurs ont démontré que la perte de fonction de *par-6* préserve la polarité apico-basale mais perturbe dramatiquement la formation des jonctions (Totong et al., 2007). En effet, les différents composants jonctionnels tels que DLG-1, AJM-1, la cadhérine-HMR-1 ou encore l' α -caténine-HMP-1 ne forment plus une ceinture jonctionnelle continue mais une structure fragmentée dans le tissu intestinal (Totong et al., 2007). Il a été donc proposé que *par-6*, tout comme *let-413*, est requis pour compacter les protéines jonctionnelles apicales, contrôlant ainsi l'adhésion cellulaire (Totong et al., 2007 ; McMahon et al., 2001). Il manque cependant des données de microscopie électronique pour évaluer le rôle de PAR-6 dans l'adhésion. Le laboratoire de Jeremy Nance a révélé l'importance de PAR-3 dans la formation dynamique des protéines de jonction et de polarité au cours de la polarisation des cellules intestinales du nématode *C. elegans* (Achilleos et al., 2010). PAR-3 colocalise avec HMR-1 et HMP-1 formant un foci qui est spécifiquement adressé à la membrane apicale présomptive contrôlant la formation de lumière intestinale. La perte de fonction de *par-3* induit une localisation diffuse de PAR-6 endogène et une fragmentation de DLG-1 et de HMR-1 (Achilleos et al., 2010). Cependant dans l'épithélium épidermal, cette fonction de *par-3* n'est pas conservée, les jonctions apicales se forment en l'absence de *par-3* et c'est *par-6* dans cet épithélium qui est nécessaire pour la maturation de la jonction (Achilleos et al., 2010).

Bien que la machinerie de base soit conservée, nous constatons que d'un épithélium à l'autre, les mécanismes nécessaires au maintien des jonctions d'adhérence varient. Cette variation peut notamment s'expliquer par les contraintes mécaniques plus ou moins importantes qui apparaissent au cours du développement. Par exemple, la spécificité de l'épiderme chez *C. elegans* vient du fait que ce tissu est soumis à des tensions musculaires au cours de l'élongation de l'embryon alors que le tissu intestinal suit le mouvement de l'élongation.

IV.5 Les complexes de polarité sont impliqués dans les cancers

Les données les plus convaincantes qui établissent le lien entre la polarité cellulaire et l'apparition de cancers proviennent des études faites chez la drosophile (Bilder, 2004). Les protéines Lgl, Dlg et Scrib ont été décrites comme de potentiels suppresseurs de tumeurs (Tumor Suppressor Gene « TSG ») puisque la déplétion de chacune induit une transformation néoplasique et un développement tumorigénique dans le cerveau et dans les discs imaginaux de larves de drosophile (Bilder, 2004). De façon cohérente, de nombreuses études menées sur des patients humains, présentant des tumeurs primaires, montrent une diminution voire une perte de l'expression de ces mêmes protéines (Lee and Vasioukhin, 2008). Un sauvetage du phénotype néoplasique est possible par ré-expression de Dlg et Lgl dans les lignées de cellules tumorales, suggérant que ces protéines sont également des suppresseurs de tumeurs dans les cellules humaines (Lee and Vasioukhin, 2008).

La protéine Kinase aPKC est surexprimée dans les cancers ovariens et dans les cancers du poumon (Zhang et al., 2006 ; Regala et al., 2005) et la perte de fonction d'aPKC indique que cette kinase joue un rôle causal dans la régulation de la prolifération cellulaire. Chez la souris, aPKC est également impliquée dans la carcinogenèse du colon induite par Ras (Murray et al., 2004) et cette protéine est cruciale pour la prolifération des cellules du glioblastome humain (Donson et al., 2000). Enfin, aPKC est surexprimée dans les cancers du sein humain et la localisation apicale de cette protéine est altérée (Kojima et al., 2008).

La phosphatase PTEN est également un suppresseur de tumeurs qui est impliquée dans la régulation de la polarité épithéliale (Rossi and Weissman, 2006). La ségrégation membranaire spatiale et spécifique de PIP3 et de PIP2 au pôle basolatéral et apical respectivement, est cruciale pour la polarité apico-basale (Martin-Belmonte et al., 2007). PIP2 se localise à la membrane apicale et cette localisation est dépendante de PTEN qui elle aussi se localise à la membrane apicale, jouant un rôle pivot pour la mise en place et le maintien de la polarité apico-basale (Rossi and Weissman, 2006).

La surexpression de Par6 induit une prolifération des cellules mammaires MCF-10A qui est complètement dépendante de son association avec les autres membres du module Par, à savoir aPKC et Cdc42 (Nolan et al., 2008). Nolan et collaborateurs ont également démontré que Par6 est surexprimée dans les cancers primaires du sein chez la femme. Ces résultats suggèrent que le module formé par Par6/aPKC/Cdc42 régule la prolifération cellulaire (Nolan et al., 2008).

Quant à Cdc42, cette protéine peut se comporter comme un oncogène ou un suppresseur de tumeur selon le contexte et induire des métastases (Stengel and Zheng, 2011). Cdc42 est surexprimée dans de nombreux cancers humains tels que le cancer des poumons et le cancer colorectal. Elle régule notamment le développement des cellules mammaires et le processus de métastases (Bouzahzah et al., 2001). Chez la souris, la perte de fonction de Cdc42 induit des défauts hépatiques qui se traduit par une jaunisse (van Hengel et al., 2008). Ces souris développent des hépatomégalies très tôt après la naissance et présentent des signes de transformation hépatique tels que la formation de nodules et de tumeurs (Bouzahzah et al., 2001).

La majorité des cancers sont des carcinomes issus des cellules épithéliales et sont souvent corrélés à un dysfonctionnement ou à un défaut de localisation ou d'expression de la E-cadhérine (Jeanes et al., 2008). Des données sur les cellules et sur les animaux ont montré que ce dysfonctionnement induit la progression tumorale, l'invasion et la formation de métastases (Vleminckx et al., 1991). Ce phénotype peut être sauvé dans les cellules tumorales β -pancréatiques privées de la E-cadhérine par réexpression de la E-cadhérine (Perl et al., 1998).

Ensemble, ces données démontrent que la mise en place et le maintien de la polarité épithéliale doivent être finement régulés afin de prévenir toute dérégulation pathologique de ce tissu. Parmi les processus qui contrôlent cette polarité, le trafic membranaire différentiel apico-basal joue un rôle essentiel.

IV.6 Trafic membranaire et polarité : une étroite relation

Un aspect très important de la polarité épithéliale consiste à établir et à maintenir une polarité apico-basale, régulée par le trafic intracellulaire. Envoyer spécifiquement des protéines et des lipides à la membrane apicale et à la membrane basolatérale représente un aspect essentiel de la polarité épithéliale. Les signaux et les mécanismes du transport basolatéral sont maintenant bien caractérisés. Cependant, bien qu'on dispose de données solides sur les signaux, les mécanismes du transport apical ne sont pas bien identifiés. Dans cette partie, je présenterai les données de la littérature concernant le transport apical et le transport basolatéral, puis je montrerai comment le trafic membranaire contrôle le transport des déterminants de polarité et enfin comment les déterminants de polarité, à leur tour, régulent le trafic endocytaire.

IV.6.1 Trafic apico-basal

IV.6.1.1 Le trafic basolatéral

Le trafic basolatéral a été étudié par plusieurs laboratoires grâce à une porte d'entrée qui a simplifié cette étude. Le complexe adaptateur pour la clathrine AP-1B, exprimé spécifiquement dans les cellules épithéliales, permet de transporter spécifiquement des protéines basolatérales (Folsch et al., 1999). Dans les cellules LLC-PK1, dépourvues de μ 1-B, les protéines basolatérales LDLR et TfnR ne sont plus capables de se localiser au pôle basolatéral (Folsch et al., 1999). Ces protéines possèdent des motifs signalétiques reconnus par la sous-unité μ 1-B du complexe AP-1B. Le motif tyrosine des protéines LDL et VSV est nécessaire et reconnu par AP-1B pour le transport basolatéral (Folsch et al., 1999 ; Deborde et al., 2008). Quant à TfnR, il possède bien un motif tyrosine qui est requis pour son internalisation mais pas pour son transport basolatéral (Odorizzi and Trowbridge, 1997). Ici, c'est une séquence non basée sur la tyrosine appelée GDNS qui contrôle ce transport basolatéral. Le complexe AP-1B est un adaptateur pour la clathrine, par conséquent la perte de fonction de la clathrine devrait donc phénocopier AP-1B. C'est en effet le cas : le laboratoire de Rodriguez-Boulan a montré que la déplétion de la clathrine perturbe la polarité apico-basale par un transport aberrant de cargos normalement basolatéraux vers la membrane apicale (Deborde et al., 2008). Enfin, Deborde et collaborateurs ont montré que la déplétion de la clathrine perturbe la localisation basolatérale de la cadhérine et de la glycoprotéine CD147 qui possèdent un motif dileucine et leucine/cluster acide respectivement. Ces deux protéines ne dépendent pas d'AP-1B pour leur transport basolatéral mais dépendent de la clathrine, ce qui suggère que d'autres adaptateurs sont impliqués dans leur transport basolatéral (Deborde et al., 2008). Enfin, l'inhibition de la clathrine ou d'AP-1B n'affecte pas le transport des cargos apicaux, ce qui semble démontrer que dans les cellules MDCK, ni la clathrine ni ses adaptateurs ne sont requis pour le trafic apical (Folsch et al., 1999 ; Deborde et al., 2008).

Par ailleurs, le complexe exocyste s'associe spécifiquement avec AP-1B et est impliqué dans le transport basolatéral (Folsch et al., 2003). Le moteur myosine VI qui se déplace sur les filaments d'actine est également impliqué dans le trafic basolatéral de la glycoprotéine transmembranaire VSV-G mais n'est pas requis pour le transport de cargo apical (Au et al., 2007). La myosine VI colocalise avec AP-1B et est impliquée dans le transport de cargos basolatéraux dépendants d'AP-1B (Au et al., 2007).

Les protéines Rabs sont également impliquées dans le transport basolatéral. Ainsi, Rab8 se localise dans une région périnucléaire, associée aux endosomes de recyclage et contrôle la localisation basolatérale de VSV-G avec laquelle Rab8 colocalise (Huber et al., 1993) et plus généralement des cargos dépendants d'AP-1B. Cependant, l'inhibition de Rab8 n'affecte pas la localisation de protéines apicales telles que l'HemAgglutinin protéine HA du virus influenza (Ang et al., 2003 ; Huber et al., 1993). On peut également citer la GTPase Rab10 qui, aussi bien chez les mammifères que chez le nématode *C. elegans*, est impliquée sélectivement dans le transport basolatéral (Schuck et al., 2007 ; Chen et al., 2006).

IV.6.1.2 Le transport apical

Contrairement au transport basolatéral, le transport apical est mal caractérisé bien que récemment de nouvelles études tentent de mieux élucider ce processus. Deux types de transport apical existent : le transport indirect et le transport direct. Dans le transport indirect, la protéine cargo apicale est envoyée à la membrane basolatérale dans un premier temps puis de la membrane basolatérale vers la membrane apicale selon le processus de transcytose (Hemery et al., 1996) alors que la voie directe trie cette protéine depuis le TGN vers la membrane apicale (Lisanti et al., 1990).

De nombreuses protéines apicales empruntent la voie indirecte mais la protéine qui a largement contribué à comprendre ce mécanisme vient du récepteur polymérique IgA (pIgA-R) étudié dans les hépatocytes de rat ou transfecté de façon stable dans les cellules MDCK (Mostov, 1994). IgA se fixe à son récepteur IgA-R à la surface basolatérale et l'ensemble est internalisé grâce à des vésicules tapissées de clathrine et est ensuite transporté vers la membrane apicale (Sztul et al., 1991). Cette translocation se fait entre 30 à 60 minutes après internalisation. Dans les cellules épithéliales du thorax dorsal de la drosophile, la transcytose est un événement essentiel pour la signalisation Notch (Benhra et al., 2010). Ainsi, le ligand Delta se localise à la membrane basolatérale puis est internalisé de cette membrane grâce à Neuralized et AP-2 puis est ségrégué vers la membrane apicale, là où s'accumule Notch, permettant ainsi l'activation de Notch (Benhra et al., 2010). Dans les cellules hépatiques, la majorité des protéines apicales est transportée de cette façon (Hemery et al., 1996). Mais il a également été démontré que la voie directe existe, notamment pour le transport des sphingolipides vers la surface apicale (Zegers and Hoekstra, 1998).

Deux signaux régulant le transport apical ont été identifiés : il s'agit de l'ancre GPI et du motif N-glycan. Les protéines à ancre GPI sont spécifiquement adressées à la membrane apicale (Lisanti et al., 1990) et cette ancre est nécessaire et suffisante pour cet adressage apical (Lisanti et al., 1990). Par la suite, il a été montré que les protéines à ancre GPI sont incorporées dans des membranes lipidiques résistantes au détergents, lorsqu'elles arrivent au niveau du Golgi (Brown and Rose, 1992). Ces radeaux lipidiques forment alors des microdomaines lipidiques au sein de la membrane plasmique apicale (Coskun and Simons, 2010). Quant au motif N-glycan, le laboratoire de George Sachs a démontré son implication dans le transport apical (Vagin et al., 2004). En effet, la localisation de l'enzyme gastrique H,K-ATPase à la membrane apicale dépend de sa N-glycosylation. Des mutations sur les sites de glycosylation de cette enzyme induisent une diminution dramatique de cette enzyme à la membrane apicale et de façon concomitante une accumulation intracellulaire (Vagin et al., 2004). L'ajout de ce motif sucré est nécessaire et suffisant pour adresser la sous-unité $\beta 1$ de l'enzyme Na,K-ATPase normalement basolatérale vers la membrane apicale (Vagin et al., 2005). Cette nouvelle localisation est potentialisée par le degré de cette N-glycosylation : plus on ajoute de sites de N-glycosylation, plus la protéine sera adressée à la membrane apicale (Vagin et al., 2004).

Le rôle des radeaux lipidiques (lipid raft) dans le trafic apical a été proposé mais reste controversé. Formés au niveau du TGN, ces radeaux lipidiques enrichis en cholestérol et en sphingolipides permettent de recruter les protéines apicales et de les transporter vers la membrane apicale (Zegers and Hoekstra, 1998 ; van Meer and Simons, 1988). Dans les cellules HeLa, la protéine HA est transportée au pôle apical grâce à des vésicules issues du TGN constituées de radeaux lipidiques (Ellis et al., 2004). Par ailleurs, Ellis et collaborateurs ont démontré que ce transport apical depuis le TGN est indépendant d'Arf1, ce qui suggère que ce transport ne dépend pas des adaptateurs classiques et qu'un nouveau mécanisme est alors requis dans ce processus.

FAPP2 qui s'associe avec PI4P, enrichi au TGN, est un candidat intéressant pour le transport apical car cette protéine possède un motif de transfert glycolipidique (Vieira et al., 2005). Le laboratoire de Simons a démontré que FAPP2 est impliquée dans le transport apical de HA dans les cellules MDCK alors que le transport de cargos basolatéraux n'est pas altéré (Vieira et al., 2005). La relation entre FAPP2 et les radeaux lipidiques reste un aspect crucial qu'il faudrait investiguer pour mieux comprendre les mécanismes du transport apical (Vieira et al., 2005). Enfin, des études très récentes indiquent que les glycosphingolipides GSL sont requis

pour la polarité apico-basale en contrôlant le tri de protéines apicales (Zhang et al., 2011). Ainsi l'altération du processus de synthèse de ce lipide induit un défaut de tri des protéines apicales, dont ERM-1, qui sont délocalisées à la fois à la membrane apicale et à la membrane basolatérale (Zhang et al., 2011) tandis que la localisation latérale de Scrib-LET-413 n'est pas modifiée.

Des éléments clés du trafic intracellulaire régulent également le transport apical. C'est notamment le cas des protéines Rabs. La GTPase Rab8 contrôle spécifiquement la localisation de protéines cargos apicales DPPIV et PEPT1 dans les cellules intestinales de souris (Sato et al., 2007) (Kato et al., 2009). Ainsi, les souris déficientes pour Rab8 accumulent ces protéines apicales dans le cytoplasme et le phénotype intestinal consiste en une atrophie des microvillosités et la formation de lumières ectopiques (inclusions microvillositaires) (Sato et al., 2007). Par ailleurs, chez des patients présentant cette maladie d'inclusions microvillositaires, l'expression de Rab8 est fortement réduite (Sato et al., 2007). Notons que Rab11 et Rab8, de concert avec le complexe exocyste sont impliqués dans le transport apical de la podocalyxine, contrôlant ainsi la formation de lumière apicale dans les cellules MDCK en 3D (Bryant et al., 2010). La myosine 5B intervient en amont de Rab8a et de Rab11a et est impliquée dans le trafic apical et dans la formation de lumière apicale dans les cellules MDCK cultivées en kyste (Roland et al., 2010). En effet l'interaction de Myo5B avec Rab8a et Rab11a est nécessaire pour le transport apical de la podocalyxine et la genèse *de novo* d'une lumière apicale (Roland et al., 2010). Cette fonction apicale de Myo5B est conservée chez l'homme, où des mutations sur ce gène induisent la formation de lumières ectopiques et perturbent la polarité épithéliale (Muller et al., 2008). Récemment le moteur kinésine KIF5C a été identifié comme étant impliqué dans le trafic apical dans les cellules MDCK (Astanina and Jacob, 2010). Des vésicules positives pour KIF5C issues du TGN contiennent les protéines cargos apicales, SI (Sucrase Isomerase) transportée par des radeaux lipidiques et P75 (neurotrophin receptor) indépendant des radeaux lipidiques (Astanina and Jacob, 2010). La perte de fonction de cette kinésine perturbe le transport apical de ces deux protéines cargos dans les cellules MDCK (Astanina and Jacob, 2010).

L'ensemble de ces données souligne de façon intéressante qu'une perturbation du trafic apical est souvent associée à un phénotype de polarité qui n'est pas observé lorsqu'il s'agit du trafic basolatéral. Cette nécessité du trafic apical pour l'intégrité de la polarité épithéliale s'explique par l'importance d'adresser correctement les déterminants de polarité apicale afin de spécifier la membrane apicale.

IV.6.2 Lien entre trafic et localisation des déterminants de polarité

Comme je l'ai mentionné précédemment, la localisation apicale de Crumbs est dépendante du trafic membranaire. En effet, la perte de fonction de la syntaxine Avalanche (endosome précoce) ou de Rab5 induit une accumulation de Crumbs à la membrane apicale, responsable de l'expansion apicale et associée à une prolifération cellulaire et donc à la formation de tumeurs (Lu and Bilder, 2005). Il n'est pas vraiment étonnant que le trafic intracellulaire régule la localisation de Crumbs sachant que c'est une protéine transmembranaire et qu'elle utilise donc le trafic intracellulaire.

Concernant les autres protéines de déterminants de polarité, telles que Par3-Baz, aPKC ou encore Cdc42, qui elles ne sont pas transmembranaires, le trafic membranaire joue également un rôle crucial. Ainsi, dans les cellules épithéliales folliculaires de l'ovarium de drosophile, les clones syntaxine/*avalanche* présentent une délocalisation basolatérale d'aPKC normalement apicale (Lu and Bilder, 2005). Dans ces mêmes clones, on constate que Baz n'est plus capable d'être recrutée à la membrane apicale et se délocalise sous forme diffuse dans le cytoplasme (Lu and Bilder, 2005).

Dans l'embryon une-cellule de *C. elegans*, la perte de fonction de *rab-11* induit un défaut de polarité antéro-postérieure de PAR-3 et PAR-2 : PAR-3 devient homogène au cortex antérieur et postérieur tandis que la localisation de PAR-2 au cortex postérieur devient significativement réduite au pôle postérieur (Zhang et al., 2008). La dynamine DYN-1 se localise au cortex antérieur de l'embryon une-cellule de *C. elegans* et régule le maintien de la localisation corticale antérieure de PAR-6 (Nakayama et al., 2009). De plus, l'inhibition de *dyn-1* entraîne une délocalisation de CDC-42 sur la surface postérieure au détriment d'une localisation normale, exclusivement antérieure (Nakayama et al., 2009).

Comme décrit précédemment, Cdc42 est un acteur majeur de la polarité qui nécessite le trafic intracellulaire pour sa localisation polarisée dans les astrocystes (Osmani et al., 2010). Cdc42 qui se trouve sur des endosomes positifs pour EEA-1 est transportée avec sa GEF β PIX au niveau du front de migration de façon dépendante d'Arf6 (Osmani et al., 2010). L'inhibition d'Arf6 perturbe également la localisation des protéines Par6 et aPKC dont le recrutement dépend de Cdc42. Enfin, notons que la perte de fonction de Rab5 ou de Eps15 perturbe également le recrutement de Cdc42 au front de migration (Osmani et al., 2010).

Le complexe exocyste interagit avec le complexe Par3/aPKC et est impliqué avec Rab8 et Rab11 dans l'adressage de Par3, d'aPKC et de Cdc42 à la membrane apicale présomptive dans

les cellules MDCK cultivées en kyste (Bryant et al., 2010). Le transport apical de Cdc42 et de sa GEF Tuba permet l'activation de Cdc42 spécifiquement à la membrane apicale du kyste, nécessaire à la formation de la lumière apicale (Bryant et al., 2010).

L'ensemble de ces données indique clairement que le trafic intracellulaire pourrait contrôler la polarité épithéliale à travers le trafic dynamique direct ou non des déterminants de polarité. Cet aspect sera amplement examiné dans notre étude.

IV.6.3 Les déterminants de polarité contrôlent le trafic intracellulaire

Cdc42 régule le cytosquelette notamment dans les cellules de mammifères CHO. Elle lie N-WASP qui à son tour se fixe à Arp2/3, active la nucléation de l'actine qui polymérise et régule la formation et la motilité des vésicules (Bu et al., 2010). Dans les cellules épithéliales du notum de la drosophile, l'inhibition de Cdc42, de Par6 ou d'aPKC induit un défaut d'internalisation de la E-cadhérine qui s'accumule à la surface apicale (Georgiou et al., 2008). Ce défaut d'endocytose se manifeste également par la formation intracellulaire de tubules ou de ponctuations attachées avec la surface cellulaire et contenant la E-cadhérine, l' α - et la β -caténine. Un phénotype similaire est obtenu lorsqu'on perturbe l'endocytose à la membrane en inhibant la dynamine (Georgiou et al., 2008). Ces résultats sont confirmés par le laboratoire de Yohanns Bellaïche démontrant l'importance de Par6, aPKC et de Cdc42 dans le contrôle de l'endocytose de la E-cadhérine avec l'implication d'Arp2/3 et de son activateur WASP comme régulateurs de ce processus (Leibfried et al., 2008). Enfin, Harris et Tepass ont démontré que Cdc42, Par6 et aPKC régulent l'endocytose dans l'embryon de drosophile. La déplétion de ces protéines induit une délocalisation de protéines apicales et jonctionnelles dont la E-cadhérine, due en partie par l'accumulation de Crumbs dans les endosomes tardifs (Harris and Tepass, 2008). Ces résultats démontrent l'implication des déterminants de polarité dans la régulation du trafic intracellulaire.

De façon inattendue, un crible sur tout le génome réalisé chez *C. elegans*, ciblant des gènes requis dans le trafic endocyttaire, a mis en évidence le rôle des déterminants de polarité PAR-3, PAR-6, PKC-3 et CDC-42 dans la régulation des processus endocytiques (Balklava et al., 2007). L'équipe de Barth Grant a utilisé le transport de la vitellogénine (YP170) comme modèle pour effectuer son crible. La protéine YP170 est sécrétée à la membrane basolatérale des cellules intestinales puis internalisée, via un récepteur RME-2, par les oocytes. Utilisant ce système, Balklava et collaborateurs ont montré que les déterminants de polarité PAR-

3/PAR-6/PKC-3 et CDC-42 régulent l'endocytose de YP170 et de SS::GFP et contrôlent également la morphologie des endosomes de recyclage positifs pour RAB-11 ou RME-1 (Balklava et al., 2007). Par ailleurs, CDC-42 et RME-1 colocalisent et dans l'embryon une-cellule, l'enrichissement au pôle antérieur de RME-1 est régulé par *par-6* et *cdc-42* (Balklava et al., 2007).

L'ensemble des données montre donc une régulation mutuelle entre le trafic intracellulaire et les déterminants de polarité.

Au cours de ce chapitre, j'ai pu montrer l'importance du trafic intracellulaire dans la régulation de la polarité épithéliale, notamment concernant le trafic apico-basal. L'altération de la polarité dans un tissu épithélial en monocouche peut induire un défaut de localisation de protéines ou de déterminants de polarité ou encore une désorganisation des jonctions cellulaires. Le phénotype final peut être la formation d'un épithélium non jointif qui se développe en multicouches. D'autres phénotypes sont spécifiques des épithéliums tubulaires auxquels je vais maintenant m'intéresser.

V. Déterminants de polarité dans la formation de lumière

De nombreuses études sur la polarité ont été effectuées sur un modèle de cellules épithéliales en deux dimensions. Dans un système en trois dimensions, qu'il s'agisse de cellules cultivées en kyste *in vitro* ou *in vivo* dans le tissu intestinal ou dans les cellules hépatiques, les cellules doivent définir un pôle apical particulier qui formera la lumière de ce tissu. Comme je l'ai évoqué précédemment, les protéines de polarité apicales Par3, Par6, aPKC et Cdc42, ainsi que le transport polarisé sont requis pour spécifier l'identité de la membrane apicale. Dans ce chapitre, j'exposerai leurs fonctions dans la formation de lumière tant dans les cellules en culture que dans des conditions physiologiques, dans le tissu intestinal.

V.1 Modèles de luminogénèse

Trois modèles ont été décrits dans la formation d'un tube à partir de cellules précurseurs non-polarisées (Figure 27) : il s'agit du modèle de "creusage" (Hollowing model), du modèle de

"cavitation" (Cavitation model) et un dernier modèle émanant de la formation du tube cardiaque chez la drosophile appelé la "répulsion membranaire" (Membrane repulsion).

Dans le modèle du creusage, les cellules en cours de polarisation se divisent et au stade deux cellules, la membrane basolatérale correspond au site de contact cellule-cellule alors que le pôle apical fait face à la matrice extracellulaire (Figure 27b). Il a été proposé que des organites spécialisés appelés VACs pour Vacuolar Apical Compartments, sont formés et sont envoyés au site de formation de la future lumière (Vega-Salas et al., 1987). La fusion de ces VACs entre eux et avec le site d'intersection de la membrane plasmique des cellules en cours de division est proposée comme l'initiateur de la formation de la lumière (Willenborg and Prekeris, 2011). Par ailleurs, dans les cellules MDCK, il a été montré que la podocalyxine ainsi que des polysaccharides sont sécrétés dans la lumière grâce aux VACs, maintenant l'espace luminal et empêchant la fusion des nouvelles membranes apicales qui causerait alors la fermeture de la lumière (Willenborg and Prekeris, 2011). Ces VACs sont responsables de l'adressage d'autres composants à destination de la membrane luminaire apicale : PIP2 est enrichi à la membrane apicale grâce à la phosphatase PTEN et permet de recruter Cdc42 via l'annexine-2 (Bryant and Mostov, 2008). L'activation de Cdc42 va ensuite permettre le recrutement de Par6 et d'aPKC, assurant l'adressage de protéines apicales. De plus, Rab11 est également impliquée dans le transport apical de Crumbs à travers les VACs (Willenborg and Prekeris, 2011). Ce type de modèle a été observé *in vivo* dans l'organogenèse 3D du rein et des vaisseaux sanguins (Bryant and Mostov, 2008).

Le deuxième modèle dit de cavitation vient de l'étude de la formation de tube ectodermique dans l'embryon précoce de souris (Coucouvanis and Martin, 1995). Au cours de cette cavitation, des cellules prolifèrent et forment une masse cellulaire (Figure 27a). Ensuite, les cellules qui sont au contact de la matrice extracellulaire se polarisent par rapport aux cellules centrales qui elles, vont subir une apoptose dépendante des protéines proapoptotiques BCL2 et BIM pour former l'espace luminal central (Willenborg and Prekeris, 2011) (Bryant and Mostov, 2008). De nombreuses protéines sont impliquées dans la formation de l'espace luminal, telles que Crumbs, Scribble, et le complexe Par. Elles sont requises pour inhiber la prolifération cellulaire chez la drosophile (Bilder, 2004) et particulièrement Par6, aPKC et Scribble régulent l'apoptose des cellules lumineuses au cours de la cavitation, assurant la formation du tube polarisé des cellules mammaires (Aranda et al., 2006). Des données physiologiques *in vivo* viennent étayer ce modèle, notamment la formation des glandes mammaires et salivaires, montrant de nombreuses cellules apoptotiques au centre du tube en

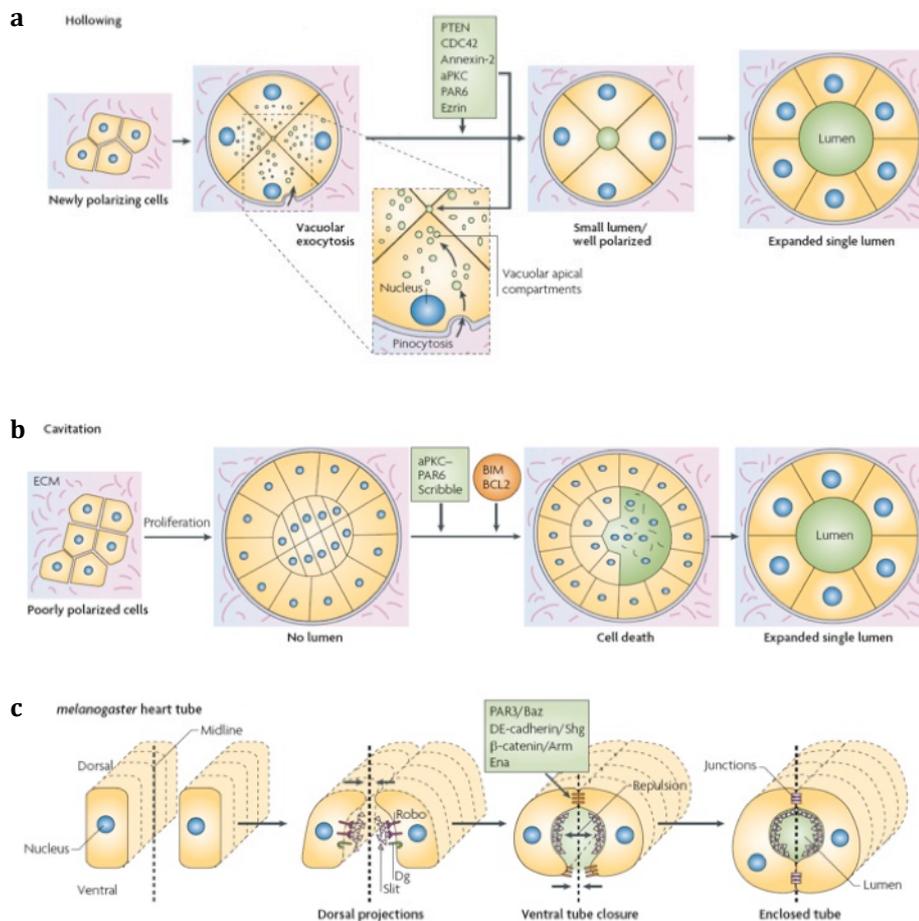


Figure 27 : Modèles pour la formation de lumière

a) Hollowing : ce modèle dit de creusage, correspond au transport polarisé des VACs au site d'intersection des membranes cellulaires. A ce niveau ces VACs fusionnent entre eux et avec la membrane plasmique, initiant la formation de la future lumière. Ces VACs positifs pour Rab11 permettent le transport apical luminal de PIP2, de Crumbs, et du complexe PAR6/aPKC régulant la tubulogénèse. **b) Cavitation** : dans ce modèle, les cellules se divisent de façon non polarisée jusqu'à former une masse cellulaire où les cellules en contact de la matrice extracellulaire se polarisent et les cellules centrales subissent un processus apoptotique dépendant de BCL-2 et BIM afin de dessiner la lumière centrale. Les complexes PAR6/aPKC, Scribble et Crumbs participent à ce processus. **c) Répulsion membranaire** : ce modèle découle de la formation du tube cardiaque de la drosophile. Dans un premier temps, les cellules s'alignent de part et d'autre d'une ligne médiane, l'extrémité ventrale puis l'extrémité dorsale des cellules miroirs établissent un contact, formant un tube central. Le ligand-récepteur Slit-Robo est nécessaire pour la répulsion des membranes lumineuses et pour l'exclusion de la cadhérine dans cette région. (Willenborg and Prekeris, 2011)

formation (Humphreys et al., 1996).

Le modèle de répulsion membranaire découle de l'observation de la formation du tube cardiaque chez *Drosophila melanogaster* (Medioni et al., 2008). Dans ce processus deux rangées de cellules myoendothéliales s'alignent le long d'une ligne médiane et projettent des extensions membranaires vers les cellules en vis-à-vis de part et d'autre de la ligne médiane (Figure 27c). Ce processus résulte en la formation de deux rangées de cellules dont les extrémités établissent un contact, laissant un espace ouvert entre ces deux rangées (Bryant and Mostov, 2008). La répulsion membranaire se fait entre les membranes formant la lumière du tube grâce au ligand-récepteur Slit-Robo qui exclut le complexe cadhérine dans cette région, permettant la formation d'une lumière (Santiago-Martinez et al., 2008). Cependant, aucune donnée n'est disponible quant à la sécrétion de molécules anti-adhésives dans l'espace luminal telle que la podocalyxine ou encore l'implication de Crumbs, Scribble ou encore le complexe Par dans ce processus de luminogenèse (Bryant and Mostov, 2008).

V.2 Formation de lumière *in vitro*

Dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2 cultivées en kyste, la surface apicale de chaque cellule fait face à une lumière centrale (Jaffe et al., 2008). Au cours de la division des cellules Caco-2 en kyste, le pôle apical des cellules filles est maintenu au centre du kyste, et cela grâce à une orientation correcte du fuseau (Jaffe et al., 2008). Dans ce kyste Caco-2, la E-cadhérine se localise à la membrane basolatérale, tandis que les protéines apicales aPKC et ZO-1, marqueur des jonctions serrées, se localisent à la membrane apicale luminale. La GTPase Cdc42 intervient également dans ce processus de genèse de lumière : elle interagit avec PIP2 via Ax2 et est impliquée dans le recrutement de Par6 et d'aPKC à la membrane apicale pour initier la formation de lumière dans les kystes MDCK (Martin-Belmonte et al., 2007). En effet, la perte de fonction de Cdc42 induit la formation de kystes avec de multiples lumières, positives pour les marqueurs apicaux aPKC et ZO-1, suggérant que Cdc42 est requise pour positionner correctement la surface apicale (Jaffe et al., 2008). Enfin, afin de permettre aux cellules filles d'orienter leur surface apicale vers la membrane luminale, Cdc42 contrôle l'orientation du fuseau mitotique lors de la division cellulaire (Jaffe et al., 2008).

Le laboratoire de Mostov a analysé les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation d'un kyste dans les cellules épithéliales MDCK. Lorsque la lumière du kyste se forme, la podocalyxine se localise à la membrane apicale alors que Par3 et la sous-unité Sec8 du

complexe exocyste se localisent à la membrane sub-apicale au niveau des jonctions (Bryant et al., 2010). Il a été montré que l'inhibition de Rab8, Rab11a et Rab25 perturbe l'initiation et la formation d'une lumière centrale et induit la formation de multiples lumières ectopiques (Bryant et al., 2010). Par ailleurs, Rab11a se localise au niveau de la membrane luminale et recrute Rabin8 et Rab8a sur des vésicules sub-apicales et régule la morphogénèse de la lumière centrale. Le complexe exocyste interagit avec Rab8 et Rab11a et régule le transport de la podocalyxine et de Par3 au site luminal présomptif, suggérant que le complexe exocyste et le complexe Par3/aPKC sont cruciaux pour la formation de la lumière à travers l'adressage apical de vésicule Rab11a contenant la podocalyxine (Bryant et al., 2010). Bryant et collaborateurs ont démontré l'implication de Cdc42 et de sa GEF Tuba dans la luminogénèse : la perte de fonction de ces deux protéines perturbe la formation d'une lumière unique et accumule la podocalyxine dans les vésicules Rab11. Ces résultats démontrent que Cdc42, Par3 et aPKC sont régulées par Rab8a/Rab11a et l'exocyste, et sont requises pour le transport apical de la podocalyxine et nécessaires à la formation de la lumière (Bryant et al., 2010).

V.3 Formation de lumière dans un contexte physiologique et pathologique

Depuis ces dernières années, de nombreuses études ont été menées afin de mieux comprendre la formation de lumières dans un contexte physiologique. La GTPase Rab8, par exemple, est responsable de la localisation apicale de peptidases et des transporteurs dans le petit intestin de la souris (Sato et al., 2007). L'inhibition de Rab8 cause la dégradation de ces deux protéines dans le lysosome, induisant un défaut d'absorption intestinale et *in fine* la mort de l'animal (Sato et al., 2007). Les études de microscopie électronique montrent une atrophie des microvillosités, une accumulation de lysosomes élargies ainsi que la formation d'inclusions microvillositaires MID (Microvillus Inclusion Disease) (Randak et al., 1998) dans les entérocytes (Sato et al., 2007). Le MID est une maladie très rare chez l'homme causée par des mutations sur le gène MYO5B, codant pour une forme de la myosine (Muller et al., 2008). En microscopie électronique, ce MID se manifeste par des lumières ectopiques, une absence de microvillosités à la surface apicale des entérocytes, un défaut d'absorption intestinale, une diarrhée infantile aigue et une mortalité due à une déshydratation (Muller et al., 2008 ; Chen et al., 2010). Cette fonction majeure de la MYO5B est confirmée en culture de cellules Caco-2 sur filtre, où la perte de fonction de cette protéine induit également une perte de

microvillosités à la surface apicale ainsi que la formation d'inclusions microvillositaires (Ruemmele et al., 2010). De la même façon dans les hépatocytes, la myosine Vb et Rab11a contrôlent l'adressage de cargos apicaux et la formation du pôle apical appelé bile canaliculaire (Wakabayashi et al., 2005).

Une étude récente a montré l'implication des GlycoSphingoLipides (GSL) dans le maintien d'une lumière intestinale unique chez *C. elegans* (Zhang et al., 2011). L'altération des voies de synthèse de ces lipides induit une relocalisation basolatérale de nombreuses protéines normalement apicales. Ce phénotype est suivi par la formation de multiples lumières ectopiques sur la membrane latérale, facilement observable en microscopie électronique grâce à la présence de microvillosités (Zhang et al., 2011). Le transport des protéines apicales dont PAR-6 est affecté lorsque la formation de ce lipide est altérée, alors que la protéine basolatérale LET-413 conserve sa localisation normale (Zhang et al., 2011). Dans ce même contexte, les protéines apicales dont OPT-2, ERM-1 ainsi que les protéines de jonctions telles qu'AJM-1 et HMP-1 sont recrutées au niveau de ces lumières ectopiques. Ces données suggèrent que l'absence de ce lipide induit un défaut de tri des protéines normalement apicales à la membrane basolatérale, spécifiant localement une identité apicale à la membrane latérale, conduisant à la formation d'une lumière intestinale ectopique (Zhang et al., 2011).

Nos connaissances actuelles indiquent l'importance de contrôler l'établissement et le maintien de la polarité épithéliale par une régulation très fine des aspects majeurs qui gouvernent ce processus. Récemment de nombreuses études dont la nôtre, viennent analyser un aspect physiologique de cette régulation dans des organismes modèles, confirmant et enrichissant les données obtenues en cellules. Le trafic membranaire et plus particulièrement le trafic polarisé apico-basal est un aspect essentiel qui régule la polarité épithéliale. Au cours de notre étude, nous avons donc analysé ce processus mais également d'autres événements essentiels tels que l'intégrité des jonctions cellulaires.

VI. Modèle de travail : le nématode *Caenorhabditis elegans*

Dans cette dernière partie de l'introduction, je présenterai brièvement notre modèle d'étude *C. elegans*, son cycle de vie, une présentation générale des tissus épithéliaux de l'intestin et de l'épiderme.

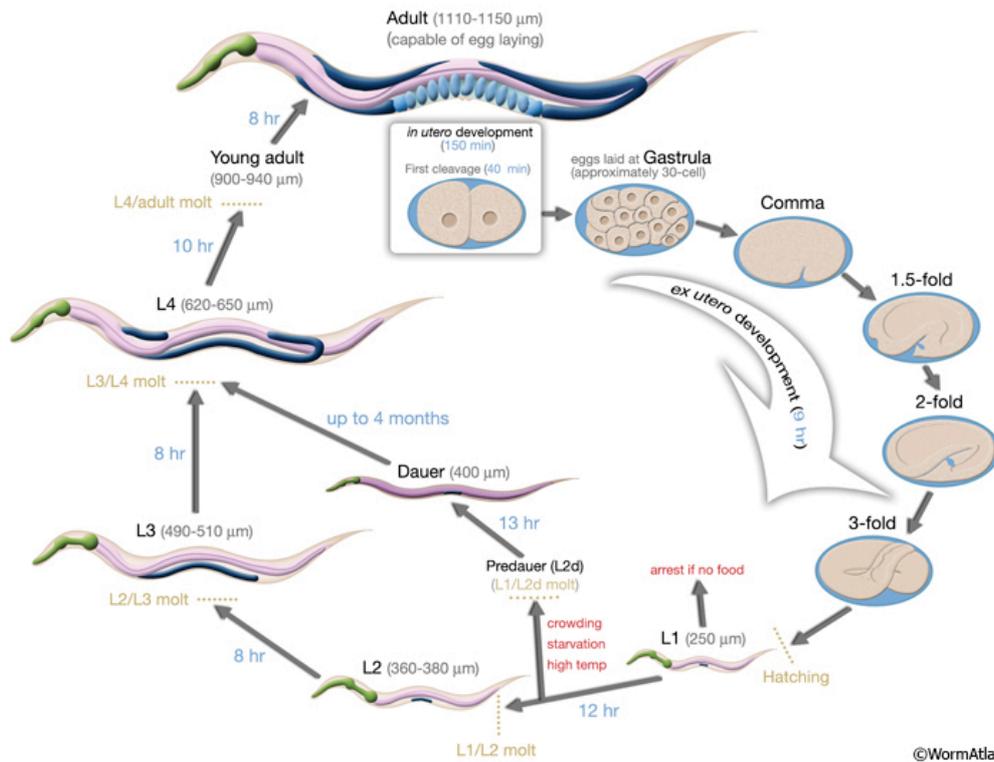


Figure 28 : Cycle de développement de *C. elegans*

Il faut environ 3,5 jours à un embryon pondu pour se développer en ver adulte capable de pondre à son tour. Ce développement se subdivise en deux étapes : le développement embryonnaire et le développement larvaire. La phase embryonnaire se divise elle-même en deux temps, une phase intra-utérine et une phase *ex utero*. La première phase aboutit à la ponte d'un embryon au stade gastrula (masse de cellules) et le développement de l'embryon se poursuit par une morphogénèse et une étape d'élongation du ver dans sa coquille. L'embryon passe successivement le stade lima bean qui initie l'élongation, le stade comma, 1,5-fold, 2-fold, 3-fold, 4-fold et enfin l'embryon est apte à éclore. Les stades 1,5-2-3-4-fold correspondent au nombre de fois où le ver est replié dans sa coquille. Une fois éclos, la larve subit quatre mues successives passant ainsi du stade L1 au stade L4 pour finalement atteindre le stade adulte. Le ver adulte mesure environ 1mm de long (WormAtlas).

VI.1 Présentation générale du nématode *Caenorhabditis elegans*

C'est Sydney Brenner dans les années 70 qui introduisit ce modèle en laboratoire comme un organisme modèle génétique (Brenner, 1973). *C. elegans* est un petit ver d'1 mm de long, vivant dans le sol en se nourrissant en particulier de bactéries, son régime principal. Cet organisme est constitué de 959 cellules somatiques chez l'adulte dont le développement est stéréotypé et on connaît précisément le lignage cellulaire. Un intérêt majeur de ce modèle vient du fait qu'il produit une quantité très importante d'embryons. On considère que chaque adulte pond 200 à 300 embryons en trois jours. De plus, ce nématode possède un cycle de développement court de 3,5 jours dans des conditions optimales à 20°C et en condition de nutrition correcte. C'est un atout certain pour étudier les phénotypes issus des manipulations génétiques de perte de fonction ainsi que la réalisation de souches transgéniques.

Enfin, *C. elegans* possède deux sexes : les hermaphrodites auto-féconds forment la grande majorité de la population et possèdent une carte génétique XX alors que les mâles sont XO et constituent 0,1% de la population spontanée. Cependant, ce nombre peut être amené à 50% lors d'un croisement classique mâle-hermaphrodite. L'autofécondation permet à une souche homozygote de maintenir des descendants génétiquement identiques alors que la reproduction sexuée avec un mâle est essentielle pour isoler des souches mutantes ou éliminer des mutations (outcross). Les mâles adultes possèdent 1031 cellules somatiques et sont reconnaissables des hermaphrodites grâce à l'extrémité caudale formant une queue arrondie qui leur sert d'appareil reproducteur. Les phénotypes morphologiques tissulaires ou cellulaires peuvent être observés directement en microscopie photonique en lumière blanche polarisée appelé DIC (Differential Interference Contrast microscopy) grâce à la transparence de cet organisme.

VI.2 Le cycle de développement du ver

Le cycle de développement de *C. elegans* comprend un stade embryonnaire, quatre stades larvaires (L1 à L4) et un stade adulte. A chaque transition larvaire correspond une mue, au cours de laquelle une nouvelle cuticule est synthétisée *de novo* s'accompagnant d'un arrêt de pompage pharyngal. Il faut environ trois jours et demi à 20°C pour passer de l'embryon pondue au stade adulte. On peut diviser ce cycle en deux grandes étapes, le stade embryonnaire et les stades larvaires (Figure 28).

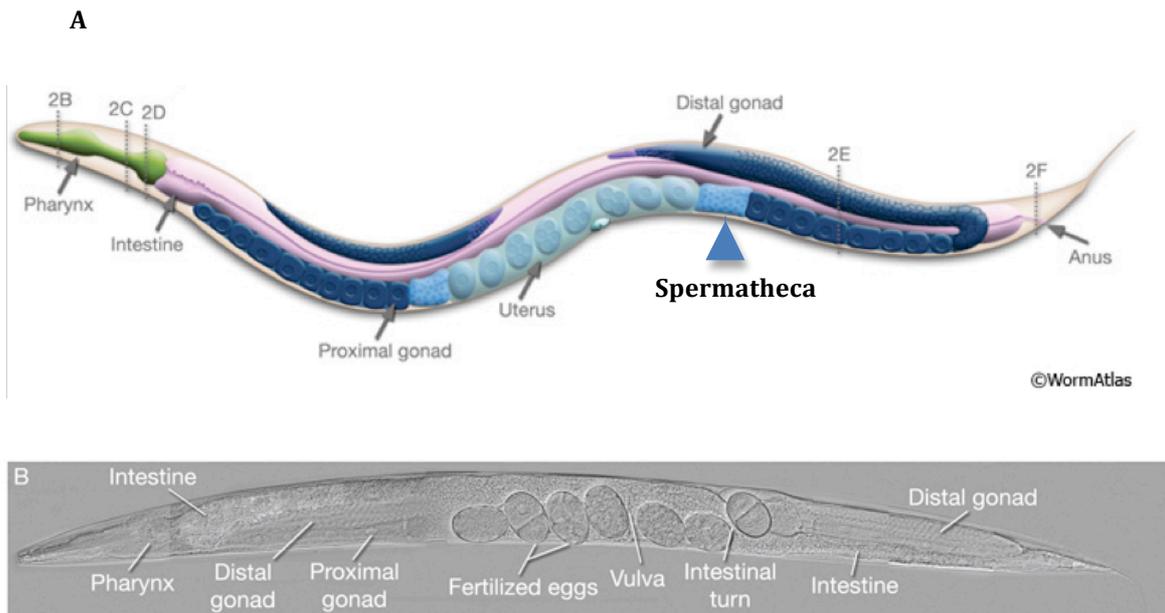


Figure 29 : Le système reproducteur auto-fécond de l'hermaphrodite

A) Représentation schématique d'un ver adulte. Le système reproducteur de *C. elegans* est formé par deux bras en forme de U latéralement opposés et symétriques. Le bras distal correspond à la gonade syncytiale où on observe de nombreux noyaux non encore cellularisés. Au fur et à mesure que l'on se rapproche de la gonade proximale, les ovocytes se forment et passent à travers la spermathèque contenant le sperme pour l'auto-fécondation. Après 150 minutes de développement post-fécondation *in utero*, l'embryon quitte l'utérus par la vulve. **B)** Image en DIC d'un ver adulte. On distingue facilement la gonade distale et proximale, la première division cellulaire après fécondation (embryon stade deux cellules), la vulve ainsi que l'intestin (WormAtlas).

VI.2.1 Le développement embryonnaire

Cette étape peut être subdivisée en deux processus : une prolifération cellulaire (environ 6H après fécondation à 22°C) puis une morphogénèse. Les premières 2H30 de développement se déroulent dans l'utérus de la mère avant que cet embryon soit pondu au cours de la gastrulation (Figure 28). La fermeture ventrale est effective à environ 5H. A la fin de cette période de prolifération, les cellules sont organisées en plusieurs feuillets : l'ectoderme qui donnera l'épiderme et les neurones, le mésoderme qui génère le pharynx et les muscles et enfin l'endoderme qui est à l'origine de la lignée germinale et de l'intestin. La morphogénèse commence au stade "lima bean" où l'embryon initie le processus d'élongation et le ver s'allonge dans sa coquille. Au stade "deux fold", les mouvements très coordonnés apparaissent, et à 13H la pompe pharyngale devient active et ensuite l'embryon éclot (Figure 28). À ce stade, la forme de l'animal est établie et les stades larvaires permettent à l'animal de s'allonger.

VI.2.2 Le développement larvaire

C'est au cours du stade larvaire L1 que le système neuronal se met majoritairement en place. Pendant le développement embryonnaire, deux paires de cellules particulières, appelées coelomocytes forment des cellules "charognards" spécialisées dans l'endocytose de fluide à partir du pseudocoelome. Une paire se localise ventralement au niveau du pharynx et une autre au niveau de la vulve.

La gonadogenèse débute 7H près l'éclosion et la gonade se développe sous forme de deux bras opposés. Au cours du stade L3 et le début du stade L4, la spermathèque et l'utérus se forment et les deux bras de la gonade continuent à migrer de façon opposée (Figure 29). La transition L3/L4 voit l'apparition de la méiose dans la lignée germinale dans le bras proximal de la gonade, différenciant ainsi ces cellules en sperme. A la transition L4/adulte, la production du sperme est stoppée et dans le reste du bras de la gonade, les cellules entrent en méiose afin de produire les ovocytes.

Au stade adulte, la spermathèque, l'utérus, les muscles et les neurones expulseurs d'embryons sont opérationnels et le ver est capable de pondre le premier œuf environ 45 heures post-éclosion. Le ver adulte produit des ovocytes durant environ 3 jours puis cette période fertile s'interrompt et l'hermaphrodite peut ensuite survivre 2 à 3 semaines sans production d'embryons. Au cours de sa vie adulte, l'hermaphrodite peut pondre jusqu'à 300 embryons

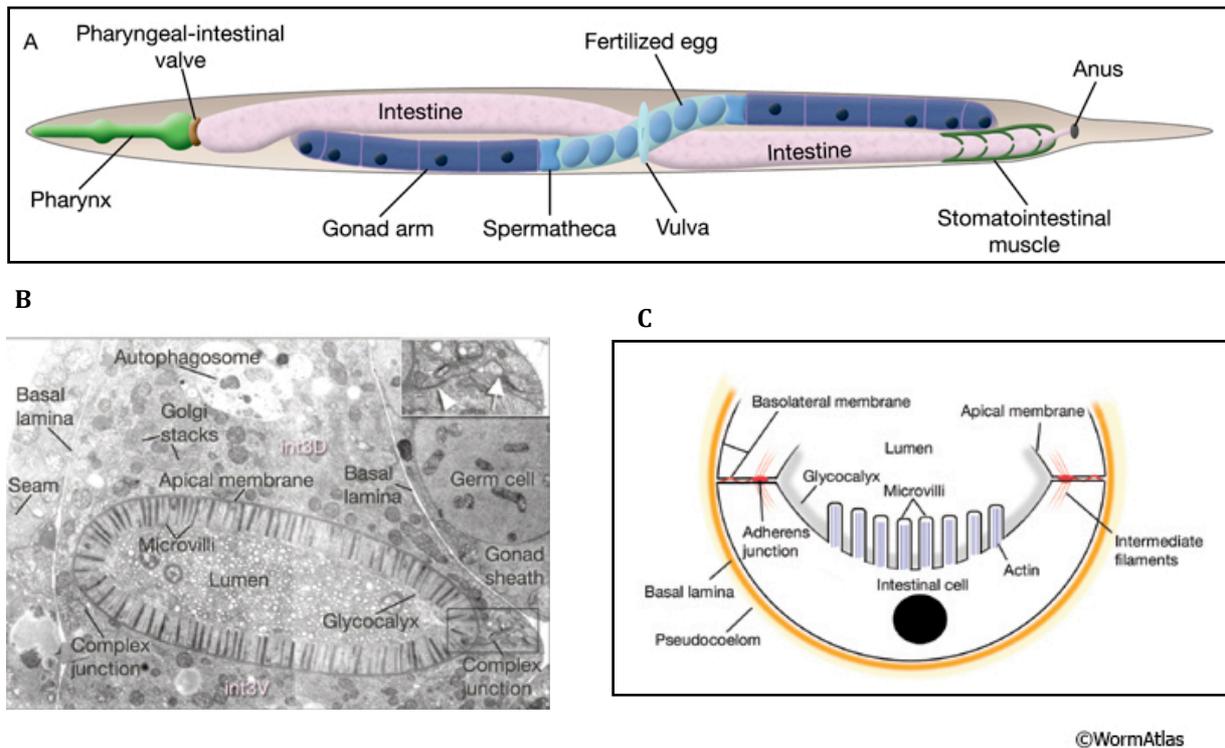


Figure 30 : Le tissu épithélial de l'intestin

A) Le tissu intestinal est formé par 20 cellules épithéliales qui se positionnent de façon symétrique bilatérale formant un long tube prolongeant le pharynx et se terminant par le rectum et l'anus. B) La membrane apicale de ce tissu forme la lumière intestinale centrale qui présente de nombreuses microvillosités visibles en microscopie électronique (ME). On note également sur cette image de ME la présence de structures denses aux électrons correspondant aux jonctions, assurant la cohésion entre les cellules intestinales et prévenant la diffusion entre la membrane apicale et basolatérale. C) La présentation schématique montre que chaque microvillosité est maintenue par les filaments d'actine qui reposent eux-mêmes sur le réseau de filaments intermédiaires, encerclant la lumière (WormAtlas).

grâce à une quantité limitée de sperme mais ce nombre peut être revu à la hausse en cas de croisement sexué avec un mâle.

VI.3 Description sommaire du tissu épithélial de l'intestin et de l'épiderme

VI.3.1 Le tissu intestinal

Chez *C. elegans*, l'intestin est un long organe assurant de nombreuses fonctions telles que la digestion des aliments, l'absorption de nutriments ainsi qu'une fonction de nutrition des cellules germinales en produisant la vitellogénine (YP170). Ce tissu est formé par 20 cellules épithéliales qui se positionnent de façon symétrique bilatérale formant un long tube et une lumière centrale (Figure 30A). Cette lumière intestinale correspond à la membrane apicale et est constituée de microvillosités, essentielles pour l'absorption intestinale. Ces microvillosités sont associées à un réseau de cytosquelette formé par les filaments intermédiaires (IFB-2) ainsi des protéines permettant cette association comme ERM-1. Le corps de chaque microvillosité est constitué de filaments d'actine qui se lient à ce réseau de filaments intermédiaires (Figure 30C). Au niveau de la membrane sub-apicale, s'établissent les jonctions apicales (CeAJ) visibles en microscopie électronique formant des structures denses aux électrons (Figure 30B). Cette jonction assure une fonction triple : une barrière physique de diffusion entre la membrane apicale et basolatérale, un rôle d'adhésion entre les cellules et une barrière contre la diffusion paracellulaire.

VI.3.2 Le tissu épidermal ou « l'hypoderme » chez *C. elegans*

L'hypoderme majeur peut être subdivisé en trois types cellulaires : l'hypoderme ventral, l'hypoderme dorsal et l'hypoderme latéral. Les cellules hypodermes sont responsables de l'architecture globale du ver et sécrètent la cuticule.

Les cellules épithéliales de l'hypoderme sont toutes jointives grâce aux jonctions (CeAJ) qui se localisent sur la membrane sub-apicale, formant une ceinture jonctionnelle qui encercle les cellules épithéliales. Cette jonction, outre son rôle dans la cohésion et dans l'étanchéité paracellulaire, permet de séparer la membrane apicale de la membrane basolatérale.

Outre l'épithélium de l'intestin et de l'hypoderme, il existe d'autres tissus épithéliaux tels que le pharynx, la spermathèque, l'utérus, la vulve, le rectum ainsi que le système excrétoire (Figure 29 et 30).

OBJECTIFS PRINCIPAUX DE LA THÈSE

Au cours de mes trois années de thèse, mon objectif a consisté à mieux comprendre le rôle du complexe adaptateur pour la clathrine AP-1 dans le développement embryonnaire du nématode *C. elegans*. La perte de fonction du complexe AP-1 induit une létalité embryonnaire tant chez la drosophile, la souris que *C. elegans* (Benhra et al., 2011 ; Meyer et al., 2000 ; Shim et al., 2000).

Bien que de nombreuses études aient été menées dans les cellules en culture pour identifier le rôle cellulaire du complexe AP-1, très peu de données sont disponibles quant à sa fonction dans le cadre du développement d'un organisme vivant. Chez *C. elegans*, la perte de fonction d'AP-1 induit une létalité embryonnaire au cours du stade d'élongation 3-fold. Nous avons donc tenté de comprendre les processus essentiels contrôlés par AP-1 au cours de ce stade causant la mort de l'animal.

Dans les cellules épithéliales en culture, le complexe AP-1 contrôle le trafic apico-basal puisqu'il est impliqué dans le transport basolatéral de nombreux cargos (Folsch et al., 1999). Par ailleurs, une perte de polarité épithéliale générale apparaît lorsqu'on inhibe AP-1. L'organisation de ces cellules en monocouche régulière est altérée, les cellules s'organisent alors en multicouches, phénotype caractéristique d'une désorganisation de l'épithélium (Folsch et al., 1999). Un objectif majeur de mon travail consiste donc à mieux comprendre l'implication de ce complexe adaptateur pour la clathrine dans la régulation du trafic apico-basal et plus généralement dans la mise en place et dans le maintien de la polarité épithéliale.

Notre étude tente de caractériser de nouvelles fonctions pour AP-1 et de voir par la suite si ces fonctions sont conservées dans les autres espèces.

L'intérêt de notre modèle vient de la puissance de l'outil génétique : il est très facile d'inhiber spécifiquement un gène chez *C. elegans* grâce à l'ARN interférence et aux mutants de délétion, permettant la caractérisation rapide de nouveaux gènes impliqués dans la polarité épithéliale. Le nématode possède différents tissus épithéliaux tels que l'épiderme et l'intestin qui représentent d'excellents supports pour analyser les différents aspects de la polarité épithéliale dans un organisme en développement.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Culture de *C. elegans*

La culture de *C. elegans* se fait comme décrit par Brenner (Brenner, 1974). La souche N2 Bristol est utilisée comme souche sauvage de référence et les différentes souches mutantes ou transgéniques ont cette souche pour origine. L'animal est cultivé à 20°C dans des boîtes contenant un milieu agar NGM (Nematode Growth Medium) contenant du bacto-agar, du bacto-peptone et du sel, complété en cholestérol. Pour les nourrir, on utilise une souche modifiée d'*E. coli* appelé OP50 que le ver aspire par pompage grâce à son pharynx. Lorsque la boîte arrive à épuisement de bactéries, on repique quelques vers sur une boîte fraîche pour maintenir la souche.

II. Inactivation de gènes

Il existe différents moyens d'inhiber spécifiquement un gène et de regarder l'impact sur le développement de l'animal et les phénotypes tissulaires et cellulaires associés. C'est ce qu'on appelle la « génétique inverse », qui commence par l'étude d'une séquence génique plutôt que d'un phénotype particulier. Dans cette partie, je détaillerai la perte de fonction d'un gène par ARN interférence (RNAi) soit par ingestion soit par injection et je finirai par l'obtention de mutants de délétion.

II.1 L'ARN interférence chez *C. elegans*

II.1.1 RNAi par injection

C'est en 1998 qu'Andy Fire et Craig Mello ont découvert que l'injection d'ARN double brin (ARNdb) dans un ver induit la dégradation spécifique de l'ARNm correspondant (Fire et al., 1998). Par la suite, cette méthode a été étendue à un processus d'ingestion (feeding) et de trempage-absorption (soaking).

Le RNAi par injection consiste à préparer de l'ARN double brin (ARNdb) correspondant au gène d'intérêt par une transcription *in vitro* (Kit Ambion mMessage-mMachine). La solution contenant le produit de la transcription (ARNdb) est ensuite injectée dans la gonade syncytiale, dans le pseudocoelome ou dans l'intestin d'un jeune ver adulte et après environ 24 à 48h d'incubation, on analyse les embryons pondus. On utilise les clones de la banque RNAi créés à partir du plasmide L4440 qui possède deux séquences T7 de part et d'autre du gène

cloné afin de permettre la transcription sens et antisens du gène d'intérêt et ainsi produire l'ARNdb.

II.1.2 RNAi par ingestion ou "feeding"

La disponibilité du génome complet de *C. elegans* a permis la réalisation d'une banque RNAi contenant environ 85% du génome de *C. elegans*, disponible pour l'ensemble de la communauté (Ahrinher Library, Source Bioscience, Nottingham, UK). Cette banque est constituée de bactéries *E. coli*/HTT115 contenant le plasmide L4440 dans lequel sont clonées des séquences d'ADN de *C. elegans*. Ce plasmide possède des séquences T7 flanquantes, permettant la transcription d'un gène en sens et en antisens (ARNdb). Cette banque RNAi représente un avantage majeur pour l'étude rapide de la fonction d'un gène.

On utilise un milieu NGM agar que l'on complémente à 25 µg/ml de carbenicillin et de 1 à 3 mM d'IPTG. Lorsque les boîtes sont sèches, on lesensemence avec les bactéries de la banque, contenant un clone ciblant un gène d'intérêt. Les boîtes sont ensuite incubées 48H afin de permettre l'induction par l'IPTG de l'ARN double brin.

Selon le stade au cours duquel on veut mettre en évidence le phénotype, on déposera les vers à un stade particulier. Ainsi, si on veut observer un phénotype embryonnaire, on déposera des larves L4 ou de jeunes adultes que l'on incube au moins 30h sur un premier puits RNAi avant de les transférer dans un nouveau puits. Les embryons du premier puits ne seront pas analysés car ils ne sont pas tous affectés par le RNAi. Cependant, dans le deuxième puits, après 30H d'incubation, la majorité des embryons a subi le RNAi. Si on veut observer un phénotype dans une larve ou un ver adulte pour un gène requis pour le développement embryonnaire, on mettra alors des embryons dans le puits RNAi, qui vont ensuite éclore, se nourrir des bactéries "RNAi" et se développer jusqu'à l'apparition d'un phénotype.

II.1.3 Inhibition du complexe AP-1 par RNAi

Il existe deux complexes AP-1 chez *C. elegans* selon la sous-unité μ incorporée dans ce complexe. Afin d'inhiber les deux complexes AP-1, nous avons ciblé les sous-unités uniques d'AP-1, telles que σ (*aps-1*) et γ (*apg-1*). Nous avons établi que la perte de fonction des gènes *aps-1* et *apg-1* par RNAi par ingestion ou par injection donne un phénotype similaire : 90-100% de létalité embryonnaire au stade 2,5/3-fold, après 30h et 24h d'incubation respectivement.

Pour la microscopie électronique, les embryons contrôles et RNAi par injection ont été fixés après 9 et 11 heures de développement post-fécondation par une congélation à haute pression (EMPACT-2) suivie d'une cryo-substitution (AFS). Les embryons ainsi fixés sont au stade 3/4-fold. Cette cryofixation à haute pression donne une meilleure conservation des tissus par rapport à une fixation chimique classique.

II.2 Mutants de délétion

II.2.1 Principe

Outre la possibilité d'éteindre spécifiquement un gène par RNAi, il est possible d'obtenir chez *C. elegans* des mutants de délétion par mutagenèse grâce au système TMP-UV. Ce système consiste à créer des cassures de l'ADN aléatoirement non ciblées et ensuite un crible permettra d'identifier le gène altéré avec une cartographie bien précise du locus affecté. Ce travail est élaboré par le *C. elegans* gene knockout consortium qui met ces mutants à la disposition du CGC (*C. elegans* Genetic Center) ce qui permet la disponibilité de nombreuses souches de vers mutantes utilisables par la communauté.

II.2.2 Les mutants *aps-1* et *apg-1*

Des mutants de délétion pour *aps-1* et *apg-1* sont disponibles au CGC et nous avons caractérisé leurs phénotypes. Le mutant *aps-1*, possédant l'allèle *tm935*, correspond à une délétion de 305 paires de bases d'une grande partie de l'intron 2 et du début de l'exon 3. Quant au mutant *apg-1(tm1249)*, il correspond à une délétion de 440 paires de bases des exons 2 et 3, de l'intron 2 et une partie de l'intron 3. Les mutants ont été « out-crossés » 6 fois pour *aps-1* et 4 fois pour *apg-1*, par croisement successifs avec des mâles sauvages N2. Les homozygotes pour les délétions sont létaux, il faut donc les maintenir sous forme hétérozygote grâce à une identification par PCR. Pour cela, j'ai dessiné des oligonucléotides de part et d'autre de la région délétée et par PCR génomique sur un ver adulte, je peux distinguer les individus sauvages homozygotes (un seul amplicon), des individus hétérozygotes portant la délétion (deux amplicons).

III. Immuno-marquage des embryons

Les embryons sont récupérés des puits par lavage avec la solution M9 (KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl et de MgSO₄) dans un eppendorf. Ensuite, le tube est centrifugé à 2000 rpm et le

surageant est éliminé. On dépose environ 10µl de la solution du culot contenant les embryons sur une lame L-polylysinée. On laisse les embryons décanter puis on enlève l'excès de liquide et on met une lamelle. On plonge ensuite la lame dans l'azote liquide (freeze). Lorsqu'on retire la lame on éjecte la lamelle aussitôt afin de « perforer » (crack) la coquille de l'embryon et permettre la fixation et le marquage des tissus. On effectue une fixation de 20 minutes dans le méthanol à -20°C, un lavage de 10 minutes dans le PBS puis on bloque 20 minutes dans du PBS-Tween (0,2%) et BSA (1%). On incube avec l'anticorps primaire pendant 2 heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. La lame est rincée 2x10 minutes dans le PBS-Tween et on procède à l'incubation de l'anticorps secondaire pendant une heure à 37°C avant de procéder au montage entre lame et lamelle avec du Mowiol. Les anticorps secondaires utilisés sont les Alexa Fluor-488 et Alexa Fluor-532 d'Invitrogen.

IV. Transgénèse

IV.1 Obtention du transgène par PCR fusion

Nous avons utilisé deux méthodes pour créer des séquences d'intérêt. La première méthode consiste à effectuer une PCR fusion entre le gène et le rapporteur GFP ou mCherry (Hobert O., 2002). Nous avons utilisé cette méthode pour obtenir une souche de vers *APM-1::GFP*. Pour cela, nous avons amplifié génomiquement le gène *apm-1* ainsi que sa région promotrice (amplicon #1) et en parallèle nous avons amplifié la GFP et la région 3'UTR d'*unc-54* (amplicon #2) à partir de la matrice pPD95.75. Lorsque nous avons dessiné les oligonucléotides, nous avons pris le soin d'intégrer dans l'amplicon #1 une séquence qui chevauche l'amplicon #2. Ainsi, lorsqu'on mélange les deux amplicons, ils s'hybrident et on forme ainsi une séquence fusion qu'on amplifie par une dernière PCR avec des oligonucléotides sens de l'amplicon #1 et antisens de l'amplicon #2. Il est très important que ces deux séquences soient dans le cadre de lecture. La séquence du produit final permet de sélectionner un amplicon ne comportant pas de mutations.

IV.2 Obtention du transgène par construction de plasmide

La seconde méthode consiste à cloner le transgène dans un plasmide : c'est ce que nous avons fait pour le transgène *gfp::cdc-42* sous le contrôle du promoteur intestinal. Pour réaliser cela, nous avons utilisé le système Gateway d'Invitrogen. Nous avons généré des vecteurs donneurs dans lesquels chaque élément du transgène final va être cloné par recombinaison

homologue. Ainsi, dans le vecteur donneur P4-P1R, on clone l'élément 5'UTR (ici le promoteur intestinal du gène *vha-6* fusionné à une GFP) ; dans le vecteur donneur P221 on clone le gène (ici le gène *cdc-42*) et dans le vecteur p2RP3 on clone l'élément 3'UTR (ici la séquence 3'UTR du gène *unc-54*). Ces trois vecteurs sont ensuite incubés ensemble à 25°C en présence d'un vecteur de destination pDEST R4-R3 Vector II et par recombinaison homologue on obtient alors la séquence suivante clonée dans le vecteur de destination : pDEST-p*vha-6*::*gfp*::*cdc-42*::*unc-54*-3'UTR-pDEST.

IV.3 Injection du transgène dans l'organisme

Lorsque le transgène est obtenu et validé par séquençage, on l'injecte sous forme de PCR fusion brute ou bien cloné dans un vecteur dans la gonade syncytiale d'un ver au stade L4 ou jeune adulte. Le produit de PCR fusion ne nécessite pas de purification particulière et on l'injecte à une concentration comprise entre 20 et 50 ng/μl. Quant au vecteur contenant le transgène, la concentration doit être de l'ordre de 10 à 15 ng/μl. Dans les deux cas, on co-injecte le marqueur phénotypique *rol-6(su1006)* contenu dans le plasmide pRF4 afin d'identifier et de maintenir les vers transgéniques. Cette mutation *de rol-6* induit un défaut de locomotion : les vers se déplacent en dessinant des cercles (Mello et al., 1991).

V. Analyse des phénotypes

Pour l'observation des phénotypes, les embryons, les larves ou les adultes sont déposés sur une lame contenant un tapis d'agar à 2% avec du milieu M9. Les vers sont ensuite montés entre lame et lamelle et on procède à l'observation au microscope confocal en lumière blanche polarisée (DIC) ou grâce aux lasers et filtres GFP pour analyser des souches transgéniques GFP, dsRED, mCHERRY... Lorsqu'on observe des larves ou des adultes, il est nécessaire de les immobiliser grâce à des drogues telles que la tricaine tétramizole ou encore l'azide de sodium qui est beaucoup plus drastique. Ces drogues sont inefficaces sur les embryons car elles ne peuvent pas pénétrer la coquille. Pour remédier à cela et afin de les immobiliser pendant l'observation microscopique, on scelle la lame avec la vaseline ou bien on étouffe les embryons par un excès de bactéries lors du montage lame-lamelle pour les asphyxier.

RÉSULTATS

I. Le complexe adaptateur pour la clathrine AP-1 est requis pour le maintien de la polarité apico-basale chez *C. elegans*

I.1 Objectifs de l'article

Un aspect fondamental de la polarité épithéliale consiste à contrôler le transport polarisé des protéines et des lipides à la membrane apicale et à la membrane basolatérale. Ce processus de transport dit « apico-basal » est essentiel afin d'établir et de maintenir l'identité polarisée des membranes.

Dans les cellules de mammifère en culture, de nombreuses études ont été réalisées pour comprendre la fonction de la clathrine ainsi que du complexe adaptateur AP-1B, spécifique du tissu épithélial. Ces études ont permis de démontrer l'implication d'AP-1B et de la clathrine dans le transport basolatéral. Cependant, ni la clathrine, ni AP-1B et d'une façon générale aucun complexe adaptateur pour la clathrine ne semble requis pour le transport apical ou pour le maintien de la polarité épithéliale (Deborde et al., 2008 ; Folsch et al., 1999).

Dans notre étude, nous avons décidé de mieux comprendre le rôle du complexe AP-1 dans un contexte *in vivo* au cours de l'embryogenèse du nématode *C. elegans*. Nous nous sommes focalisés sur l'épithélium tubulaire de l'intestin en analysant la mise en place et le maintien de la polarité et plus particulièrement le trafic polarisé apico-basal.

I.2 Résultats majeurs

AP-1 contrôle le tri basolatéral et apical. Nous avons démontré que le complexe AP-1 contrôle le tri basolatéral dans les cellules intestinales du nématode, ce qui confirme les données obtenues chez les mammifères. En effet, l'inhibition d'AP-1, en ciblant la sous-unité σ , ce qui affecte les deux complexes AP-1, induit une localisation homogène de SLCF-1 normalement basolatérale, au cortex apical et basolatéral. De façon intéressante, notre étude révèle l'implication inattendue du complexe AP-1 dans le tri de cargos apicaux. Ainsi, PEPT-1, une protéine transmembranaire strictement à la membrane apicale, se délocalise à la membrane apicale et basolatérale en l'absence d'AP-1. Dans les deux cas, la localisation asymétrique de la protéine apicale et de la protéine basolatérale est perdue alors que les jonctions cellulaires sont intactes. La déplétion d'autres gènes essentiels du trafic intracellulaire tels que *rab-5*, *dyn-1*, *rab-10*, *rab-11* perturbe le transport des protéines SLCF-

1 et PEPT-1 qui peuvent s'accumuler dans le cytosol sur des vésicules. Cependant, la localisation asymétrique de ces deux protéines n'est pas affectée, suggérant que seul AP-1 est impliqué dans un processus de « tri » polarisé.

C'est le complexe AP-1- μ -APM-1 qui contrôle le tri apico-basal. Chez *C. elegans*, il existe deux complexes AP-1 en fonction de la sous-unité μ qui peut être codée par *apm-1* ou *unc-101*. Nos résultats démontrent que c'est la sous-unité μ -APM-1 qui contrôle aussi bien le tri apical que le tri basolatéral. Il est très important de faire la différence entre « tri » et « transport ». Lorsqu'on a un défaut de tri, comme c'est le cas pour AP-1, la protéine n'est pas spécifiquement adressée à une membrane donnée mais se localise de façon aléatoire sur toute la membrane de façon homogène. S'il s'agit d'un problème de transport, la protéine n'est plus ou peu capable d'être acheminée à la membrane cible et s'accumule alors à l'intérieur de la cellule.

AP-1 contrôle le tri apical de PAR-6 et de CDC-42. Nous avons également démontré qu'AP-1 est impliqué dans le tri apical du déterminant de polarité PAR-6 et de la GTPase CDC-42. Par ailleurs, la localisation de PAR-6 à la membrane apicale dépend de son interaction avec CDC-42.

AP-1 prévient la formation de lumières multiples ectopiques. La perte de fonction d'AP-1 induit la formation de lumières ectopiques à la membrane latérale des cellules intestinales. Ces lumières sont facilement observables en microscopie électronique (ME) grâce aux microvillosités caractéristiques mais aussi en microscopie confocale grâce aux marqueurs fluorescents. En effet, latéralement à la lumière principale, on observe des « bulles » positives pour les marqueurs apicaux PEPT-1, PAR-6 ou encore PKC-3. En ME, on peut noter la présence de jonctions cellulaires de part et d'autre de la lumière ectopique, ce qui est par ailleurs confirmé au confocal grâce à la protéine de jonction AJM-1 qui encercle la lumière ectopique.

En définitif, notre analyse démontre l'implication d'AP-1 dans le tri basolatéral et apical. Mais cette dernière fonction est la plus importante car essentielle pour correctement localiser les protéines de polarité telles que PAR-6 et CDC-42. AP-1 contrôle donc le trafic apico-basal et d'une façon générale le maintien de la polarité épithéliale. Dans l'épithélium tubulaire intestinal, cette perte de la polarité épithéliale se manifeste par l'apparition de lumières ectopiques.

AP-1 is required for the maintenance of apico-basal polarity in the *C. elegans* intestine

Massiullah Shafaq-zadah^{1,2,3}, Lysiane Brocard^{1,2,3,†}, Florence Solari⁴ and Grégoire Michaux^{1,2,3}

¹ INSERM Avenir group, F-35043 Rennes, France

² CNRS, UMR6061, Institut de Génétique et Développement de Rennes, F-35043 Rennes, France

³ Université de Rennes 1, UEB, IFR140, Faculté de Médecine, F-35043 Rennes, France

⁴ CNRS UMR5534, Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires, Université Claude Bernard Lyon 1 F-69622 Villeurbanne, France

† present address: IBVM, INRA, F-33550 Villenave d'Ornon, France

Corresponding author: Grégoire Michaux

Tel: (00 33) -2 2323 4775; *email:* gmichaux@univ-rennes1.fr

Running title: AP-1 Function in CDC-42 and PAR-6 apical Localisation

Keywords: Epithelial polarity, membrane traffic, apical sorting, CDC-42, PAR-6, AP-1, *C.*

elegans

SUMMARY

Epithelial tubes perform functions which are essential for the survival of multicellular organisms. Understanding how their polarised features are maintained is therefore crucial. By analysing the function of the clathrin adaptor AP-1 in the *C. elegans* intestine we found that AP-1 is required for epithelial polarity maintenance. Depletion of AP-1 subunits does not affect epithelial polarity establishment or the formation of the intestinal lumen. However the loss of AP-1 affects the polarised distribution of both apical and basolateral transmembrane proteins. Moreover it triggers de novo formation of ectopic apical lumens between intestinal cells along the lateral membranes later during embryogenesis. We also found that AP-1 is specifically required for the apical localisation of the small GTPase CDC-42 and the polarity determinant PAR-6. Our results demonstrate that AP-1 controls an apical trafficking pathway required for the maintenance of epithelial polarity *in vivo* in a tubular epithelium.

INTRODUCTION

Cell polarity establishment is a complex but well studied process in various models including neurons, migrating cells following wound healing or the *C. elegans* one-cell embryo. In epithelial cells polarity is established through cell-cell and cell-matrix interactions (Yeaman et al., 1999) followed by the formation of three essential modules. Two of these modules, the Crumbs/PALS1/Patj module and the PAR-3/PAR-6/PKC-3 (α PKC) module are localised at the apical pole while the Dlg/Scribble/Lgl module is at the basolateral pole (St Johnston and Ahringer, 2010). Targeting these modules to their precise localisation is essential for proper polarity establishment. It has been shown recently that membrane traffic is essential for polarity establishment during apical lumen formation in MDCK cysts: a transcytosis route based on Rab11a, Rabin8 and Rab8a is required for Cdc42 and apical PAR proteins accumulation at the presumptive apical pole during lumen formation, providing a mechanism for polarity establishment in a tubular epithelium *in vitro* (Bryant et al., 2010). However several questions remains to be solved. For instance the sorting mechanism required after basolateral endocytosis to separate the *bona fide* basolateral proteins from the future apical proteins was not

investigated. Furthermore the role of this pathway *in vivo* or in polarity maintenance has not been established.

The polarity maintenance step depends mainly on differential trafficking of essential proteins to the apical or basolateral poles. While apical PAR proteins play a crucial role in controlling endocytosis (Balklava et al., 2007) membrane traffic has also been shown to be implicated in the control of PAR localisation maintenance (Lu and Bilder, 2005; Nakayama et al., 2009). In *Drosophila* endocytic proteins including *shibire* (dynamin), *Rab5* and *avalanche* (syntaxin 7) which define early steps of endocytosis, and *tsg101* and *vps25* which are implicated in sorting into multivesicular bodies (MVBs) (Shivas et al., 2010; Vaccari and Bilder, 2009) have been defined as tumor suppressors and are essential for both epithelial polarity and signaling. However the entanglement of polarity loss and signaling defects induced by the loss of function of these genes prevents a detailed analysis of the direct role of membrane traffic on epithelial polarity. Moreover the results reported so far are consistent with several hypotheses including transcytosis, lysosomal degradation or removal of mistargeted proteins (Shivas et al., 2010). In the *C. elegans* one-cell embryo it has been shown that dynamin could be implicated in polarity maintenance by contributing to PAR-6 anterior localisation (Nakayama et al., 2009) but the rest of the pathway has not been identified. Finally it was shown recently that glycosphingolipids are essential for the maintenance of a single lumen in the *C. elegans* intestine (Zhang et al.): knock-downs of genes controlling glycosphingolipid biosynthesis induce the formation of ectopic apical lumens and mistargeting of apical proteins to the basolateral membrane. Glycosphingolipids are enriched in lipid rafts (Simons and Ikonen, 1997) and these observations suggest that GSL and lipid rafts are required for apical sorting *in vivo*. Ectopic lumens also form in microvillus inclusion disease (MVID) patients carrying a mutated version of Myo5B (Muller et al., 2008; Ruemmele et al.) and Myo5B is implicated in apical transport (Lapierre et al., 2001). It is therefore essential to better define the apical trafficking routes which control polarity maintenance.

In mammalian epithelial cultured cells several studies have investigated in details the function of clathrin and its epithelial specific adaptor complex AP-1B. They showed that they are implicated in basolateral sorting while neither AP-1B nor clathrin seem to be required for the sorting of apical proteins and overall epithelial polarity maintenance (Deborde et al., 2008; Folsch et al., 1999; Gan et al., 2002) and no clathrin adaptor has been involved in apical sorting (Weisz and Rodriguez-Boulan, 2009). In *C. elegans* the loss of AP-1 induces an embryonic arrest at a late stage during morphogenesis (Shim et al., 2000) (FigS1A-C) consistent with a role in epithelial polarity maintenance (Chisholm and Hardin, 2005). The *C. elegans* AP-1 adaptor complex is composed of four subunits: β /*apb-1* (shared with AP-2 and therefore not examined in

this study), γ /*apg-1*, σ /*aps-1* and the μ subunit encoded by two genes, *unc-101* or *apm-1* (FigS1A). RNAi knockdown of *aps-1* or *apg-1* subunits, as well as the depletion of both μ (*apm-1* and *unc-101*) subunits, induces an identical 3-fold stage embryonic arrest during elongation (Shim et al., 2000); *apm-1(RNAi)* alone induces a larval arrest at the L2 stage (see also Material and Methods; FigS1B-C). We decided to assess the function of AP-1 in the *C. elegans* intestine. Our results demonstrate a strict requirement for AP-1 in apical sorting and apico-basal polarity maintenance *in vivo* in a model of a tubular epithelium.

MATERIALS AND METHODS

Genetics

C. elegans strains were maintained and crossed as described (Brenner, 1974). The strains used in this study are shown in Supplementary Table 1.

Plasmid construction

The *aps-1::gfp* construct was generated by synthesising the promoter and the genomic coding region of *aps-1* upstream of the stop codon (1073bp) and adding *Bam*HI and *Age*I sites. This fragment was then cloned in pPD95.75 using *Bam*HI and *Age*I sites to fuse *aps-1* to *gfp*. The functionality of this construct was tested by injection in the [*aps-1(tm935)/+*] FL82 strain and by establishing stable lines (strain FL35) expressing *aps-1::gfp*. While the *aps-1(tm935)/+* strain displays about 25% L1 lethality, the FL35 strain had *aps-1(tm935)* homozygous larvae surviving up to the L4 stage. Briefly, PCR were performed on L3-L4 larvae; no homozygous *aps-1(tm935)* can be detected at that stage in the FL82 strain while 31% (5/16) homozygous *aps-1(tm935)* were detected among L3/L4 larvae from the FL35 strain. It therefore partially rescued the lethal phenotype transforming the L1 larval lethality in L3/L4 lethality.

The intestinal *gfp::cdc-42* construct was generated using the Multisite Gateway system (Invitrogen). Briefly this construct was generated by making three donor vectors containing the *vha-6* promoter, the *gfp* sequence fused in frame to *cdc-42* genomic sequence (a fusion PCR was used to generate this fragment), and the *unc-54* 3'UTR. The three vectors were then recombined to give a unique plasmid which was sequenced. Stable transgenic lines were obtained by coinjecting this plasmid and the pRF4 plasmid carrying the *rol-6(su1006)* marker in WT N2 worms (Mello et al., 1991) to generate the FL70 strain. GFP::CDC-42 was only visible from the 3-

fold stage preventing observations of its localisation earlier during elongation. The sequence of the primers used to generate the three donor vectors are shown below:

vha-6 promotor sens

(attB4)GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCCGCATGTACCTTTATAGGTGCGC

vha-6 promotor rev (attB1r)GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGCTAGGTTTTAGTCGCCCTGAA

Primer A AGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACT

Primer A' sens

(attB4)GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCC

Primer B CTCCAACGACGACGCACTTGATCGTCTGCATTTTGTATAGTTCATCCATGCC

Primer C ATGCAGACGATCAAGTGCGTCGTCGTTGGAG

Primer D GGAGACAAGGAAGACGTTCC

Primer D' rev

(attB1r)GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAGAGAATATTGCACTTCTTCTTCTTCTCC

3'UTR *unc-54* sens

(attB4)GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGACCATTTCGTAGAATTCCAAGTGGAGCG

3'UTR *unc-54* rev

(attB1r)GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCAAGGGCCCGTACGGCCGACTAGTAGG

RNAi

We found that RNAi against *aps-1* or *apg-1* by injection or feeding induced an identical 2.5/3-fold arrest phenotype for 90-100% embryos. We therefore decided to use the feeding method for convenience and chose to work mainly with *aps-1(RNAi)* which gives >95% elongation arrest while *apg-1(RNAi)* is slightly less penetrant (about 90% with the remaining 10% arresting as young larvae). Essential observations were confirmed in *apg-1(RNAi)* embryos including defects in PAR-6 localisation and by electron microscopy for the formation of ectopic lumens. RNAi against *apm-1* induced a larval arrest at L2 stage. RNAi was performed as described by injection of double-stranded RNA or feeding using the Ahringer-Source BioScience library (Fire et al., 1998; Kamath and Ahringer, 2003).

To test RNAi efficiency we targeted *aps-1* or *apg-1* in the FL35 strain expressing an APS-1::GFP fusion protein. We observed a complete disappearance of the APS-1::GFP signal following *aps-1(RNAi)* and a diffuse localisation following *apg-1(RNAi)* (FigS1D). Deletion alleles *aps-1(tm935)*, *apg-1(tm1249)* and *apm-1(ok2578)* induced an L1/L2 larval lethality (FigS1E) presumably due to maternal contribution and we decided to analyse the embryonic arrest induced by the RNAi depletion of *aps-1* and *apg-1*.

To observe embryonic phenotypes, RNAi was performed on L4 larvae or young adults. Animals were fed for 48h before transferring them to a fresh RNAi plate. All phenotypes were recorded

15-18h later at a time where embryos were still alive as assessed by Nomarski microscopy. For electron microscopy 9-11h old embryos were used to detect primary defects. To examine larval phenotypes young L1 larvae were transferred on RNAi plates and observed 48h later. The penetrance of all phenotypes described following RNAi is well above 80% unless otherwise stated.

Immunostaining

We used the monoclonal anti-AJM-1 MH27 (1/50) (Francis and Waterston, 1991) and anti-PAR-3 P4A1 (1/50) (Nance et al., 2003) antibodies from DSHB (University of Iowa, USA). Anti-PAR-6 (1/50) (Labbe et al., 2006) and anti-PKC-3 (1/1000) (Sugiyama et al., 2008) rabbit antibodies were generously given by Monica Gotta and Shigeo Ohno respectively. Alexa Fluor 488 or 532 antibodies (Invitrogen) were used as secondary antibodies. Fixation of embryos was performed as described using the freeze-cack methanol protocol (Leung et al., 1999).

Confocal observations and quantifications

Observations were performed using a Leica (Wetzlar, Germany) SPE or SP5 confocal equipped with a 63X objective (LAS AF software) or a spinning disk system (Yokogawa CSU-X1 spinning head, Roper CoolSNAP HQ2 camera and Metamorph software). All images were examined and assembled using ImageJ 1.43 and Adobe Photoshop CS3 10.0.

C. elegans intestinal cells are full of autofluorescent granules. Whenever possible we reduced the detection window to a narrow band using the Leica SPE confocal to detect only the fluorochrome signal and eliminate autofluorescence; however it is visible on some panels especially in Fig6A due to the weakness of PAR-6::GFP fluorescence: the fluorescent spots (blue arrowheads) correspond to autofluorescent granules.

The percentage of embryos displaying a phenotype was obtained either by direct observation (for instance in FigS4A) or by quantification. Quantifications were performed using ImageJ 1.43 along straight lines of 5-10 μ m (width 0.2-0.5 μ m, depending on the thickness of cortical staining) over the apical, basolateral and cytoplasmic parts of one cell for each embryo or larva (for an example see Fig6). Apical and basolateral stainings were normalised to cytoplasmic staining for each given measure to account for expression variations between cells and animals. A ratio of about 1 therefore indicates no specific cortical staining. Statistical significances were analysed using Mann-Whitney tests (Comprehensive R Archive Network software). This approach was used to quantify endogenous PAR-6, PAR-6::GFP, PAR-3::GFP, GFP::PAR-6 (WT or CM2) and GFP::CDC-42 signals in embryos or larvae.

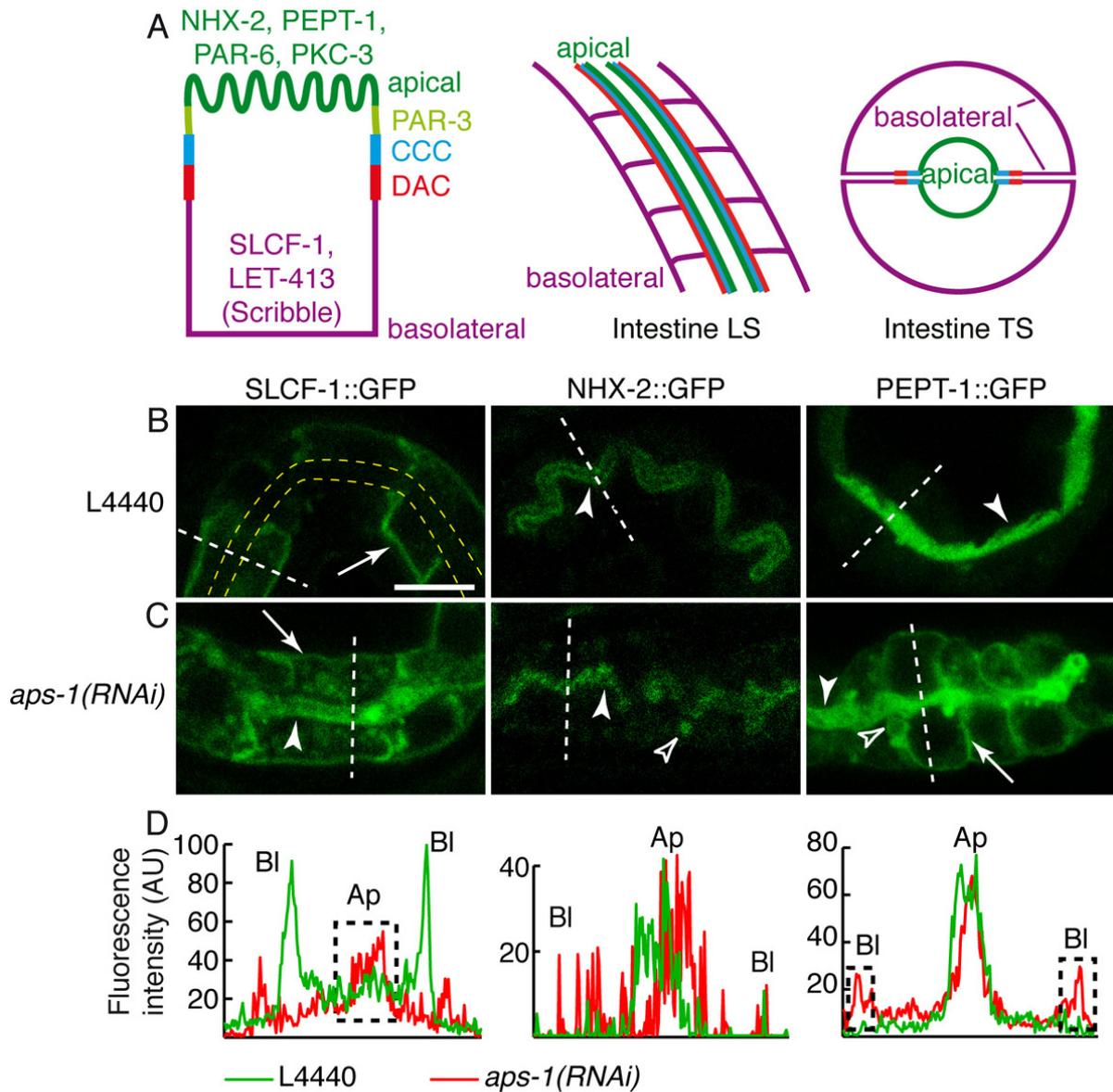


Figure 1: AP-1 is required to sort apical and basolateral proteins

A) Localisation of epithelial markers in a typical intestinal cell. "CCC" is the "Cadherin Catenin Complex" and "DAC" is the "DLG-1/AJM-1 Complex". The middle panel (Intestine LS) shows a longitudinal section of the intestine corresponding to its orientation in all panels except after EM where a transverse section (Intestine TS) is shown. In **B)** and **C)** RNAi was performed on young adults and the phenotype recorded in F1 3-fold stage embryos observed live. **B)** The fusion protein SLCF-1::GFP is only localised at the basolateral membrane (arrow) in intestinal cells in control embryos (L4440); the yellow dotted line indicate the position of the apical lumen. The fusion proteins NHX-2::GFP and PEPT-1::GFP are only visible at the apical membrane (arrowhead). **C)** In *aps-1(RNAi)* embryos, SLCF-1 is visible at the basolateral (arrow) and apical (arrowhead) membranes. NHX-2::GFP remains apical (arrowhead) but is also visible in lateral patches (empty arrowhead). PEPT-1 is localised at the apical (arrowhead) and basolateral (arrow) membranes as well as in lateral patches (empty arrowhead). **D)** Fluorescence quantification along the dotted line across the intestine for each of the pictures shown in **B)** and **C)**. Ap: apical; Bl: basal; AU: arbitrary unit. The dotted boxes highlight mislocalised markers. Scale bar represents 10 μ m.

To quantify intracellular punctae in FigS2A a maximal projection picture was generated after z-series acquisition with a z-step of 500nm across the whole intestine. Quantification was performed using the “3D object counter” plugin in ImageJ as described (Bolte and Cordelieres, 2006). Briefly a mask was used for each embryo to eliminate background noise and the number of individual puncta was calculated.

Electron microscopy

For electron microscopy, control and RNAi embryos were let to develop for 9-11 hours (3- to 4-fold embryos) before fixation by High Pressure Freezing with an EMPACT-2 (Leica, Vienna, Austria) followed by Freeze Substitution with an AFS (Leica, Vienna, Austria) as described (Liegeois et al., 2006). Ultrathin sections were obtained with a Leica Ultracut ultramicrotome. Sections were observed on a Philips CM12 with a Gatan Orius 1000 or a Jeol 100CX2 with a Gatan Orius 200.

The presence of ectopic lumens and junction length were quantified as follow: each embryo was sectioned every 5-7 μ m to ensure that different cells were observed in different 5-7 μ m portions. We then used only one section of high quality per portion for each embryo to measure electron dense structures (junctions) and assess the presence or absence of ectopic lumens. For junction length we observed 12 cells from 4 different control embryos and 30 cells from 6 different *aps-1(RNAi)* embryos. Ectopic lumens were scored in 17 sections from 6 different *aps-1(RNAi)* embryos while no ectopic lumen was observed in 4 different control embryos.

RESULTS

AP-1 is required for sorting basolateral and apical cargos

The *C. elegans* intestine is a simple model of tubular epithelium composed of two rows of cells with a lumen forming in the middle and easily identifiable apical and basolateral poles (Fig1A). We first tested the efficiency of *aps-1(RNAi)* and *apg-1(RNAi)* to remove the AP-1 complex by performing RNAi experiments against *aps-1* or *apg-1* which encode two different subunits of AP-1 in a strain expressing an APS-1::GFP fusion protein (see also Material and Methods). We observed a complete disappearance of the APS-1::GFP signal following *aps-1(RNAi)* and a diffuse localisation following *apg-1(RNAi)* (FigS1D), a result similar to what as been observed in mammalian cells following RNAi disruption of one AP-1 subunit (Lui-Roberts et al., 2005). The penetrance of the embryonic arrest following *aps-1(RNAi)* or *apg-1(RNAi)* was very high and all

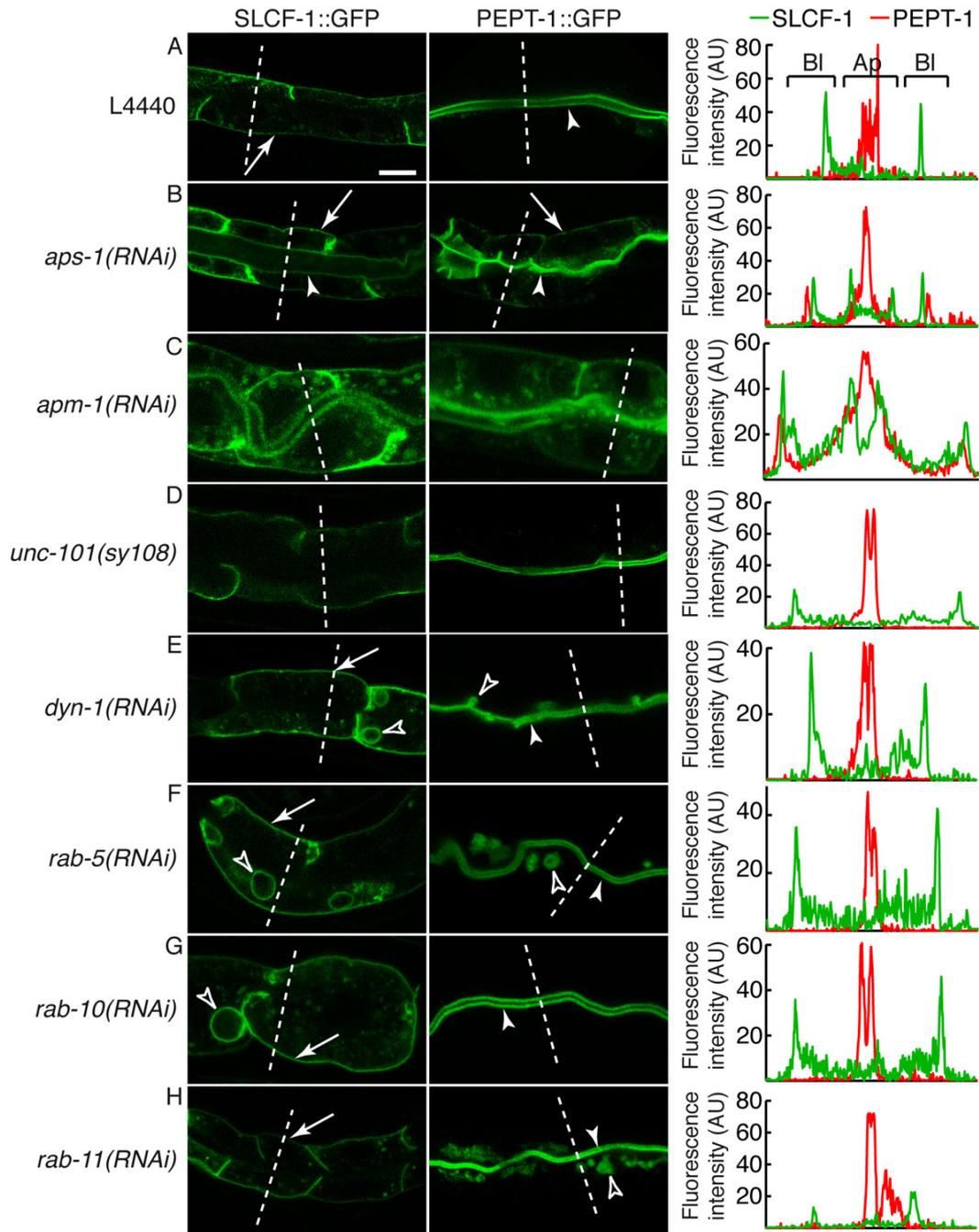


Figure 2: Sorting and transport of SLCF-1 and PEPT-1

RNAi against *aps-1* (B), *dyn-1* (C), *rab-5* (D), *rab-10* (E) and *rab-11* (F) was performed in L1 larvae and the localisation of SLCF-1 and PEPT-1 recorded 48h later. The apical membrane is indicated by a white arrowhead, the basolateral membrane by an arrow and empty arrowheads point to intracellular accumulation. Fluorescence quantification along the dotted line across the intestine for each picture is shown on the right. SLCF-1 and PEPT-1 are missorted in *aps-1(RNAi)* (B) and *apm-1(RNAi)* (C) larvae as in *aps-1(RNAi)* embryos (Fig1B-C). The sorting of SLCF-1 and PEPT-1 is not disrupted in *unc-101(sy108)* null mutants (D) or by the loss of *dyn-1* (E) or *rab-5* (F) though both markers accumulate on vesicles close to the plasma membrane following *dyn-1* or *rab-5* depletion (empty arrowhead, E-F). *rab-10(RNAi)* has no effect on PEPT-1 and induces an accumulation of SLCF-1 on large intracellular vacuoles (empty arrowhead, G). Conversely *rab-11(RNAi)* only affects PEPT-1 which is visible at the apical membrane and in intracellular vesicles (empty arrowhead, H).

Ap: apical; **Bl**: basolateral; AU: arbitrary unit. Scale bar represents 10mm.

the phenotypes described below displayed a very strong penetrance (>80%) unless otherwise stated. Deletion alleles *aps-1(tm935)*, *apg-1(tm1249)* and *apm-1(ok2578)* induced an L1/L2 larval lethality (FigS1E) presumably due to maternal contribution and we decided to analyse the embryonic arrest induced by the RNAi depletion of *aps-1*.

Because AP-1B has been implicated in basolateral targeting in Mammals (Folsch et al., 1999; Gan et al., 2002) we first examined the localisation of the transmembrane basolateral marker SLCF-1 which is a putative monocarboxylate transporter (Mouchiroud et al., 2010). We found that SLCF-1 was only found at the basolateral cortex of control embryos while *aps-1(RNAi)* induced a symmetric distribution of SLCF-1 at both the apical and the basolateral cortex (Fig1B-C). We next examined the distribution of two transmembrane apical markers. In WT embryos both proteins are strictly apical (Fig1B). In *aps-1(RNAi)* embryos the Na⁺/H⁺ exchanger NHX-2 (Nehrke, 2003) remained apical but was also observed in lateral patches (Fig1C). In contrast the oligopeptide transporter PEPT-1/OPT-2 (Nehrke, 2003) displayed a homogenous cortical localisation at apical and basolateral membranes and was also present in lateral patches (Fig1C). Fluorescence intensity was measured along a line crossing the whole intestine (Fig1B-C, dotted line) and showed that SLCF-1 and PEPT-1 are visible both at the apical and basolateral membrane in *aps-1(RNAi)* embryos (Fig1D). The loss of asymmetric distribution of SLCF-1 and PEPT-1 was observed in more than 90% of embryos (n>100). The absence of NHX-2 from the basolateral membrane in *aps-1(RNAi)* embryos indicates that the junctional diffusion barrier is intact, an hypothesis which was confirmed by several observations (see below). We therefore concluded that AP-1 could be required for sorting both basolateral and apical transmembrane proteins without affecting their transport to the plasma membrane.

To confirm this hypothesis we depleted several components of the membrane traffic machinery. Because of the early embryonic lethal phenotype associated with the loss of function of several of these genes the knockdown experiments were performed in larvae. We first recapitulated the sorting phenotype induced by *aps-1(RNAi)* (Fig2B). We then asked whether both μ subunits or only one was responsible for these sorting defects. We found that in *apm-1(RNAi)* larvae both SLCF-1 and PEPT-1 were missorted while no phenotype was observed in *unc-101(sy108)* null mutants (Fig2C-D). We next tested the function of essential trafficking components like the dynamin DYN-1 and the small GTPases RAB-5 and RAB-11. The asymmetric distributions of PEPT-1 and SLCF-1 were not affected in *dyn-1(RNAi)* or *rab-5(RNAi)* while both proteins were accumulating in vesicular structures still attached or closely apposed to their respective apical or basolateral plasma membrane (Fig2E-F). To examine the function of recycling endosomes and polarised trafficking we next targeted RAB-10 and RAB-11 which can be used to specifically target basolateral (Chen et al., 2006) or apical (Prekeris et al., 2000) routes respectively. We

found that PEPT-1 was never affected in *rab-10(RNAi)* worms while SLCF-1 was seen at the basolateral membrane and on large intracellular vacuoles that accumulate in RAB-10 depleted adults (Chen et al., 2006) (Fig2G). Conversely RAB-11 had no effect on SLCF-1 localisation while PEPT-1 systematically accumulated intracellularly close to the apical membrane (Fig2H); in larvae affected by *rab-11(RNAi)* for more than 48h this apical staining was absent and all PEPT-1 accumulated intracellularly. These observations were validated by fluorescence quantification along a line crossing the intestinal width (Fig2A-H, right panels). At least 50 larvae were observed for each condition. Only *aps-1(RNAi)* and *apm-1(RNAi)* larvae showed a symmetrical distribution of SLCF-1 and PEPT-1 observed in more than 90% of the cases and never seen in other RNAi conditions. These results demonstrate that endocytosis as tested with DYN-1 and RAB-5 and recycling as tested with RAB-11 and RAB-10 are not required for the polarised sorting of SLCF-1 and PEPT-1 but only for their transport. We concluded that AP-1/APM-1 can sort both apical and basolateral cargos that are then transported by different routes.

A surprising observation is that there is little intracellular accumulation of PEPT-1 and SLCF-1 in *aps-1(RNAi)* embryos suggesting that AP-1 is mostly required for sorting rather than transport. To examine the effect of *aps-1* depletion on intracellular organelles we quantified the number of intracellular punctae formed by several markers in intestinal cells of 3-fold stage embryos. We found that the numbers of RAB-5, RAB-7 and RAB-10 punctae were not significantly affected ($p>0.1$) in *aps-1(RNAi)* embryos (FigS2A-B) while Golgi/TGN displayed a normal morphology (FigS3B). However RAB-11 positive structures were absent from the subapical cortex in *aps-1* depleted embryos (>90%, $n>100$) (FigS2A), suggesting that AP-1 is specifically required for the maintenance of RAB-11 positive endosomes. However *rab-11* depletion induces an intracellular accumulation of PEPT-1 while *aps-1* depletion leads to missorting of this cargo to the apical and basolateral membrane. We concluded that in absence of AP-1 cargos probably use default intracellular pathways bypassing the requirement for RAB-11 endosomes for their apical localisation.

AP-1 depletion induces the formation of ectopic apical lumens

In almost all *aps-1(RNAi)* depleted 3-fold stage embryos we observed the formation of lateral patches stained by the apical markers NHX-2 and PEPT-1 which can be distinguished from intracellular vesicles by their localisation between two cells as seen for PEPT-1 (Fig1C, right panel, empty arrowhead). To characterise these lateral patches we used electron microscopy (EM) to examine 9-11 hours old embryos which corresponds to 3- and 4-fold stages (FigS1F). This time window was chosen to identify primary rather than secondary defects. In WT embryos we could identify a single lumen with normally shaped microvilli, well defined junctions and

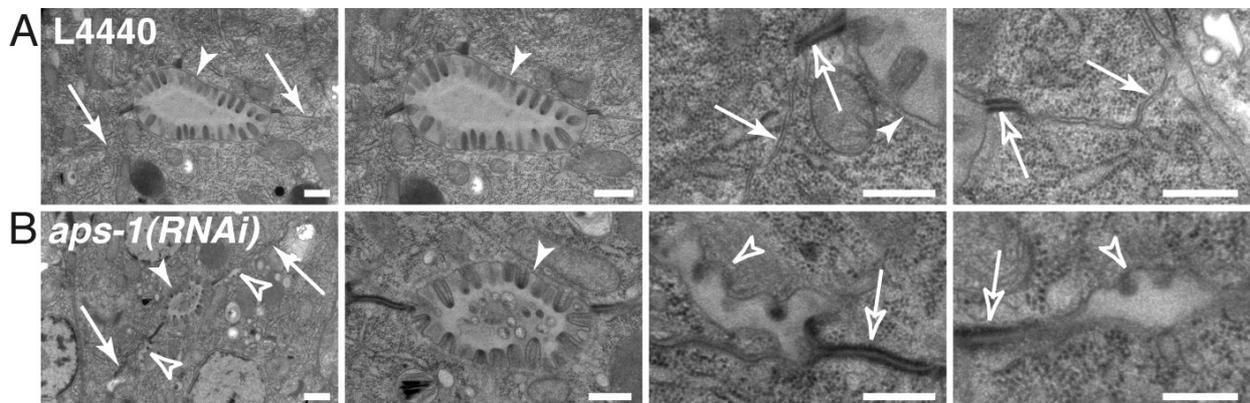


Figure 3: Ectopic apical lumen formation in *aps-1(RNAi)* embryos

A-B) Intestine ultrastructure of L4440 (A) and *aps-1(RNAi)* (B) 9-11 hours old 3-fold stage embryos. Enlargements on the right show the intestinal lumen (white arrowhead) and both lateral membranes (white arrows). Ectopic lumens (empty arrowheads) are visible on each side of the main lumen in an *aps-1(RNAi)* embryo. Note that junctions (empty arrows in the right panels) are present in *aps-1(RNAi)* embryos. See also FigS3. Scale bar represents 500nm.

closely apposed lateral membranes (Fig3A). In *aps-1* depleted embryos one main lumen was visible with elongated junctions (Fig3B and FigS3A-D, F) and partially disorganised microvilli (FigS3B). But we also frequently (70%, n=17) observed ectopic lumens defined by short microvilli and additional junctions (Fig3B and FigS3A, C-D). These ectopic lumens were located either between adjacent cells (Fig3B and FigS3A) or within cells following lateral membrane invagination (FigS3C) or in one instance without obvious connection to the plasma membrane (FigS3D). Disorganised microvilli, ectopic lumens and ectopic junctions were also observed in *apg-1(RNAi)* embryos (FigS3E). We concluded that AP-1 depletion can induce the conversion of lateral membrane into apical membrane (FigS3G).

AP-1 is required for the asymmetric apical localisation of PAR-6

The loss of AP-1 induces the formation of ectopic lumens and affects the polarised distribution of PEPT-1 and SLCF-1. While the former is implicated in growth, amino acid homeostasis and fat storage (Spanier et al., 2009) the latter is involved in longevity (Mouchiroud et al., 2010); their mislocalisation is therefore unlikely to be responsible for the formation of ectopic lumens and we decided to examine the localisation of essential polarity modules at two stages: at the 1.5-fold stage which corresponds to the end of polarity establishment, and in 3-fold stage embryos for the polarity maintenance phase. We first examined the apical PAR module. During epithelial polarisation at the beginning of embryonic elongation, PAR-3, PAR-6 and PKC-3 accumulate at the presumptive apical pole (Achilleos et al., 2010; Totong et al., 2007). This step of polarity establishment was not affected as shown by staining of these endogenous proteins in 1.5-fold stage embryos where they were restricted to their normal apical localisation (Fig4A, FigS4A). In the more elongated 3-fold stage *aps-1(RNAi)* embryos we found that PAR-6 was both apical and basolateral in more than 80% of embryos (Fig4B-D, FigS4A) and could be observed in lateral patches (Fig4B, Movies 1-2). To quantify the basolateral enrichment we calculated the apical/cytoplasmic and basal/cytoplasmic fluorescence ratios in control (n=13) and *aps-1(RNAi)* (n=15) 3-fold stage embryos; we found a 60% increase of the basal/cytoplasmic ratio of PAR-6 which was not present in control embryos ($p < 3.10^{-4}$; Fig4C) while the apical/cytoplasmic ratio was stable. We also quantified lateral staining along a line parallel to the apical pole and crossing two lateral membranes (Fig4B, D). In contrast to PAR-6, PAR-3 and PKC-3 were not found at the basolateral membrane (Fig4B, D, FigS4A) except for PAR-3 in about 15% of the embryos. However both PAR-3 and PKC-3 were also present in lateral patches (Fig4B). Based on EM observations ectopic junctions form around ectopic lumens. To establish whether the lateral patches observed by fluorescence correspond to ectopic lumens we costained embryos for PKC-3 and AJM-1, a *C. elegans* specific junctional protein (Koppen et al., 2001). AJM-1 was found at its

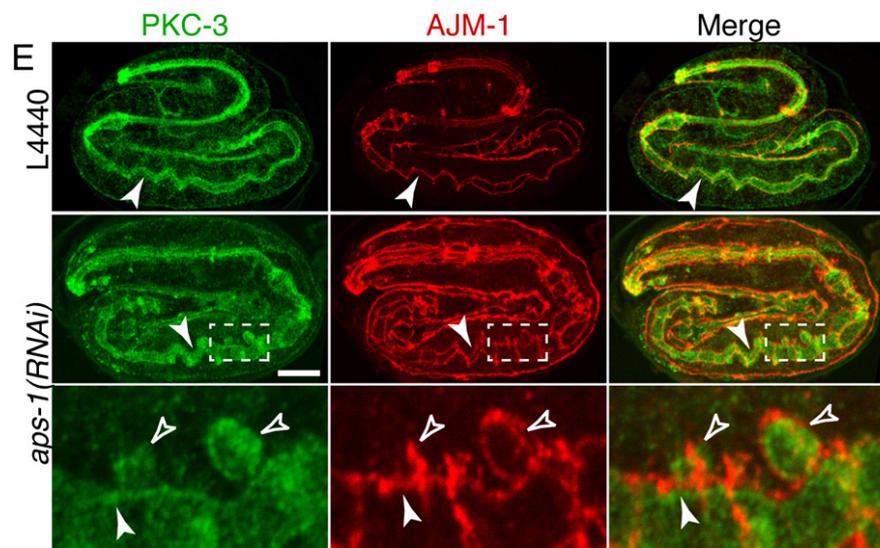
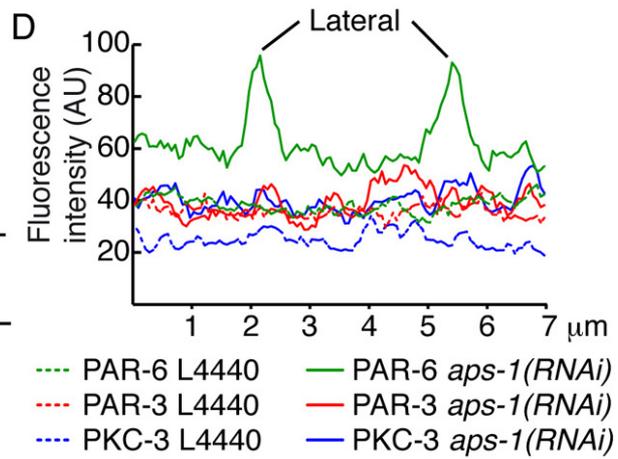
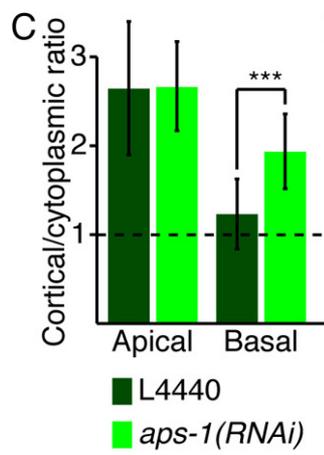
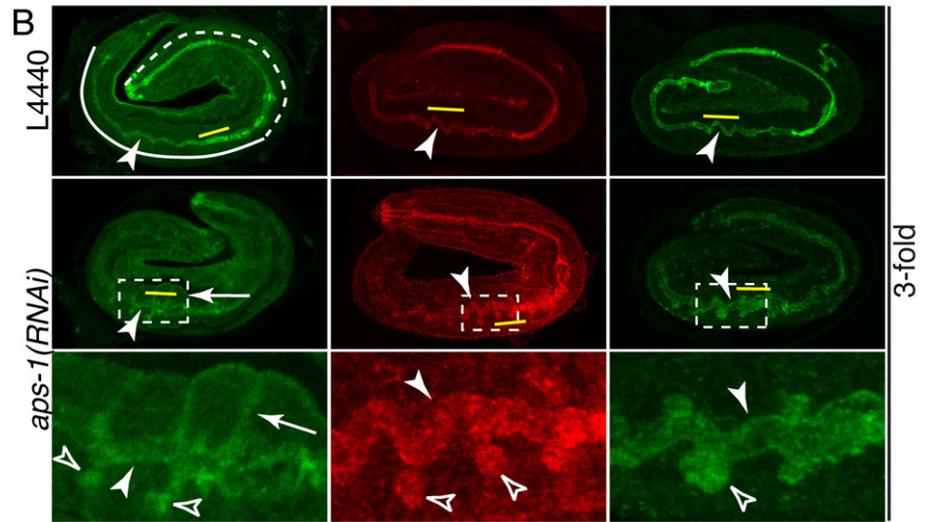
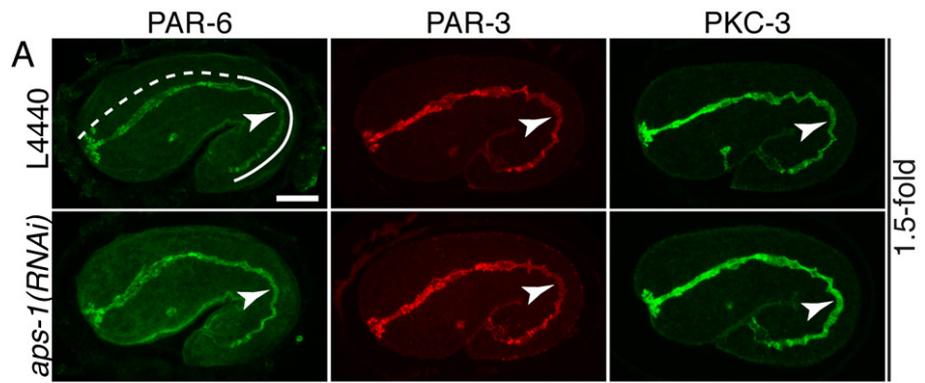


Figure 4: AP-1 is required for the maintenance of PAR-6 apical localisation

1.5-fold (A) and 3-fold stage embryos (B) were fixed and stained. Boxed regions are enlarged in the corresponding lower panels. The upper left panel in A and B shows the respective localisation of the pharynx (dotted line) and the intestine (solid line). **A)** The apical localisation of endogenous PAR-6, PAR-3 and PKC-3 in L4440 (upper panels) and *aps-1(RNAi)* embryos (lower panels) is similar shortly after polarity establishment in 1.5 fold stage embryos. All three proteins accumulate at the apical cortex (arrowhead) of intestinal cells and no lateral staining can be observed. **B)** Endogenous PAR-6, PAR-3 and PKC-3 localisation in L4440 (upper panels) and *aps-1(RNAi)* (lower panels) 3-fold stage embryos. Following *aps-1* depletion PAR-6 stains the apical (white arrowhead) and basolateral (white arrow) membranes as well as lateral patches corresponding to ectopic lumens (empty arrowheads). PAR-3 and PKC-3 are localised at the apical pole (white arrowheads) and in ectopic lumens (empty arrowheads). See also Movie 1-2. **C)** The fluorescence ratios apical/cytoplasm and basal/cytoplasm were measured for PAR-6 in 3-fold stage embryos. Note the significant 60% increase in basolateral accumulation of PAR-6 ($p < 3.10^{-4}$). **D)** Quantification of PAR-3, PAR-6 and PKC-3 localisation in the cytoplasm of L4440 and *aps-1(RNAi)* treated embryos shown in B. Quantification was done along a $7\mu\text{m}$ line parallel to the apical membrane shown in B. Only PAR-6 showed a significant accumulation on the lateral membrane. AU: arbitrary units. **E)** Endogenous PKC-3 and AJM-1 localisation in control (L4440, upper panel) and *aps-1(RNAi)* (lower panel) 3-fold stage embryos. In both conditions AJM-1 is found in a belt-like localisation (white arrowhead); following *aps-1* depletion PKC-3 is found in ectopic lumens surrounded by AJM-1 (empty arrowheads). Scale bar represents $10\mu\text{m}$.

normal belt-like localisation on either side of the apical PKC-3 signal; we also observed rings of AJM-1 surrounding doughnut-shaped PKC-3 positive structures (Fig4E). This observation strongly suggests that lateral patches correspond to ectopic lumens found by EM. Finally to confirm PAR-6 mislocalisation we used a PAR-6::GFP fusion. We found that it became mislocalised in the cytoplasm and in ectopic lumens in intestinal cells of 3-fold stage *aps-1(RNAi)* embryos (FigS4B). A cytoplasmic localisation was also observed in *apg-1(RNAi)* embryos (FigS4B) and in *aps-1(tm935)* mutant larvae (FigS4C). We concluded that AP-1 is specifically required for the asymmetric apical localisation of PAR-6.

The other apical polarity module is the Crumbs/PALS1(Stardust) module which is implicated in epithelial polarity in *Drosophila* and Mammals (St Johnston and Ahringer, 2010). However it has been reported not to be required for viability in *C. elegans* (Segbert et al., 2004). To confirm this result we obtained deletion mutants for *crb-1* (Crumbs), *eat-20* (Crumbs-like) and *tag-117* (PALS1/Stardust); homozygous mutants for each of these genes were viable and did not display any obvious phenotype. To assess a possible redundancy between *crb-1* and *eat-20* we performed *crb-1(RNAi)* in *eat-20(gk218)* and *eat-20(RNAi)* in *crb-1(ok931)* mutants without identifying any gross phenotype. We also assessed the localisation of EAT-20::GFP (Shibata et al., 2000) in WT and *aps-1(RNAi)* embryos without identifying any change in its cortical distribution in intestinal cells (not shown). We next examined the localisation of LET-413/Scribble which represents the Scribble/Dlg complex in *C. elegans* but its weak staining in the intestinal cells of 3-fold stage embryos prevented a detailed analysis of its localisation; however it was not affected in the

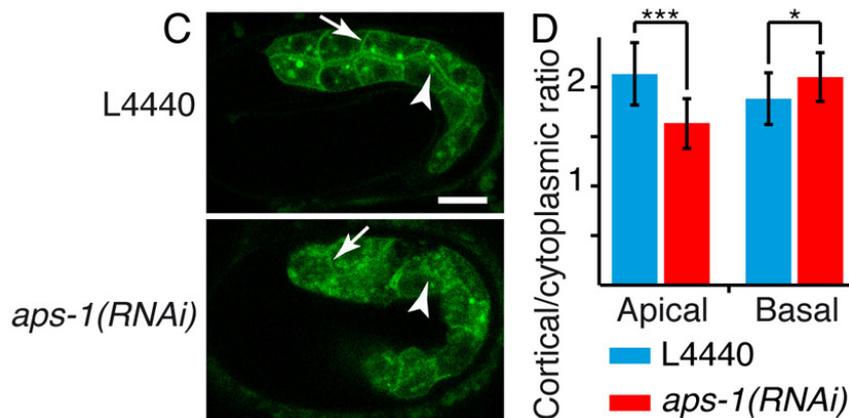
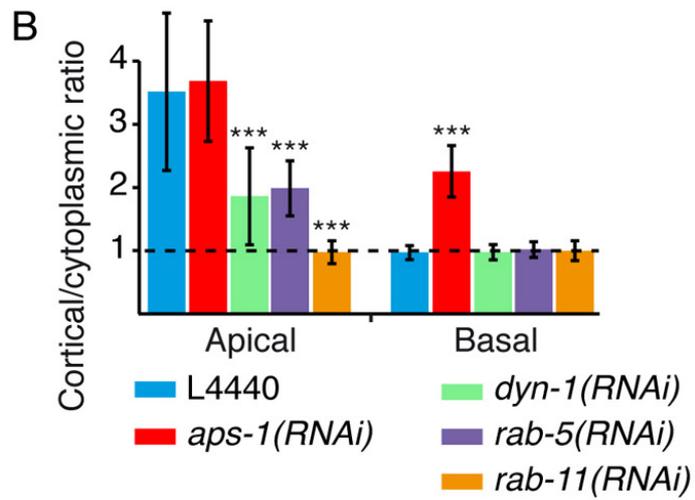
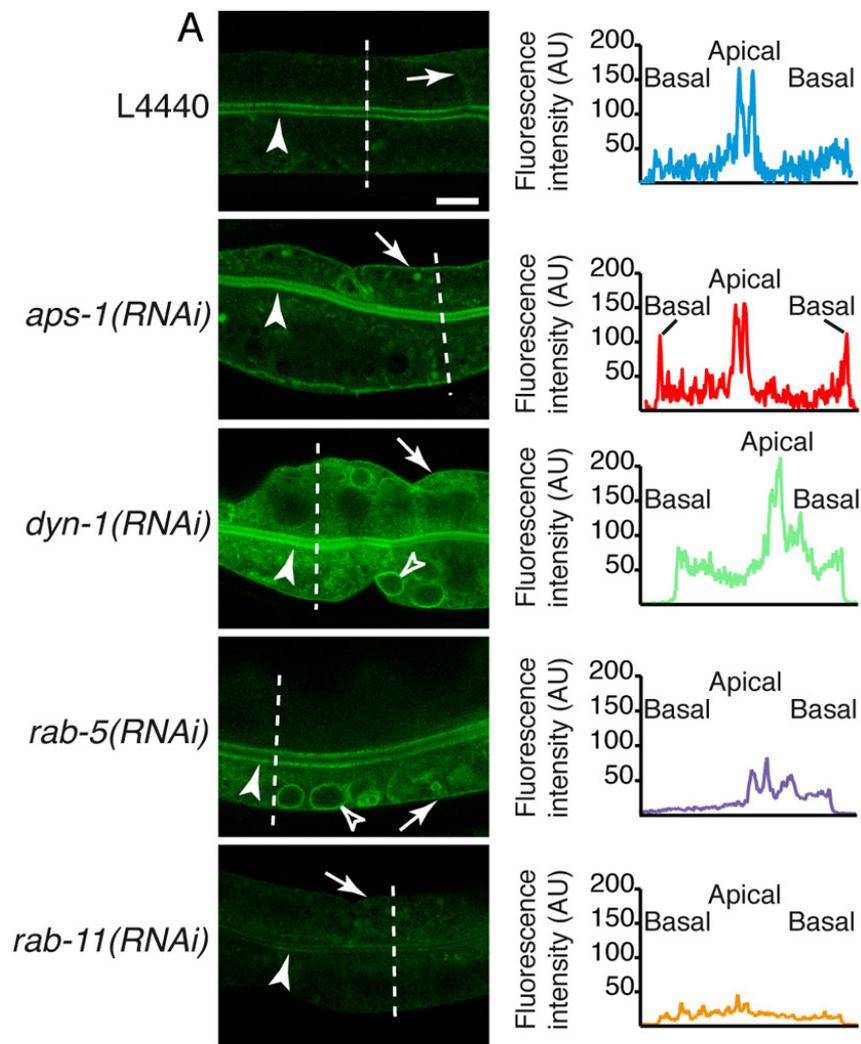


Figure 5: AP-1 is required to sort CDC-42 to the apical membrane

A) RNAi against *aps-1*, *dyn-1*, *rab-5* and *rab-11* was performed in L1 larvae and the localisation of GFP::CDC-42 recorded 48h later. The apical membrane is indicated by a white arrowhead, the basolateral membrane by an arrow and empty arrowheads point to intracellular accumulation. Fluorescence quantification along the dotted line across the intestine for each picture is shown on the right. GFP::CDC-42 accumulates at the apical membrane (white arrowhead) and is also visible at the lateral membrane (white arrow) in control (L4440) larvae. GFP::CDC-42 is visible at the basal membrane only in *aps-1(RNAi)* larvae. It accumulates on large vesicles (empty arrowhead) in *dyn-1(RNAi)* and *rab-5(RNAi)* larvae, while the signal is very weak in *rab-11(RNAi)* larvae. **B)** Quantification of the cortical/cytoplasmic signal ratio at the apical (left) and basal (right) cortex (n=15 for each RNAi condition). Fluorescence intensity was measured along a 5µm line at the apical and basal cortex and in the cytoplasm. *** indicates a significant difference compared to control ($p < 1.10^{-5}$). **C)** GFP::CDC-42 localisation in L4440 and *aps-1(RNAi)* embryos. Contrary to its localisation in larvae, GFP::CDC-42 is present at both the apical (arrowhead) and basolateral (arrow) membranes (see also Movie 3). GFP::CDC-42 apical localisation is lost in 30% of *aps-1(RNAi)* embryos (n=46) with no staining at the level of the arrowhead (see also Movie 4). **D)** Quantification of the cortical/cytoplasmic signal ratio at the apical (left) and basal (right) cortex. Fluorescence intensity was measured along a 5µm line at the apical and basal cortex and in the cytoplasm. Note that there is a significant decrease (***) in apical staining in the 70% of embryos (n=31) which display an apical localisation ($p < 1.10^{-8}$) while basolateral localisation (*) is slightly increased ($p < 1.10^{-3}$). Scale bar represents 10µm.

epidermis (not shown). Finally we also examined the cadherin/catenin complex (CCC) and the DLG-1/AJM-1 complex (DAC; FigS5A) and found that the belt-like localisation of these proteins was not affected in *aps-1(RNAi)* embryos (Fig4E, FigS5B) while they were also found surrounding ectopic lumens (Fig4E). Altogether these results suggest that PAR-6 is the only essential polarity determinant to require AP-1 for its specific targeting to the apical membrane.

Ectopic lumens could result from a failure to correctly establish polarity and a single lumen or form later after correct polarity establishment. To determine the timing of ectopic lumen formation we carefully examined PKC-3 localisation in correlation with elongation (FigS1F). We never observed ectopic lumens before the 2.5 fold stage in *aps-1(RNAi)* embryos (n=43; Fig4A) while they were observed in 74% of arrested 3-fold stage embryos (n=42; Fig4B). A similar result was obtained with PEPT-1 and no ectopic lumens were observed in 2-fold stage embryos by electron microscopy (not shown). We therefore concluded that AP-1 prevents *de novo* formation of ectopic apical lumens along the lateral membrane after normal polarity establishment and single lumen formation.

AP-1 controls CDC-42 apical localisation

We next wanted to identify the potential link between AP-1 and PAR-6 which is a cytoplasmic protein not known to directly interact with membranes. We had already ruled out a role for several PAR-6 interactors including PAR-3, PKC-3 and Crumbs which do not become basolateral

in *aps-1(RNAi)* embryos. Because CDC-42 can interact with PAR-6 and control its cortical recruitment in *C. elegans* one-cell embryos (Gotta et al., 2001) we decided to investigate the role of AP-1 and other membrane traffic components on CDC-42 localisation. These experiments were performed in larvae to bypass the early requirement of dynamin, RAB-5 and RAB-11 during embryogenesis. In control larvae GFP::CDC-42 was found mostly at the apical pole but was also visible at the lateral membrane and was absent from the basal membrane (Fig5A-B); a similar localisation has been observed with a rescuing GFP::CDC-42 under the control of its own promoter (Lukas Neukomm and Michael Hengartner, pers comm). In *aps-1(RNAi)* larvae we found a specific accumulation of CDC-42 at the basal cortex as shown after fluorescence quantification (Fig5A-B). We next examined the role of dynamin and RAB-5; their depletion reduced the relative amount of CDC-42 at the apical membrane but we did not observe any basal accumulation (Fig5A-B). Finally we found that RAB-11 depletion strongly affected CDC-42 which became very faint and essentially cytoplasmic (Fig5A-B). We concluded that dynamin, RAB-5 and RAB-11 are implicated in CDC-42 transport and localisation while only AP-1 is required for sorting CDC-42 towards the apical pole in larvae. We also characterised GFP::CDC-42 localisation in 3-fold stage embryos. In contrast with the larval localisation which was predominantly apical, CDC-42 had a symmetric distribution being found both at the basolateral and apical poles in control embryos (Fig5C, Movie 3). In this context we found that the CDC-42 apical enrichment was strongly affected in *aps-1(RNAi)* embryos. The apical staining was not visible in 30% of embryos (n=46; Fig5C, Movie 4) and significantly reduced compared to the cytoplasmic signal in the remaining embryos (Fig5D) while there was a small but significant increase in basolateral/cytoplasmic ratio. We concluded that AP-1 is required for CDC-42 apical targeting both in embryos and larvae.

PAR-6 apical localisation is dependent on its interaction with CDC-42

CDC-42 can interact with PAR-6 and recruit it to the anterior cortex of the one-cell *C. elegans* embryo (Gotta et al., 2001). Due to the early lethal phenotype induced by *cdc-42(RNAi)* we performed CDC-42 depletion by RNAi in larvae and found that the apical/cytoplasmic ratio of PAR-6::GFP showed a 2-fold decrease ($p < 5.10^{-4}$) in *cdc-42(RNAi)* larvae (Fig6A). In contrast the PAR-3::GFP fusion protein was not affected (Fig6B). As a control we also quantified GFP::CDC-42 apical accumulation in *par-6(RNAi)* larvae without finding any role for PAR-6 in CDC-42 apical localisation (Fig6C). The interaction between PAR-6 and CDC-42 is mediated by the semi-CRIB domain of PAR-6 (Aceto et al., 2006). To confirm a requirement for a direct interaction between CDC-42 and PAR-6 *in vivo* we used a GFP::PAR-6 construct carrying a deletion of the semi-CRIB domain, GFP::PAR-6(CM2) which can bind PKC-3 and PAR-3 but not CDC-42 (Aceto et al., 2006).

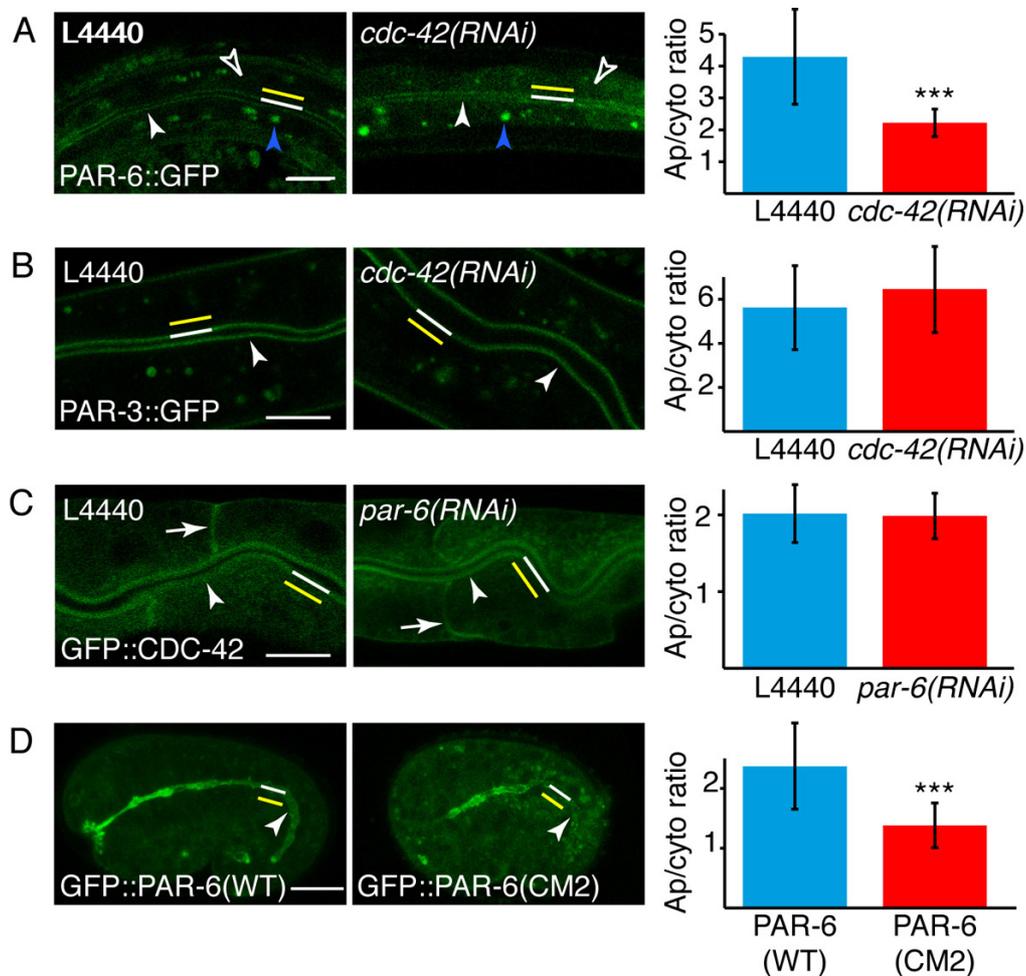


Figure 6: PAR-6::GFP apical localisation is dependent on CDC-42

A) RNAi against *cdc-42* was performed in L1 larvae and the localisation of PAR-6::GFP recorded 48h later. PAR-6::GFP accumulates at the apical membrane (white arrowhead) and in the cytoplasm (empty arrowhead) of *cdc-42(RNAi)* larvae. Note that autofluorescent granules (blue arrowheads) do not correspond to PAR-6::GFP signal. Right panel: quantification of the apical/cytoplasmic signal ratio. Fluorescence intensity was measured along a 10µm line at the apical cortex (white bar) and in the cytoplasm (yellow bar) of L4440 (n=9) and *cdc-42(RNAi)* (n=10) larvae and showed a significant decrease (***) in the apical/cytoplasmic ratio ($p < 1.10^{-3}$) following *cdc-42(RNAi)*. **B)** RNAi against *cdc-42* was performed in L1 larvae and the localisation of PAR-3::GFP recorded 48h later. PAR-3::GFP accumulates at the apical membrane (white arrowhead) and its localisation is not affected in *cdc-42(RNAi)* larvae. Right panel: quantification of the apical/cytoplasmic signal ratio. Fluorescence intensity was measured along a 5µm line at the apical cortex (white bar) and in the cytoplasm (yellow bar) of L4440 (n=14) and *cdc-42(RNAi)* (n=17) larvae. There was no significant difference ($p > 0.1$) in PAR-3 localisation. **C)** RNAi against *par-6* was performed in L1 larvae and the localisation of GFP::CDC-42 recorded 48h later. GFP::CDC-42 is visible at the apical (white arrowhead) and lateral membranes and its localisation is not affected in *par-6(RNAi)* larvae. Right panel: quantification of the apical/cytoplasmic signal ratio. Fluorescence intensity was measured along a 5µm line at the apical cortex (white bar) and in the cytoplasm (yellow bar) of L4440 (n=16) and *par-6(RNAi)* (n=13) larvae. There was no significant difference ($p > 0.1$) in CDC-42 localisation. **D)** The localisation of WT and mutant (CM2) versions of GFP::PAR-6 was observed in the intestine of 1.5-fold stage embryos. Right panel: quantification of the apical/cytoplasmic signal ratio. Fluorescence intensity was measured along a 5µm line at the apical cortex (white arrow and bar) and in the cytoplasm (yellow bar) of PAR-6(WT) (n=19) and PAR-6(CM2) (n=29) embryos. There was a 40% decrease (***, $p < 1.10^{-7}$) in PAR-6 apical localisation. Scale bar represents 10µm.

We found that this fusion protein was mostly cytoplasmic in the intestine of elongating embryos (Fig6D) while the WT version of GFP::PAR-6 was found to be apical at the same stage (Fig6D). We concluded that PAR-6 binding to CDC-42 is required for PAR-6 accumulation at the apical cortex of intestinal cells.

DISCUSSION

By analysing the phenotype induced by the depletion of the clathrin adaptor complex AP-1 we have shown that it is required for the maintenance of a single lumen in the *C. elegans* intestine. At the cellular level we found that AP-1 is necessary for the polarised apical localisation of the oligopeptide transporter PEPT-1 and of the essential polarity proteins PAR-6 and CDC-42 as well as for the basolateral distribution of the monocarboxylate transporter SLCF-1. Apical and basolateral sorting in epithelial cells is a complex process and basolateral targeting has been extensively studied (Carmosino et al., 2009; Duffield et al., 2008; Folsch, 2008; Folsch et al., 2009; Gonzalez and Rodriguez-Boulan, 2009) while mechanisms underlying apical delivery have proven difficult to characterise (Golachowska et al., 2010; Weisz and Rodriguez-Boulan, 2009). Several hypotheses can be proposed for AP-1 function in apical trafficking. A first model implicating AP-1 solely in basolateral targeting followed by transcytosis of apical proteins could explain our results. However we do not favour this hypothesis because preventing endocytosis should allow us to see apical cargos at the basolateral membrane, while PEPT-1 remains only apical following dynamin depletion. Alternatively AP-1 could target a molecule to the basolateral membrane which would be required to exclude apical proteins; in the early embryo the RhoGAP PAC-1 excludes CDC-42 and PAR-6 from cell-cell contact and its absence leads to a lateral localisation of these two proteins (Anderson et al., 2008). However in the absence of AP-1 basolateral cargos such as SLCF-1 are not depleted from the basolateral cortex but are also present at the apical pole. If this model was correct both CDC-42 and PAR-6 would be excluded from the basolateral and apical cortex. We therefore propose that AP-1 is directly implicated in both basolateral and apical sorting. Furthermore a single μ subunit is sufficient for both. Sequence alignments of APM-1 and UNC-101 with μ 1A and μ 1B do not identify any clear ortholog preventing speculation about μ 1A function in mammalian epithelial cells. Further studies will be necessary to understand how AP-1/APM-1 can sort both apical and basolateral cargos, to identify the apical sorting signals potentially recognised by AP-1 and to examine the possible conservation of this apical AP-1 function in other organisms.

The defect in apical sorting and the *de novo* formation of ectopic lumens in a tubular epithelium demonstrate that AP-1 is essential for the maintenance of epithelial polarity. Previous studies have focused on the role of AP-1B in basolateral targeting in mammalian epithelial cells but did not identify defects in overall cell polarity (Folsch et al., 1999; Gan et al., 2002). In *Drosophila* epithelial sensory organs AP-1 acts in recycling endosomes as a negative regulator of targeting to the apical E-cadherin junction for the two basolateral transmembrane proteins Notch and Sanpodo, again without affecting overall polarity (Benhra et al., 2011). It is therefore surprising to identify such an essential function for AP-1 in the localisation of apical proteins including CDC-42 and PAR-6 and epithelial polarity maintenance in the intestine of *C. elegans*. This difference could be due to the fact that the function of the AP-1A subcomplex has never been tested in mammalian epithelial cells but there is only one AP-1 complex in *Drosophila*. Another explanation could be based on the specific shape of tubular epithelia as compared to monolayered models used previously to study AP-1 function; however the pharynx which is also a tubular epithelium is not affected. Alternatively it could reflect the divergent mechanisms used to establish and maintain polarity in specific epithelial tissues. For instance basolateral targeting motifs are different in MDCK and Caco-2 cells (Monlauzeur et al., 2000) and the PAR-3 function is not identical in epidermal and intestinal *C. elegans* cells (Achilleos et al., 2010). Interestingly this novel AP-1 function could explain the embryonic lethality associated with γ or μ 1A knock-out in mice (Meyer et al., 2000; Zizioli et al., 1999) beyond the basolateral trafficking role of μ 1B. The PAR-3/PAR-6/PKC-3 module is required in many different polarised cell types including asymmetrically dividing cells, migrating cells and neurons or at the immunological synapse (Suzuki and Ohno, 2006). Because AP-1 is ubiquitously expressed a role for this complex in CDC-42 and PAR-6 localisation could be essential in other cell types and organisms.

The formation of pathological ectopic lumens in tubular epithelia has been observed in various contexts. Patients affected by the orphan Microvillus Inclusion Disease (MVID) have ectopic lumens forming inside intestinal cells (Ruemmele et al., 2006). MVID is caused by mutations affecting type Vb myosin (Myo5B) (Muller et al., 2008). Ectopic lumens have also been observed in Rab8 knock-out mice (Sato et al., 2007). Both proteins are implicated in apical transport (Lapierre et al., 2001; Sato et al., 2007) and it has been proposed that MVID is induced by defect in apical trafficking (Ameen and Salas, 2000). Ectopic lumens are also induced by the loss of glycosphingolipid biosynthesis (Zhang et al., 2011). Glycosphingolipids are essential components of lipids rafts (Simons and Ikonen, 1997) which have a role in apical sorting of GPI anchored proteins (Brown and Rose, 1992). Depletion of AP-1 or of enzymes required for glycosphingolipid biosynthesis both induce a lateral to apical conversion. Is the formation of ectopic lumens the result of apical depletion or basolateral missorting of polarity determinants? While they are sometimes depleted from the apical pole like CDC-42 in *aps-1(RNAi)* embryos,

this is not the most common observation since endogenous PAR-6 apical localisation is not affected and both CDC-42 and PAR-6 remain apical in *aps-1(RNAi)* larvae. However the basolateral relocalisation of PAR-6 could account for lateral to apical conversion by acting as a recruiting platform for other apical determinants including PKC-3 and PAR-3 to initiate the formation of ectopic lumens. The restriction of ectopic lumen formation at the lateral side and not the basal cortex is probably due to the cell-cell contacts required to generate a lumen: lateral membranes of intestinal cells contact each other while the basal pole faces other tissues. The main lumen is initially formed by a PAR-3 dependent recruitment of E-cadherin and other apical PAR proteins (Achilleos et al., 2010). The formation of ectopic lumens could therefore rely on a randomly localised PAR-3 recruitment by PAR-6 at the lateral membrane triggering a cascade of events leading to the formation of a new lumen with a mechanism similar to the formation of the main lumen. Such a model where CDC-42 and PAR-6 localisation is dependent on membrane traffic could broadly account for ectopic lumen formation either inside cells (Rab8 knock-out mice and in MVID patients) or at the lateral membrane (AP-1 or glycosphingolipid depletion). While Rab8 and Myo5B are required for apical transport, AP-1 and glycosphingolipids control apical sorting; ectopic accumulation of polarity determinants and lumen formation would therefore be either intracellular (Rab8 and Myo5B) or lateral (AP-1 and glycosphingolipid).

One striking observation is that AP-1 is only required after polarity establishment. This late effect could be due to a delay in AP-1 knockdown. However we almost never observed embryos arrested before the 2.5-fold stage even after very long RNAi feeding periods, suggesting that AP-1 is dispensable for polarity establishment. Several mechanisms are implicated in that process including centrosome reorientation, microtubule reorganisation or actin-based cortical flow (St Johnston and Ahringer, 2010). Membrane traffic could become essential later. Interestingly CDC-42 has been found on AP-1A coated liposomes (Baust et al., 2006) which raises the possibility of a physical interaction between CDC-42 and AP-1 which could be required to prevent or limit CDC-42 basolateral targeting and promote its apical sorting. We propose that by controlling the sorting of both apical and basolateral proteins including CDC-42 and PAR-6 AP-1 is a critical factor in apico-basal polarity maintenance, and the interplay between AP-1 and glycosphingolipids remains to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Anne Pacquelet and we also thank Dan Cutler, Roland Le Borgne and Vincent Hyenne for critical reading of the manuscript. Strains were provided by the CGC (University of Minnesota, USA) and the NBP (Tokyo University, Japan). We thank Monica Gotta,

Barth Grant, Jeff Hardin, Ken Kemphues, Michel Labouesse, Jeremy Nance, Keith Nehrke and Shigeo Ohno for strains and antibodies, and Lukas Neukomm and Michael Hengartner for sharing unpublished observations. We also thank Stéphanie Dutertre from the Microscopy Rennes Imaging Center (Rennes, France), and Yannick Schwab and Didier Hentsch from the IGBMC Imaging Center (Strasbourg, France). This work was supported by INSERM Avenir and Région Bretagne ACOMB grants R06488NS and 3252, the Fondation pour la Recherche Médicale, Rennes Métropole and Université de Rennes 1.

BIBLIOGRAPHY

- Aceto, D., Beers, M. and Kemphues, K. J.** (2006). Interaction of PAR-6 with CDC-42 is required for maintenance but not establishment of PAR asymmetry in *C. elegans*. *Dev Biol* **299**, 386-97.
- Achilleos, A., Wehman, A. M. and Nance, J.** (2010). PAR-3 mediates the initial clustering and apical localization of junction and polarity proteins during *C. elegans* intestinal epithelial cell polarization. *Development* **137**, 1833-42.
- Ameen, N. A. and Salas, P. J.** (2000). Microvillus inclusion disease: a genetic defect affecting apical membrane protein traffic in intestinal epithelium. *Traffic* **1**, 76-83.
- Anderson, D. C., Gill, J. S., Cinalli, R. M. and Nance, J.** (2008). Polarization of the *C. elegans* embryo by RhoGAP-mediated exclusion of PAR-6 from cell contacts. *Science* **320**, 1771-4.
- Balklava, Z., Pant, S., Fares, H. and Grant, B. D.** (2007). Genome-wide analysis identifies a general requirement for polarity proteins in endocytic traffic. *Nat Cell Biol* **9**, 1066-73.
- Baust, T., Czupalla, C., Krause, E., Bourel-Bonnet, L. and Hoflack, B.** (2006). Proteomic analysis of adaptor protein 1A coats selectively assembled on liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3159-64.
- Benhra, N., Lallet, S., Cotton, M., Le Bras, S., Dussert, A. and Le Borgne, R.** (2011). AP-1 Controls the Trafficking of Notch and Sanpodo toward E-Cadherin Junctions in Sensory Organ Precursors. *Curr Biol* **21**, 87-95.
- Bolte, S. and Cordelieres, F. P.** (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* **224**, 213-32.
- Brenner, S.** (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Bryant, D. M., Datta, A., Rodriguez-Fraticelli, A. E., Peranen, J., Martin-Belmonte, F. and Mostov, K. E.** (2010). A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. *Nat Cell Biol*.
- Carmosino, M., Valenti, G., Caplan, M. and Svelto, M.** (2009). Polarized traffic towards the cell surface: how to find the route. *Biol Cell* **102**, 75-91.
- Chen, C. C., Schweinsberg, P. J., Vashist, S., Mareiniss, D. P., Lambie, E. J. and Grant, B. D.** (2006). RAB-10 is required for endocytic recycling in the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Mol Biol Cell* **17**, 1286-97.
- Chisholm, A. D. and Hardin, J.** (2005). Epidermal morphogenesis. *WormBook*, 1-22.

- Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvarezza, S., Schreiner, R. and Rodriguez-Boulan, E.** (2008). Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* **452**, 719-23.
- Duffield, A., Caplan, M. J. and Muth, T. R.** (2008). Protein trafficking in polarized cells. *Int Rev Cell Mol Biol* **270**, 145-79.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Folsch, H.** (2008). Regulation of membrane trafficking in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 208-13.
- Folsch, H., Mattila, P. E. and Weisz, O. A.** (2009). Taking the scenic route: biosynthetic traffic to the plasma membrane in polarized epithelial cells. *Traffic* **10**, 972-81.
- Folsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S. and Mellman, I.** (1999). A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* **99**, 189-98.
- Francis, R. and Waterston, R. H.** (1991). Muscle cell attachment in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **114**, 465-79.
- Gan, Y., McGraw, T. E. and Rodriguez-Boulan, E.** (2002). The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat Cell Biol* **4**, 605-9.
- Golachowska, M. R., Hoekstra, D. and van, I. S. C.** (2010). Recycling endosomes in apical plasma membrane domain formation and epithelial cell polarity. *Trends Cell Biol* **20**, 618-26.
- Gonzalez, A. and Rodriguez-Boulan, E.** (2009). Clathrin and AP1B: key roles in basolateral trafficking through trans-endosomal routes. *FEBS Lett* **583**, 3784-95.
- Gotta, M., Abraham, M. C. and Ahringer, J.** (2001). CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr Biol* **11**, 482-8.
- Kamath, R. S. and Ahringer, J.** (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-21.
- Koppen, M., Simske, J. S., Sims, P. A., Firestein, B. L., Hall, D. H., Radice, A. D., Rongo, C. and Hardin, J. D.** (2001). Cooperative regulation of AJM-1 controls junctional integrity in *Caenorhabditis elegans* epithelia. *Nat Cell Biol* **3**, 983-91.
- Labbe, J. C., Pacquelet, A., Marty, T. and Gotta, M.** (2006). A genomewide screen for suppressors of par-2 uncovers potential regulators of PAR protein-dependent cell polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **174**, 285-95.
- Lapierre, L. A., Kumar, R., Hales, C. M., Navarre, J., Bhartur, S. G., Burnette, J. O., Provance, D. W., Jr., Mercer, J. A., Bahler, M. and Goldenring, J. R.** (2001). Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol Biol Cell* **12**, 1843-57.
- Leung, B., Hermann, G. J. and Priess, J. R.** (1999). Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol* **216**, 114-34.
- Liegeois, S., Benedetto, A., Garnier, J. M., Schwab, Y. and Labouesse, M.** (2006). The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **173**, 949-61.
- Lu, H. and Bilder, D.** (2005). Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **7**, 1232-9.
- Lui-Roberts, W. W., Collinson, L. M., Hewlett, L. J., Michaux, G. and Cutler, D. F.** (2005). An AP-1/clathrin coat plays a novel and essential role in forming the Weibel-Palade bodies of endothelial cells. *J Cell Biol* **170**, 627-36.

Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. and Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* **10**, 3959-70.

Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E. L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K. and Schu, P. (2000). *mu1A*-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J* **19**, 2193-203.

Monlauzeur, L., Breuza, L. and Le Bivic, A. (2000). Different functional recognition of basolateral signals in Caco-2 and MDCK cells. *Exp Cell Res* **258**, 195-203.

Mouchiroud, L., Molin, L., Kasturi, P., Triba, M. N., Dumas, M. E., Wilson, M. C., Halestrap, A. P., Roussel, D., Masse, I., Dalliere, N. et al. (2010). Pyruvate imbalance mediates metabolic reprogramming and mimics lifespan extension by dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*.

Muller, T., Hess, M. W., Schiefermeier, N., Pfaller, K., Ebner, H. L., Heinz-Erian, P., Ponstingl, H., Partsch, J., Rollinghoff, B., Kohler, H. et al. (2008). MYO5B mutations cause microvillus inclusion disease and disrupt epithelial cell polarity. *Nat Genet* **40**, 1163-5.

Nakayama, Y., Shivas, J. M., Poole, D. S., Squirrell, J. M., Kulkoski, J. M., Schleede, J. B. and Skop, A. R. (2009). Dynamin participates in the maintenance of anterior polarity in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Dev Cell* **16**, 889-900.

Nance, J., Munro, E. M. and Priess, J. R. (2003). *C. elegans* PAR-3 and PAR-6 are required for apicobasal asymmetries associated with cell adhesion and gastrulation. *Development* **130**, 5339-50.

Nehrke, K. (2003). A reduction in intestinal cell pHi due to loss of the *Caenorhabditis elegans* Na⁺/H⁺ exchanger NHX-2 increases life span. *J Biol Chem* **278**, 44657-66.

Prekeris, R., Klumperman, J. and Scheller, R. H. (2000). A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes. *Mol Cell* **6**, 1437-48.

Ruemmele, F. M., Muller, T., Schiefermeier, N., Ebner, H. L., Lechner, S., Pfaller, K., Thoni, C. E., Goulet, O., Lacaille, F., Schmitz, J. et al. Loss-of-function of MYO5B is the main cause of microvillus inclusion disease: 15 novel mutations and a *CaCo-2* RNAi cell model. *Hum Mutat* **31**, 544-51.

Ruemmele, F. M., Schmitz, J. and Goulet, O. (2006). Microvillous inclusion disease (microvillous atrophy). *Orphanet J Rare Dis* **1**, 22.

Sato, T., Mushiake, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A. et al. (2007). The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature* **448**, 366-9.

Segbert, C., Johnson, K., Theres, C., van Furden, D. and Bossinger, O. (2004). Molecular and functional analysis of apical junction formation in the gut epithelium of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **266**, 17-26.

Shibata, Y., Fujii, T., Dent, J. A., Fujisawa, H. and Takagi, S. (2000). EAT-20, a novel transmembrane protein with EGF motifs, is required for efficient feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **154**, 635-46.

Shim, J., Sternberg, P. W. and Lee, J. (2000). Distinct and redundant functions of *mu1* medium chains of the AP-1 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **11**, 2743-56.

Shivas, J. M., Morrison, H. A., Bilder, D. and Skop, A. R. (2010). Polarity and endocytosis: reciprocal regulation. *Trends Cell Biol* **20**, 445-52.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-72.

Spanier, B., Lasch, K., Marsch, S., Benner, J., Liao, W., Hu, H., Kienberger, H., Eisenreich, W. and Daniel, H. (2009). How the intestinal peptide transporter PEPT-1 contributes to an obesity phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **4**, e6279.

St Johnston, D. and Ahringer, J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* **141**, 757-74.

Sugiyama, Y., Nishimura, A. and Ohno, S. (2008). Symmetrically dividing cell specific division axes alteration observed in proteasome depleted *C. elegans* embryo. *Mech Dev* **125**, 743-55.

Suzuki, A. and Ohno, S. (2006). The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci* **119**, 979-87.

Totong, R., Achilleos, A. and Nance, J. (2007). PAR-6 is required for junction formation but not apicobasal polarization in *C. elegans* embryonic epithelial cells. *Development* **134**, 1259-68.

Vaccari, T. and Bilder, D. (2009). At the crossroads of polarity, proliferation and apoptosis: the use of *Drosophila* to unravel the multifaceted role of endocytosis in tumor suppression. *Mol Oncol* **3**, 354-65.

Weisz, O. A. and Rodriguez-Boulan, E. (2009). Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci* **122**, 4253-66.

Yeaman, C., Grindstaff, K. K. and Nelson, W. J. (1999). New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev* **79**, 73-98.

Zhang, H., Abraham, N., Khan, L. A., Hall, D. H., Fleming, J. T. and Gobel, V. (2011). Apicobasal domain identities of expanding tubular membranes depend on glycosphingolipid biosynthesis. *Nat Cell Biol* **13**, 1189-201.

Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., von Figura, K. and Schu, P. (1999). Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J Biol Chem* **274**, 5385-90.

SUPPLEMENTARY INFORMATIONS

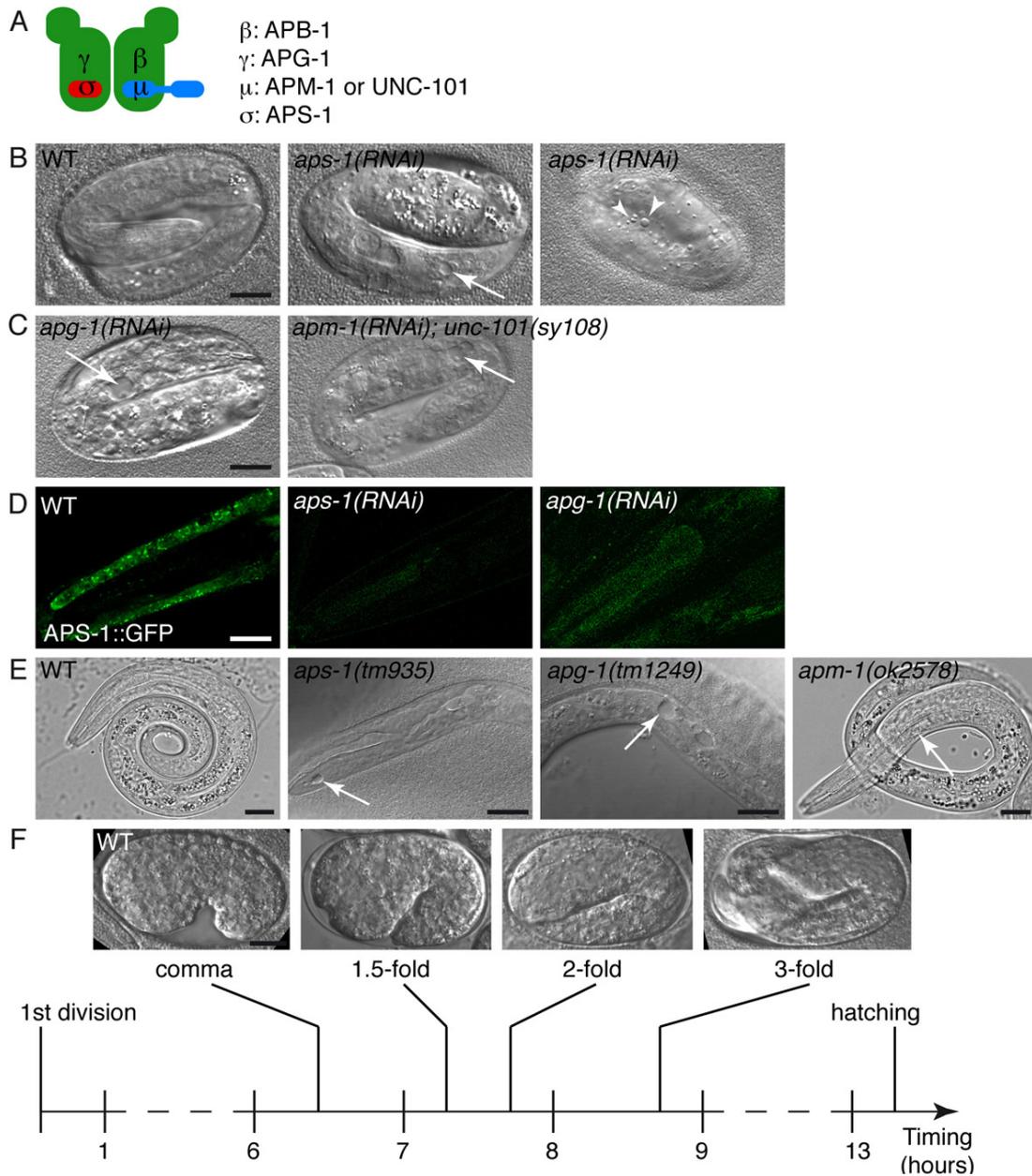


Figure S1: AP-1 depletion morphological phenotype

A) AP-1 is composed of four subunits and two different genes encode a μ subunit: *unc-101* and *apm-1*. **B)** WT and *aps-1(RNAi)* embryos at the 3-fold stage. Vacuoles are visible inside the body (arrow) and cellular debris are floating in the egg shell (arrowheads in the right panel). **C)** Embryos depleted for *apg-1* (left panel) or both μ subunits *apm-1* and *unc-101* (right panels). Vacuoles are visible (arrows). **D)** RNAi efficiency was tested by examining APS-1::GFP fluorescence in the anterior hypodermis where it forms discrete puncta (left panel). Almost no signal is left following *aps-1(RNAi)* (middle panel) while it is only visible as a diffuse cytoplasmic staining after *apg-1(RNAi)* (right panel). **E)** Deletions affecting *aps-1*, *apg-1* and *apm-1* induce larval lethality. Vacuoles are visible inside the body (arrows). **F)** A timeline of *C. elegans* embryonic morphogenesis. Scale bar represents 10 μ m.

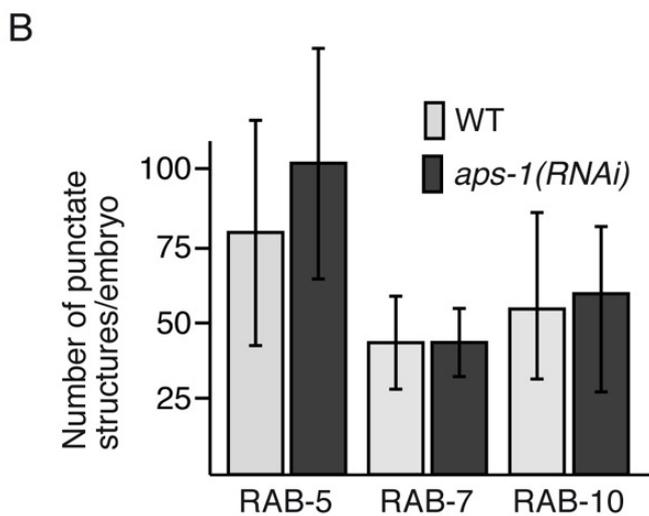
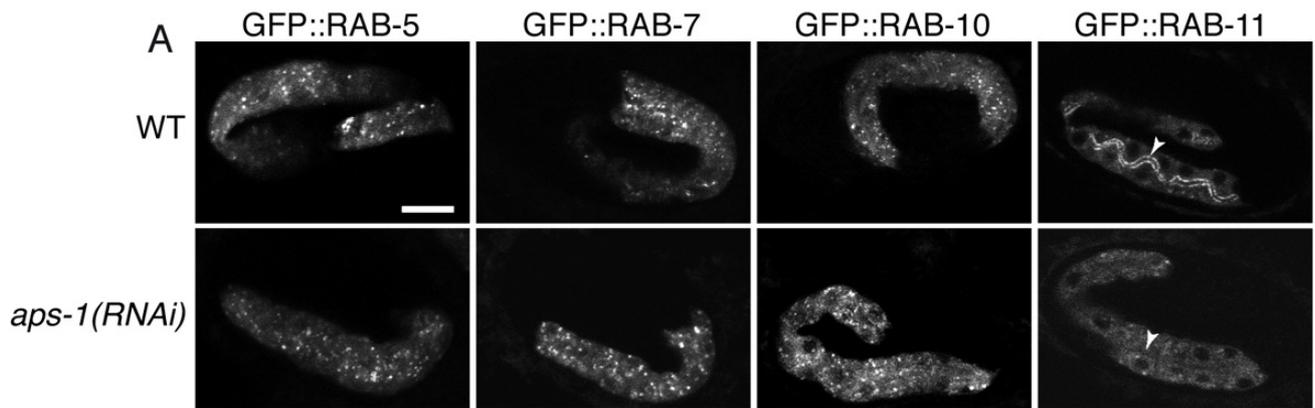


Figure S2: Characterisation of endosomes in *aps-1(RNAi)* embryos

A) Localisation of endosomal markers in intestinal cells of 3-fold stage embryos. Note that the RAB-11 positive subcortical signal (arrowhead) is absent in *aps-1(RNAi)* embryos. **B)** Quantification of intracellular punctae formed by RAB-5, RAB-7 and RAB-10. The number of individual puncta throughout the intestine of embryos (n=10) was measured. The RAB-11 signal is not composed of distinct punctae and could not be quantified in the same way. Scale bar represents 10µm.

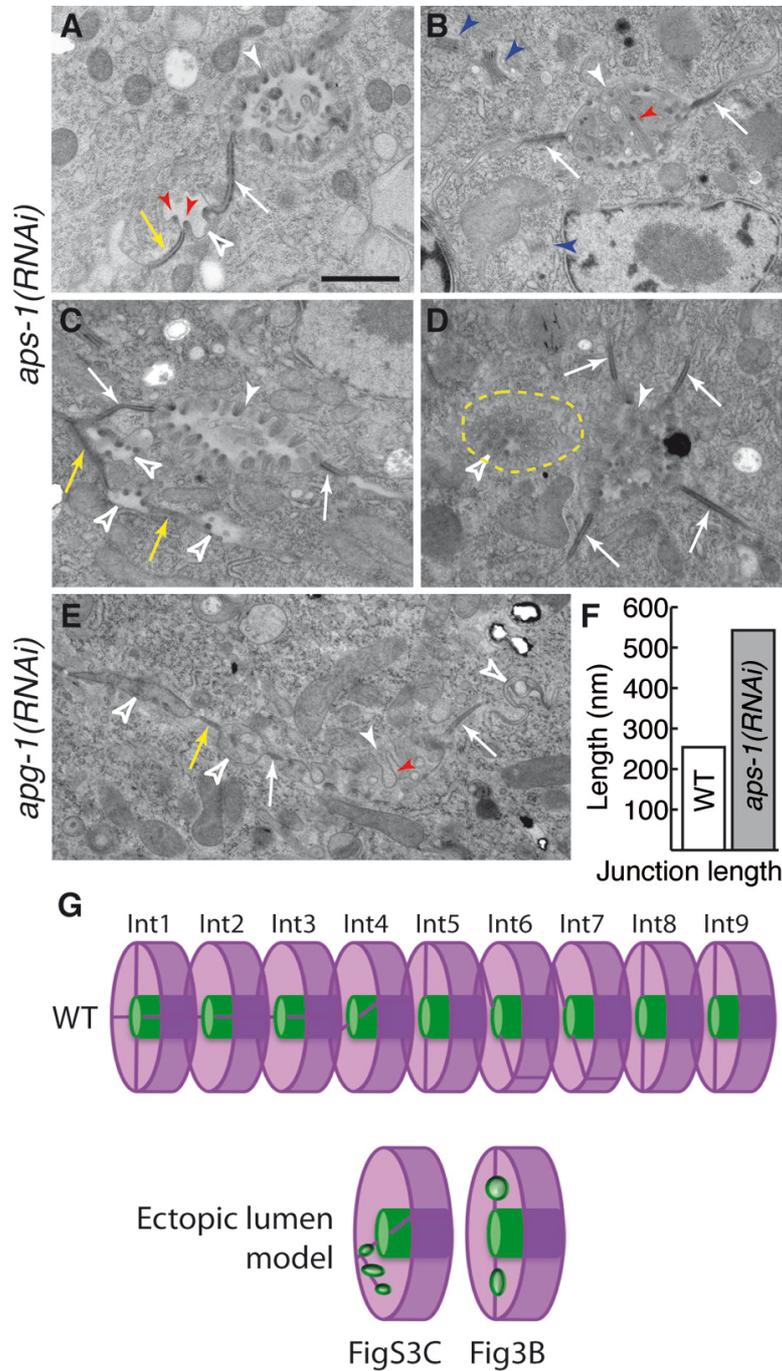


Figure S3: EM analysis of AP-1 depletion in intestinal cells

A-D) Four sections show the intestinal ultrastructure of different *aps-1(RNAi)* 3-fold stage embryos. **A)** A normal lumen (white arrowhead), an elongated junction (white arrow) followed by an ectopic lumen (empty arrowhead) and a second junction (yellow arrow). Note that microvilli are visible in the ectopic lumen (red arrowheads). **B)** An abnormally long microvillus is visible (red arrowhead) in the lumen (white arrowhead). Note that Golgi (blue arrowheads) look normal. **C)** Three ectopic lumens are visible (empty arrowheads) separated by ectopic junctions (yellow arrows). **D)** Elongated junctions (white arrows) and one large ectopic lumen with cross-sectioned microvilli (empty arrowhead inside the yellow dotted line) can be observed. **E)** Section through the intestine of a 3-fold stage *apg-1(RNAi)* embryo showing three ectopic lumens (empty arrowheads), ectopic junction (yellow arrow) and disorganised microvilli (red arrowhead) in the main lumen (white arrowhead). **F)** Average junction length in intestinal cells. **G)** A 3D model of a normal (upper panel) and affected (lower panel) intestine. The two sections correspond to micrographs shown in **Fig3C** and **Fig3B**. Scale bar represents 2 μ m.

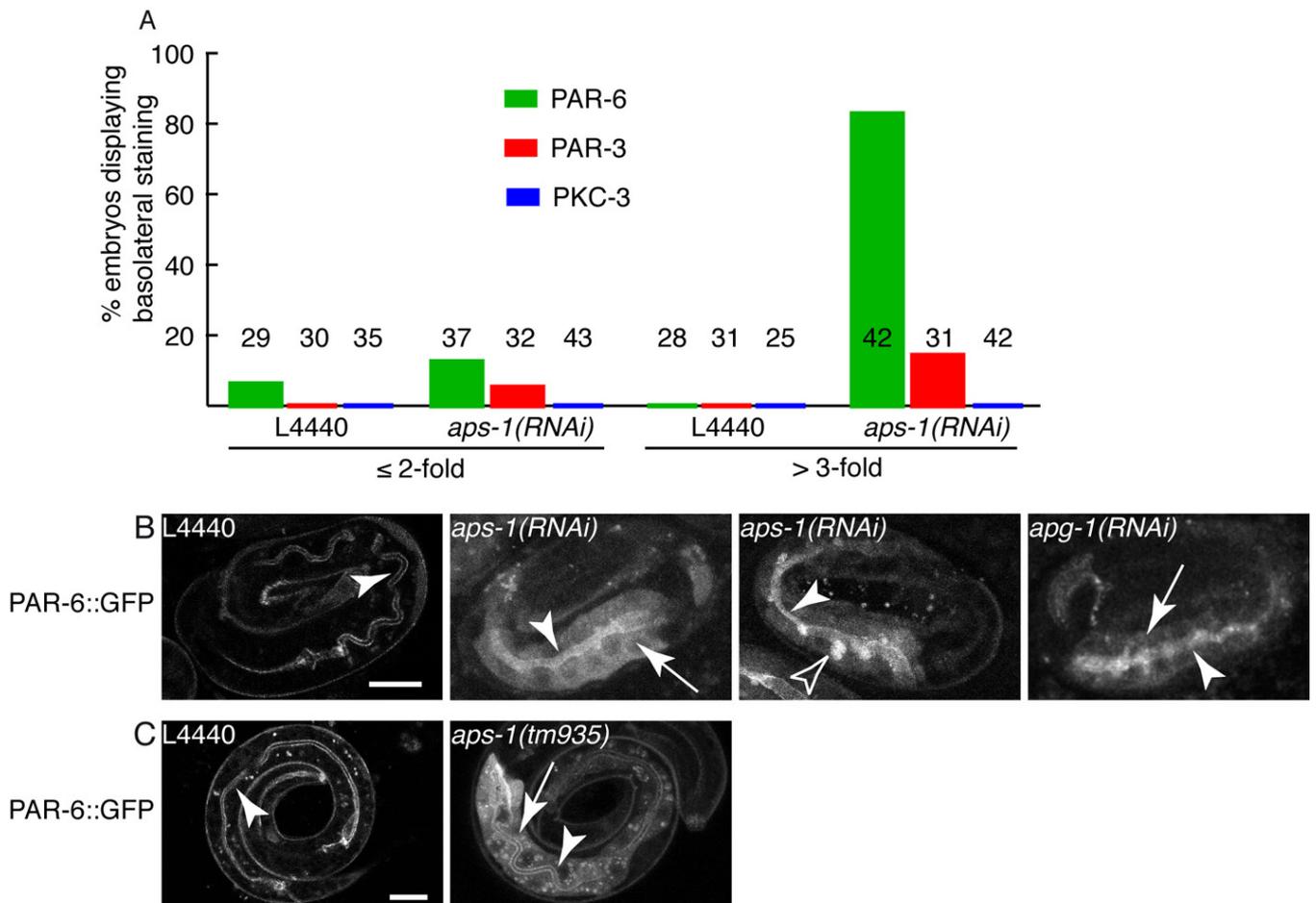


Figure S4: Quantification and validation of the PAR-6 mislocalisation

A) Percentage of embryos displaying robust lateral staining as assessed by direct observation. Only 3-fold stage *aps-1(RNAi)* embryos showed consistent basolateral localisation for PAR-6. Note that about 15% of embryos also display PAR-3 at the lateral membrane. The number of embryos observed for each RNAi condition, time point and marker is indicated. **B)** PAR-6::GFP is localised at the apical pole in 3-fold stage L4440 embryos (left panel, arrowhead). It is visible in the cytoplasm (arrow) and in lateral patches (empty arrowhead) in 3-fold stage *aps-1(RNAi)* embryos. PAR-6::GFP is also mislocalised in *apg-1(RNAi)* 3-fold stage embryos (right panel, arrow). **C)** PAR-6::GFP accumulates in the cytoplasm in *aps-1(tm935)* larvae (arrow).

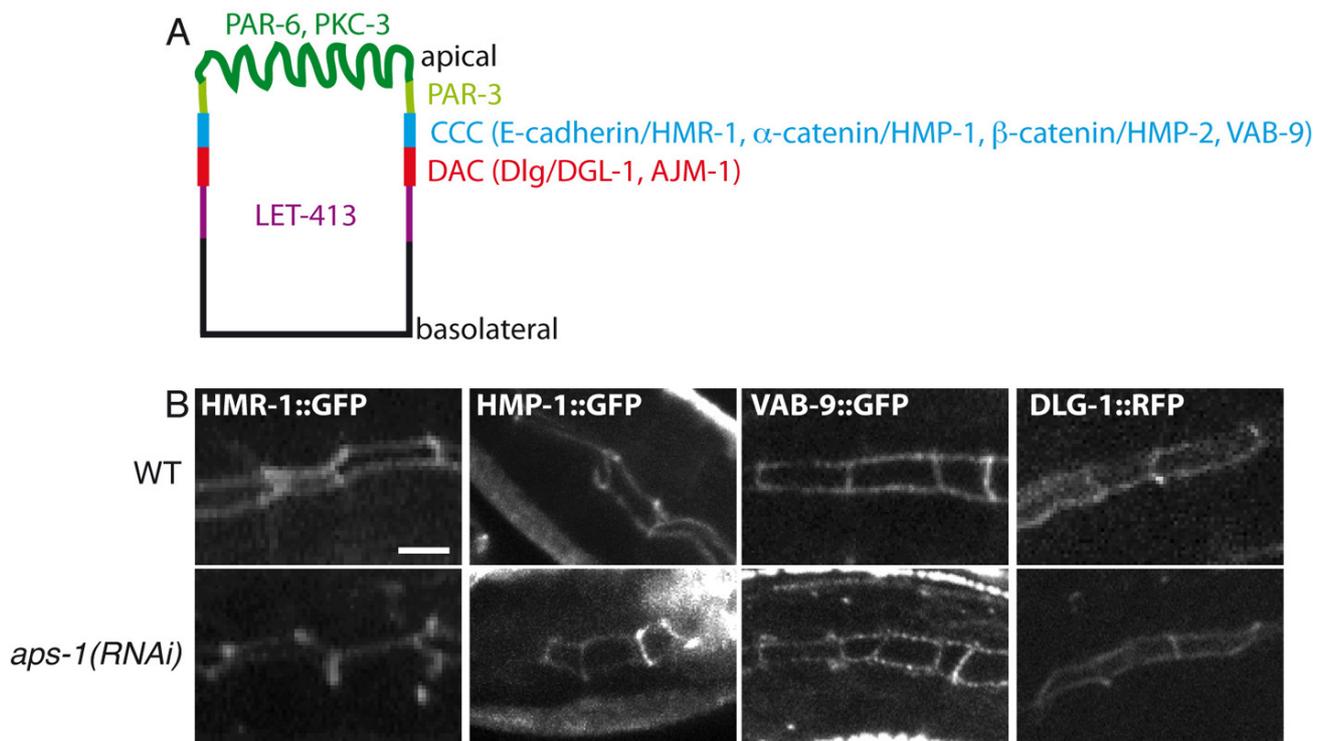


Figure S5: Junction markers are correctly localised in *aps-1(RNAi)* embryonic intestinal cells

A) Cartoon of a typical intestinal cell with components of the CCC and DAC. B) Close up views of junction markers in intestinal cells in 3-fold stage embryos. All markers display a normal belt-like localisation. Note that these markers can also stain ectopic lumens (see Fig4E). Scale bar represents 2 μ m (B).

STRAINS

FL33 <i>apg-1(tm1249)/+</i> (outcrossed 5 times)	
FL35 <i>dfEx1[aps-1::gfp + rol-6(su1006)]</i>	
FL39 <i>aps-1(tm935)/+ dfEx1[aps-1::gfp + rol-6(su1006)]</i>	
FL80 <i>aps-1(tm935)/+; [unc-119(ed3) III; zuls77[par-6::PAR-6::GFP; unc-119(+)]</i>	
FL82 <i>aps-1(tm935)/+</i> (outcrossed 6 times)	
FS254 <i>slcf-1(tm2258); Exfs254[slcf-1::gfp]</i>	Mouchiroud et al, 2010
KK944 <i>itIs164[Ppie-1::GFP::PAR-6(CM2) unc-119(+)]; unc-119(ed4) III.</i>	Aceto et al, 2006
KWN246 <i>pha-1(e2123) III, rnyEx133[opt-2(aa1-412)::GFP] + pha-1(+)]</i>	CGC
JJ1136 <i>unc-119(e2498) III; zuEx24[unc-119(+) hmp-1::GFP]</i>	Koppen et al, 2001
JJ1555 <i>zuls73[par-3p::PAR-3::GFP; unc-119(+)]; unc-119(ed3)</i>	Achilleos et al, 2010
JJ1579 <i>[unc-119(ed3) III; zuls77[par-6::PAR-6::GFP; unc-119(+)]</i>	Gift from J Nance
ML656 <i>let-253(mn181) unc-4(e120)/ mnC1 dpy-10(e128) unc-52(e444) II; mcEx205[nhx-2::gfp; pRF4]</i>	Gift from M Labouesse
ML1617 <i>mcls97[hmr-1::gfp]</i>	Gift from M Labouesse
ML1651 <i>unc-119(ed3) III; mcls46[dlg-1::rfp; unc-119(+)]</i>	Gift from M Labouesse
RB1011 <i>crb-1(ok931)</i>	CGC
ST6 <i>eat-20(nc4)</i>	CGC
ST101 <i>ncls1[eat-20::GFP + pRF4(rol-6(su1006))]</i>	CGC
SU131 <i>jcls11[vab-9::gfp + rol-6(su1006)]</i>	Simske et al, 2003
VC1417 <i>tag-117(gk218)</i>	CGC
VC1966 <i>apm-1(ok2578) I/hT2[bli-4(e937) let-?(q782) qIs48](I;III)</i>	CGC
ZU13 <i>[pie-1::GFP::PAR-6; unc-119(+)]; unc-119(ed3) III</i>	Pacquelet et al, 2008

Laius

Je présente ici une première version de cet article en cours de préparation. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour qu'il soit finalisé. En particulier la localisation de HMR-1::GFP dans les larves (Fig4C-I) doit être positionnée par rapport à un marqueur de l'autre complexe jonctionnel (DLG-1::RFP).

II. AP-1 est requis pour l'adhésion des cellules épithéliales de l'épiderme chez *C. elegans*.

II.1 Objectifs de l'article

Le complexe adaptateur pour la clathrine est essentiel au cours du développement embryonnaire de plusieurs organismes modèles comme la souris, la drosophile ou encore *C. elegans* (Meyer et al., 2000 ; Shim et al., 2000 ; Benhra et al., 2011). Cependant, aucune étude n'a encore révélé la cause cellulaire ou sub-cellulaire de cette létalité embryonnaire.

Le défaut de polarité que nous avons observé dans l'épithélium intestinal déficient pour AP-1 n'est probablement pas responsable de cette létalité. En effet, dans cet épithélium tubulaire, les cellules restent jointives et le tissu n'est pas sévèrement désorganisé en l'absence d'AP-1 et l'embryon peut se développer en l'absence de cellules intestinales (Wormbook).

Nous avons alors décidé d'examiner l'intégrité du muscle et du tissu épithélial de l'épiderme. Au cours du processus d'élongation, les cellules épidermales sont soumises à des tensions mécaniques musculaires, nécessaires au remodelage des jonctions cellulaires. La réalisation de ce processus biologique nécessite une cohésion solide entre les cellules épidermales et par conséquent un établissement et un maintien des jonctions cellulaires mais aussi leur remodelage. Le rôle du trafic est donc essentiel. C'est cet aspect que nous avons regardé à travers la localisation des protéines composant les jonctions cellulaires mais aussi grâce à la microscopie électronique. Cela nous a permis de comprendre pourquoi les embryons déficients pour AP-1 meurent au stade d'élongation 3-fold.

II.2 Résultats majeurs

L'inhibition d'AP-1 n'induit pas de défauts musculaires. La perte de fonction du complexe AP-1 par RNAi contre *aps-1*, *apg-1* ou la déplétion simultanée des sous-unités μ -*apm-1* et μ -*unc-101* induisent une létalité embryonnaire au stade 3-fold. L'observation directe au DIC des embryons déficients pour AP-1 montre que ces embryons sont capables de mouvements dans leurs coquilles. Le perlécan UNC-52, sécrété à la membrane basale par l'épiderme est essentiel pour l'élongation et l'attachement du muscle avec l'hypoderme (Rogalski et al., 1995). Dans les embryons déficients pour AP-1, la localisation d'UNC-52 n'est pas altérée. Enfin, l'analyse ultrastructurale de ces embryons n'a pas révélé de défauts évidents du tissu musculaire.

Les embryons *aps-1* ou *apg-1* présentent des débris cellulaires dans la coquille. Les embryons *aps-1* ou *apg-1* montrent une accumulation de débris cellulaires qui « flottent » dans l'espace entre le ver et la coquille visibles en lumière blanche polarisée DIC. Ces débris sont également visibles en microscopie électronique.

AP-1 contrôle l'adhésion des cellules épidermales. En analysant la souche exprimant le marqueur épidermal apical CHE-14::GFP, nous avons constaté que ces débris étaient positifs pour ce marqueur qui est normalement exprimé dans l'épiderme latéral mais pas dans le pharynx ni dans l'intestin. Or, ces débris sont également retrouvés dans la lumière intestinale, certainement avalés par l'embryon. Ce phénotype démontre clairement que l'intégrité du tissu épidermal est sévèrement compromise lorsqu'on inhibe AP-1 : les cellules ne sont plus cohésives.

AP-1 est requis pour le maintien des jonctions apicales. Afin d'étudier ce défaut d'adhésion, nous avons focalisé nos recherches sur l'établissement et le maintien des jonctions cellulaires apicales. Nous avons ainsi constaté que la mise en place de celles-ci n'est pas affectée dans les embryons 2-fold déficients pour AP-1. Cependant, l'analyse des embryons 3-fold a révélé une délocalisation du complexe cadhérine-caténine (CCC) à la membrane baso-latérale. Dans les embryons déficients pour AP-1, bien que la cadhérine HMR-1, l' α -caténine HMP-1 et la claudine VAB-9 forment une ceinture jonctionnelle apicale comparable au sauvage, une localisation ectopique à la membrane basolatérale est également observée. Nous avons ensuite analysé le complexe DAC et nous avons montré que dans l'embryon 3-fold déficient pour AP-1, les deux composants de ce complexe se localisent à la membrane apicale mais s'accumulent également sous forme de ponctuations cytoplasmiques.

L'inhibition d'AP-1 affecte dramatiquement les jonctions cellulaires et induit une perte d'adhérence et de polarité. L'analyse des embryons *aps-1* et *apg-1* par microscopie électronique indique que les jonctions ne sont plus restreintes à la membrane subapicale mais se positionnent plus latéralement et sont plus étendues. La membrane apicale de ces embryons est très souvent irrégulière et on peut noter des renflements cellulaires qui témoignent d'un défaut d'adhésion cellulaire. Le phénotype final que nous observons est une perte totale de jonctions cellulaires, les membranes apicales et basolatérales ne sont plus physiquement séparées, et la protéine transmembranaire normalement apicale CHE-14 diffuse sur toute la membrane.

AP-1 colocalise partiellement avec RAB-11 et contrôle sa localisation. Nos résultats indiquent que dans l'épiderme, AP-1 et RAB-11 sont très proches et on peut parfois observer une colocalisation partielle. Nous avons également démontré qu'AP-1 contrôle la localisation de RAB-11.

The clathrin adaptor complex AP-1 is required for cell-cell adhesion in the *C. elegans* epidermis

Massiullah Shafaq-zadah^{1,2,3}, Raghida Damaj^{1,2,3}, Lysiane Brocard^{1,2,3,†} and Grégoire Michaux^{1,2,3}

¹ INSERM Avenir group, F-35043 Rennes, France

² CNRS, UMR6061, Institut de Génétique et Développement de Rennes, F-35043 Rennes, France

³ Université de Rennes 1, UEB, IFR140, Faculté de Médecine, F-35043 Rennes, France

† present address: IBVM, INRA, F-33550 Villenave d'Ornon, France

Corresponding author: Grégoire Michaux

Tel: (00 33) -2 2323 4775; *email:* gmichaux@univ-rennes1.fr

Running title: AP-1 role in cell-cell adhesion

Keywords: Epithelial polarity, membrane traffic, E-cadherin, AP-1, *C. elegans*

SUMMARY

The clathrin adaptor complex AP-1 is essential for embryonic development in various organism including *C. elegans*, *Drosophila* and mouse. However the primary cause of this lethality has never been investigated at the subcellular level. In *C. elegans* AP-1 depletion induces embryonic lethality associated with a late arrest during morphogenesis. Using immunofluorescence and electron microscopy we show that apical junctions are strongly affected by the loss of AP-1 in embryos. The components of the cadherin-catenin complex are missorted to the basolateral membrane while the DLG-1/AJM-1 complex accumulates intracellularly. AP-1 depletion ultimately leads to a complete loss of epithelial polarity and adhesion stopping elongation and triggering embryonic lethality. We conclude that cell-cell adhesion and epidermal integrity is directly dependent on AP-1.

INTRODUCTION

Cell-cell adhesion between polarised epithelial cells is essential for tissue integrity in particular during morphogenesis. Several studies have highlighted the role of membrane traffic in junction maintenance and intracellular routes have been defined *in vivo* in various *Drosophila* tissues during morphogenesis. For instance it has been shown that E-cadherin endocytosis requires the clathrin adaptor AP-2 and clathrin itself in the early embryo (Levayer et al., 2011). It was also shown that expressing a dominant-negative form of Rab5 or downregulating dynamin stabilises junctions in the trachea where the recycling step is thought to be controlled by Rab11 (Shaye et al., 2008). Disrupting E-cadherin trafficking by targeting the exocyst complex or the Par-6/aPKC/Cdc42 leads to a loss of cell-cell adhesion in several epithelial tissues (Blankenship et al., 2007; Georgiou et al., 2008; Harris and Tepass, 2008; Langevin et al., 2005; Leibfried et al., 2008). In zebra fish embryos the loss of the *Ap1s1* gene which encodes one of the three AP-1 σ subunits induces a decrease in E-cadherin staining at the plasma membrane (Montpetit et al., 2008). While it is known that E-cadherin is required for morphogenesis in the *C. elegans* embryo the trafficking of E-cadherin has not been investigated in that organism and in a more general manner the role of the trafficking machinery in the maintenance of epithelial junctions is unknown, particularly in the epidermis where junction remodelling is essential for morphogenesis. Importantly while the intracellular routes used by E-cadherin have been well

FL16	[che-14::gfp; dlg-1::rfp]	
FL51	dfEx2[dpy-7p::aps-1::mCherry + dpy-7p::gfp::rab-11 + rol-6(su1006)]	
JJ1136	unc-119(e2498) III; zuEx24[unc-119(+) hmp-1::GFP]	Koppen et al, 2001
ML1617	mcIs97[hmr-1::gfp]	Gift from M Labouesse
ML1651	unc-119(ed3) III; mcIs46[dlg-1::rfp; unc-119(+)]	Gift from M Labouesse
ML?	[abd::gfp; myo-2::gfp]	Gift from M Labouesse
SU93	jcIs1[ajm-1::gfp; unc-29(+); rol-6(su1006)] IV	Koppen et al, 2001
SU131	jcIs11[vab-9::gfp + rol-6(su1006)]	Simske et al, 2003

Table 1

characterised in various systems the sorting mechanisms targeting E-cadherin to its correct localisation are less well understood.

The function of AP-1 has been thoroughly investigated in yeast and in cultured cells but its role in developing organisms is largely uncharacterised albeit essential. The knock-out of the AP-1 γ subunit in mice induces embryonic lethality before implantation (Zizioli et al., 1999) and the loss of AP-1 leads to an early larval arrest in *Drosophila* (Benhra et al., 2011) and late embryonic arrest in *C. elegans* during morphogenesis (Shim et al., 2000). We have recently reported that AP-1 controls both apical and basolateral sorting and is required for the asymmetric apical localisation of CDC-42 and PAR-6 in *C. elegans* intestinal cells (Shafaq-zadah et al., in revision). However intestinal cells are not implicated in *C. elegans* embryonic morphogenesis which depends on epidermal cells and muscles. Morphogenesis consists in a 4-fold elongation lead by the remodelling of cell-cell junctions in the epidermis. Mutations affecting junctional proteins including E-cadherin or α / β -catenins induce various defects in morphogenesis mainly during ventral enclosure and early elongation. From the 2-fold stage underlying muscles also participate to the elongation process (Williams and Waterston, 1994). AP-1 depleted embryos arrest at the 3-fold stage and we decided to investigate the likely cause of this phenotype. Our results demonstrate that AP-1 is required for cell-cell adhesion and controls the apical localisation of E-cadherin in epidermal epithelial cells.

MATERIAL AND METHODS

Genetics

C. elegans strains were maintained and crossed as described (Brenner, 1974). The strains used in this study are shown in Table 1.

Plasmid construction

The *aps-1::gfp* construct was generated as described (Shafaq-zadah et al., in revision). The epidermal *aps-1::mCherry* construct was generated using the Multisite Gateway system (Invitrogen). The genomic *aps-1* ORF was placed under the control of *dpy-7* promoter and

followed by the *mCherry* gene fused in frame and followed by the *unc-54* 3'UTR. A similar strategy was used to generate the epidermal *gfp::rab-11* construct. Briefly the epidermal *aps-1::mCherry* construct was generated by making three donor vectors: *dpy-7* promoter, *aps-1* genomic sequence, *mCherry::unc-54* 3'UTR (by PCR fusion). The epidermal *gfp::rab-11* construct was generated by making three donor vectors: *dpy-7* promoter fused to GFP (by PCR fusion), *rab-11* genomic sequence, *unc-54* 3'UTR.

RNAi

To observe embryonic phenotypes RNAi was performed on L4 larvae or young adults by feeding as described using the Ahringer-Source BioScience library (Fire et al., 1998; Kamath and Ahringer, 2003). Animals were fed for 48h before transferring them to a fresh RNAi plate. Most phenotypes were recorded 15-18h later at a time where embryos were still alive as assessed by Nomarski microscopy; some late phenotypes were recorded up to 48h later as stated in the results. For electron microscopy 9-11h old embryos were used to detect primary defects. RNAi against *aps-1* or *apg-1* induces a highly penetrant 2.5/3-fold embryonic arrest and controls for efficiency and specificity of RNAi experiments have been reported previously (Shafaq-zadah et al., in revision). To observe larval phenotypes RNAi was performed on L1 larvae and phenotypes recorded between 24 and 72h later depending on the severity of the RNAi effect. The penetrance of all phenotypes described following RNAi is well above 80% unless otherwise stated.

Immunostaining

Fixation of embryos was performed as described using the freeze-cack methanol protocol (Leung et al., 1999). We used the monoclonal anti-AJM-1 MH27 (1/50) (Francis and Waterston, 1991) and anti-PAR-3 P4A1 (1/50) (Nance et al., 2003) antibodies from DSHB (University of Iowa, USA) and the anti-LRP-1 (1/200) (Yochem et al., 1999) generously given by Simon Tuck. Anti-PAR-6 (1/50) (Labbe et al., 2006) and anti-PKC-3 (1/1000) (Sugiyama et al., 2008) rabbit antibodies were generously given by Monica Gotta and Shigeo Ohno respectively. Alexa Fluor 488 or 532 antibodies (Invitrogen) were used as secondary antibodies.

Confocal observations

Observations were performed using a Leica (Wetzlar, Germany) SPE confocal equipped with a 63X objective (LAS AF software) or a spinning disk system (Yokogawa CSU-X1 spinning head,

Roper CoolSNAP HQ2 camera and Metamorph software). All images were examined and assembled using ImageJ 1.43 and Adobe Photoshop CS3 10.0.

Electron microscopy

For electron microscopy, control and RNAi embryos were let to develop for 9-11 hours (3- to 4-fold embryos) before fixation by High Pressure Freezing with an EMPACT-2 (Leica, Vienna, Austria) followed by Freeze Substitution with an AFS (Leica, Vienna, Austria) as described (Liegeois et al., 2006). Ultrathin sections were obtained with a Leica Ultracut ultramicrotome. Sections were observed on a Philips CM12 with a Gatan Orius 1000 or a Jeol 100CX2 with a Gatan Orius 200.

Junction length or detachment from the apical pole were quantified as follow: each embryo was sectioned every 5-7 μ m to ensure that different cells were observed in different 5-7 μ m portions. We then used only one section of high quality per portion for each embryo to measure electron dense structures (junctions). Measurements were performed on 12 junctions from 4 different control embryos and 16 junctions from 6 different *aps-1(RNAi)* embryos for 3-fold embryos. An identical approach was used to quantify the number of MVB/lysosomes in epidermal seam cells and in the intestine: we counted all the organelles containing internal vesicles or membrane, excluding mitochondria which have a very different morphology. We observed 9/12 cells from 4 different control embryos and 15/30 cells from 6 different *aps-1(RNAi)* or *apg-1(RNAi)* embryos for epidermal/intestinal cells.

Immuno-electron microscopy was performed as described (Liegeois et al., 2006). The anti-AJM-1 antibody MH27 (DSHB, University of Iowa) was used at a 1/10 dilution and then detected using 5-nm gold particles coupled to a goat anti-mouse antibody (GMHL5, Oxford instruments).

RESULTS AND DISCUSSION

AP-1 depletion induces a loss of cell-cell adhesion

To investigate the loss of function phenotype of AP-1 we targeted the *aps-1* and *apg-1* genes encoding the AP-1 σ and γ subunit by RNAi. As reported previously (Shafaq-zadah et al., in revision; Shim et al., 2000) RNAi against the σ , γ or both μ subunits induces an embryonic arrest during elongation at the 3-fold stage. Elongation is a morphogenetic process driven by lateral

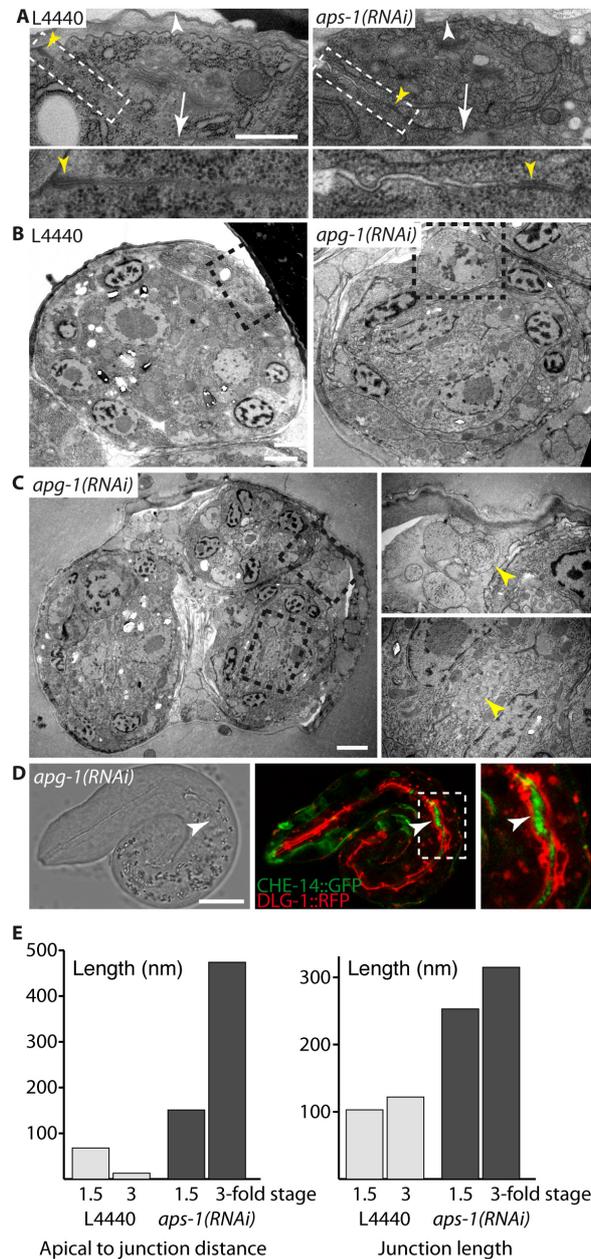


Figure 1: AP-1 loss of function induces a loss of cell-cell adhesion

A) Ultrastructure of an epidermal seam cell in 3-fold stage embryos. The apical pole is at the top (white arrowhead) and the basal membrane at the bottom (white arrow). The electron dense structure marking the junction (yellow arrowhead, see the enlarged area in the lower panels) is in subapical position in control embryos (L4440) and displaced along the lateral membrane in *aps-1(RNAi)* embryos. **B)** EM transverse section of a complete fold from a 3-fold stage embryo. In control embryos the body presents a regular circular shape while in an *apg-1(RNAi)* embryo (right panel) a lateral seam cell (dotted black box on the left, enlarged in the right panel) is bulging. **C)** EM transverse section of a complete a complete 3-fold stage *apg-1(RNAi)* embryo. The dotted boxes in the left panel are enlarged in the right panels to show cellular debris trapped inside the eggshell (upper panel, arrowhead) and the intestinal lumen (lower panel). **D)** *apg-1(RNAi)* young larva; left panel: DIC. The epidermal CHE-14 marker (green) is visible in the intestinal lumen (white arrowhead) determined by the junction marker DLG-1 (red). These epidermal cellular debris were swallowed during late embryogenesis before hatching. CHE-14 is never visible in the intestine of control worms (not shown). **E)** Quantification of junction defects by EM in 1.5- and 3-fold stage embryos. Junctions are detached from the apical pole (left graph) and longer (right graph) in *aps-1(RNAi)* embryos.

Scale bar is 1mm (A-B), 5mm (C), 10mm (D). The dotted boxes indicate enlarged insets.

epidermal cells and muscles and developmental arrests during elongation fall in three categories. The first one happens early before the 2-fold stage and is characterised by defects in junction or epithelial polarity establishment (Chisholm and Hardin, 2005). The second group of phenotype is known as the Pat (paralysed at 2-fold) phenotype: embryos are arrested at the 2-fold stage due to defects in muscles or in hemi-desmosome-like fibrous organelles mediating attachment of muscles to the epidermis and cuticle thus preventing the muscle-dependent step of elongation (Chisholm and Hardin, 2005). Finally very few genes have been reported as inducing a late arrest beyond the 2-fold stage. Direct observation of *aps-1(RNAi)* or *apg-1(RNAi)* arrested embryos by DIC showed that they were moving normally suggesting that muscles cells and fibrous organelles are intact. However we also observed cellular debris floating in the eggshell suggesting possible defect in cell-cell adhesion (Shafaq-zadah et al., in revision; Shim et al., 2000).

To further characterise the phenotype of 3-fold stage arrested embryos we used transmission electron microscopy. The effect of AP-1 depletion by RNAi in the intestine has already been reported (Shafaq-zadah et al., in revision). Consistent with the normal mobility of embryos we found no morphological defects in muscles. We next observed epidermal cells, focussing mainly on the lateral seam cells which are essential for elongation (Chisholm and Hardin, 2005). We first examined the internal organisation of epidermal cells without identifying any gross defects in nuclei, mitochondria, ER, Golgi, endosomes and lysosomes (FigS1A). We found a small increase in the number of endo-lysosomes (0.7 and 1.1 per cell for control and *aps-1(RNAi)* respectively) but this phenotype was much more pronounced in intestinal cells (0.4 to 3.5 per cell respectively). The cuticle was sometimes thin and irregular but looked mostly normal with identifiable alae, a hallmark of cuticle secretion by lateral seam cells, and apically secreted exosomes (Liegeois et al., 2006) were not affected (FigS1A). We next examined the junctions and found that they were not at their normal subapical localisation but systematically positioned more laterally and were more elongated than in WT embryos (Fig1A, E); in rare instances junctions were absent, discontinuous or the electron dense structure was only visible on one side of the plasma membrane (FigS1B). Secondly the apical pole was irregular and sometimes clearly bulging from the rest of the body suggesting a loss of cell-cell adhesion (Fig1B, lateral seam cell in dotted box). We also systematically observed cellular debris between the eggshell and the embryo itself as well as inside the intestine lumen (Fig1C), debris which were not observed in control embryos (Fig1B, left panel). Because cell-cell adhesion is not affected in intestinal cells we hypothesised that these debris could be parts of epidermal cells detaching from the body and swallowed by the

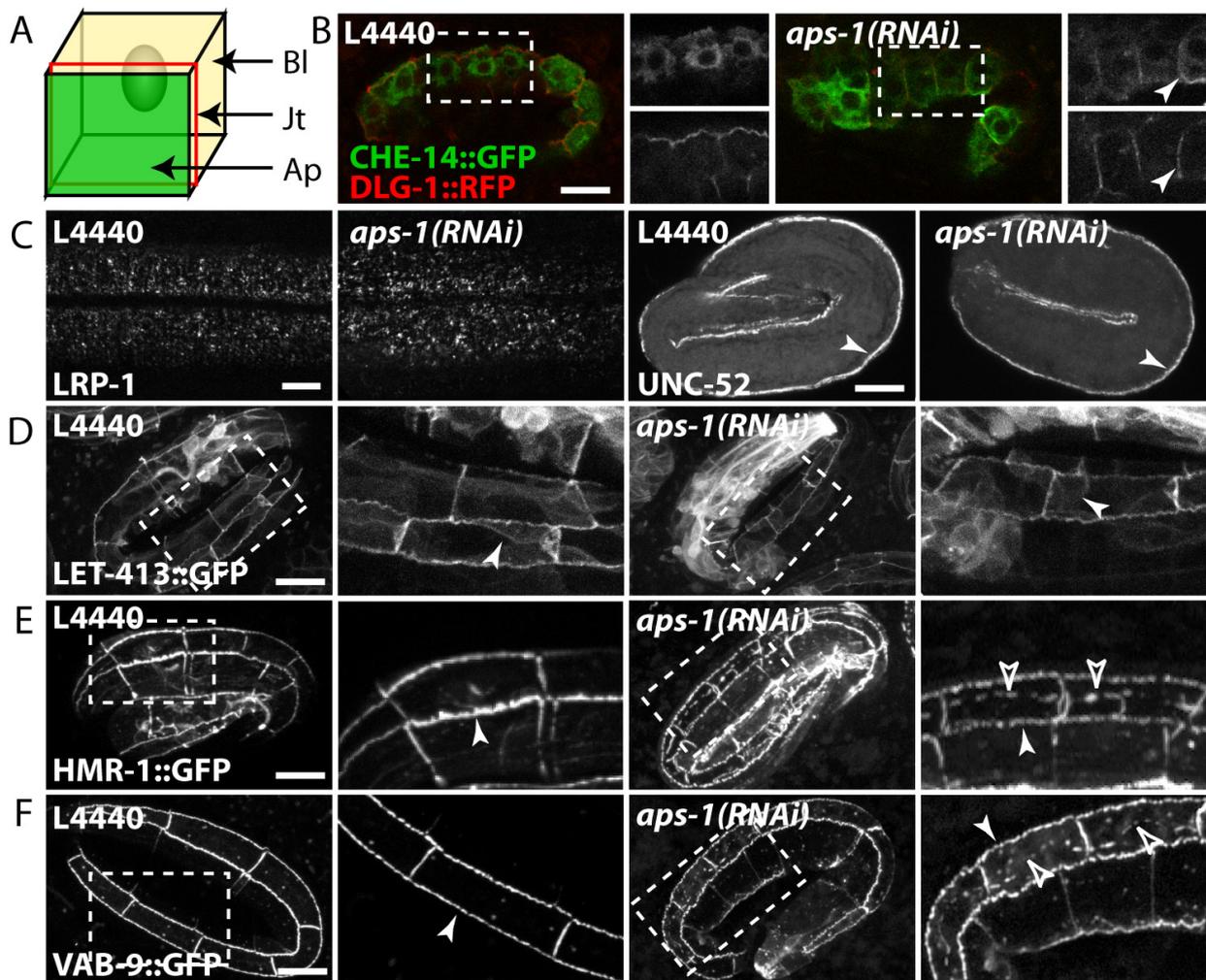


Figure 2: AP-1 is required for HMR-1 apical localisation

A) Cartoon of a lateral seam cell as seen from above in all panels except in C were the right panels show a lateral view. B-F) Dotted boxes are enlarged in panels on the right. B) Control and *aps-1(RNAi)* embryos expressing the apical marker CHE-14::GFP and the junction marker DLG-1::RFP. A single basolateral focal plane is shown at the level of the nucleus (black holes in the middle of the CHE-14 signal). In control embryos this focal plane is below the junction belt (lower panel) and no CHE-14 is visible between cells (upper panel). In *aps-1(RNAi)* embryos a lateral CHE-14 localisation (upper panel, arrowhead) and the junction staining (lower panel, arrowhead) can be observed. C) Right panels: control and *aps-1(RNAi)* larvae were stained with an anti-LRP-1 antibody. The apical punctate localisation was similar in both conditions. Larvae were used because LRP-1 is not expressed in 3-fold stage embryos. Left panels: control and *aps-1(RNAi)* embryos were stained with an anti-UNC-52 antibody. The extracellular localisation after basolateral secretion of this marker (arrowhead) was not affected. D) Control and *aps-1(RNAi)* embryos expressing a LET-413::GFP fusion protein were observed at the 3-fold stage; the basolateral localisation of LET-413 (arrowhead) is not affected. E) Control and *aps-1(RNAi)* embryos expressing a HMR-1::GFP fusion protein were observed at the 3-fold stage. Although a normal belt-like localisation is visible in control and *aps-1(RNAi)* embryos (white arrowhead), basal staining can also be seen only in *aps-1(RNAi)* embryos (empty arrowhead). F) Control and *aps-1(RNAi)* embryos expressing a VAB-9::GFP fusion protein were observed at the 3-fold stage. Although a normal belt-like localisation is visible in control and *aps-1(RNAi)* embryos (white arrowhead), basal staining can also be seen only in *aps-1(RNAi)* embryos (empty arrowhead). Scale bar is 10mm.

embryo thus filling up the intestinal lumen. To test this hypothesis we used a strain expressing the apical marker CHE-14::GFP which is expressed in a subset of ectodermal cells including lateral seam cells (Michaux et al., 2000). We found that the debris were indeed positive for CHE-14::GFP (not shown). More surprisingly these fluorescent debris were also found inside the intestinal lumen although CHE-14 is not expressed in the pharynx nor the intestine (Fig1D). We concluded that epidermal cellular debris detaching from epidermal seam cells were swallowed by embryos and found in the intestine.

To determine the timing of the onset of the junction defect we also examined 1.5- to 2-fold stage embryos. We found that defects in junction position and length were already visible early during elongation but this phenotype became more pronounced at the 3-fold stage (Fig1E). These data demonstrate that the AP-1 complex is required for the maintenance of cell-cell adhesion in *C. elegans* epidermal cells.

AP-1 controls the sorting of the E-cadherin-catenin complex

We previously reported a function for AP-1 in sorting both apical and basolateral proteins in the intestine (Shafaq-zadah et al., in revision). To test the function of AP-1 in apico-basal sorting in epidermal cells we examined the localisation of several apical (CHE-14, LRP-1, PTC-3) or basolateral (UNC-52 which is secreted and LET-413) markers without finding sorting defects (Fig2B-D and data not shown). However we noticed that CHE-14::GFP becomes visible in a subapical manner at the lateral membrane while being still apical to the junctional marker (Fig2B top right panel) confirming EM observations that apical junctions are found at a lower position along the lateral membrane than in WT. This result is very different from what we observed in the intestine where junctions are intact but markers can be missorted and confirms that AP-1 controls only a subset of apico-basal sorting routes (Shafaq-zadah et al., in revision). Having found that the electron-dense junctions were strongly affected following RNAi against *aps-1* or *apg-1* we decided to carefully examine the localisation of epidermal junction components which fall in two complexes, the cadherin/catenin complex (CCC) and the DLG-1/AJM-1 complex (DAC). In *C. elegans* the CCC is localised subapically. At mid-elongation we did not identify any defect in the localisation of junction components (FigS2). Although a weak HMR-1::GFP (E-cadherin::GFP) signal was visible at the basolateral membrane, a similar observation was made in control embryos. However at the 3-fold stage we found that the transmembrane CCC components HMR-1 and VAB-9 (claudin) were not only visible at their normal belt-like subapical localisation but also in a more basal manner likely corresponding to the basal cortex of lateral seam cells (Fig2E-F); a similar observation was made with HMP-1 (a-catenin; not shown). Further demonstration that HMR-1 is relocalised to the basolateral cortex upon AP-1 depletion

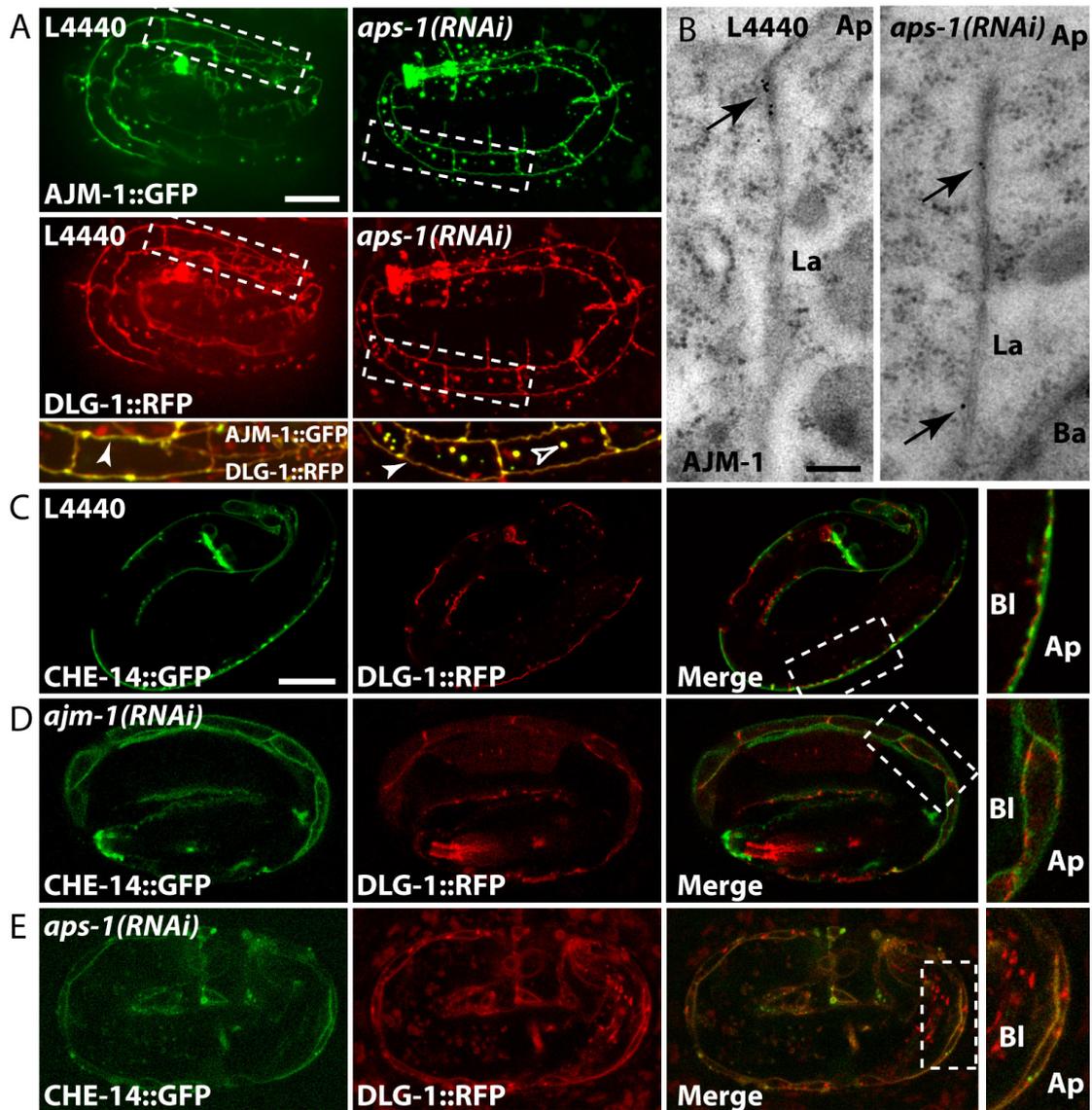


Figure 3: AP-1 depletion induces a complete loss of polarity

A) Control and *aps-1(RNAi)* embryos expressing AJM-1::GFP and DLG-1::RFP fusion proteins were observed at the 3-fold stage. The lower panels show merge pictures. A normal belt-like localisation is visible in control and *aps-1(RNAi)* embryos (white arrowhead), but intracellular colocalisation can be seen only in *aps-1(RNAi)* embryos (empty arrowhead). **B)** Control and *aps-1(RNAi)* embryos were observed at the 3-fold stage by electron microscopy following anti-AJM-1 staining. Gold particles are restricted to a small subapical electron dense structure in control embryos (arrow). The electron dense structure is longer in *aps-1(RNAi)* embryos, detached from the apical pole and a gold particle can be observed in a very basal position. Ap: apical; La: lateral; Ba: basal. **C-E)** Control (**C**), *ajm-1(RNAi)* (**D**) and *aps-1(RNAi)* (**E**) embryos expressing CHE-14::GFP and DLG-1::RFP fusion proteins were observed at the 3-fold stage; *aps-1(RNAi)* embryos were more than 24 hours old to illustrate the terminal phenotype. Lateral views are shown and the right panels display enlargement of epidermal cells with apical on the right (Ap) and basolateral on the left (Bi). CHE-14 is restricted to the apical pole in control embryos but colocalises homogenously at the cortex with DLG-1 in *ajm-1(RNAi)* and *aps-1(RNAi)* embryos. Scale bar is 10µm.

was established in larvae (see below). Confirming an observation already made in intestinal cells, cargos relying on AP-1 for their localisation were not found accumulating intracellularly suggesting a sorting defect rather than a failure to transport these cargos. Consistent with a defective localisation of the CCC we also observed a moderate disorganisation of the actin cytoskeleton (FigS2C). The CCC is composed of two transmembrane proteins, HMR-1 and VAB-9. However the E-cadherin-catenin complex do not require VAB-9 for its proper localisation while this complex controls VAB-9 recruitment (Simske et al., 2003). It is therefore likely that AP-1 controls HMR-1 sorting in the biosynthetic pathway and/or during recycling and future experiments will be necessary to determine how AP-1 and HMR-1 could interact. It is however noteworthy that while there is no dileucine motif in the HMR-1 cytoplasmic tail a YXXF motif can be found and could be recognised by AP-1.

AP-1 is required for the maintenance of apical junctions in the epidermis

The second more lateral junction complex called DAC is defined by DLG-1 (disc large) and AJM-1 (a *C. elegans* specific protein). This complex most likely corresponds to the electron dense structure seen by EM (Koppen et al., 2001). In 3-fold stage embryos recently arrested the belt formed by this complex was not affected by AP-1 knockdown based on fluorescent reporter proteins, immunostaining or immuno-electron microscopy (Fig3A-C). However both DLG-1 and AJM-1 were also found on intracellular punctae. Because these two proteins are cytoplasmic it is unlikely that they are directly dependent on AP-1 for their localisation and this could be a secondary defect. To test the integrity of this junction complex we identified a phenotype specific of the loss of function of the DAC: both CHE-14 and DLG-1 were found localised homogenously at the cortex in *ajm-1(RNAi)* embryos suggesting that the DAC is essential to maintain an efficient diffusion barrier between the apical and the basolateral poles. To test its function we examined *aps-1(RNAi)* embryos 36 to 48 hours after fertilisation and found that CHE-14 and DLG-1 were both colocalising homogenously at the cortex as in *ajm-1(RNAi)* embryos (Fig3D-E). This result demonstrates that epithelial polarity was ultimately completely lost in epidermal cells, a phenotype strikingly different from what was observed in the intestine (Shafaq-zadah et al., in revision). If the final result is similar with respect to homogenous cortical localisation of apical markers the cause for this phenotype is very different. In the epidermis junctions disappear and the diffusion barrier is lost as shown with CHE-14 progressively spreading from the apical pole to the whole cortex while in the intestine junctions are intact but several apical markers are missorted to the basolateral pole.

We previously reported that in the intestine AP-1 is required for the apical localisation of CDC-42 and PAR-6. While the localisation of PAR-6, PAR-3 and PKC-3 was normal in 1.5-fold stage

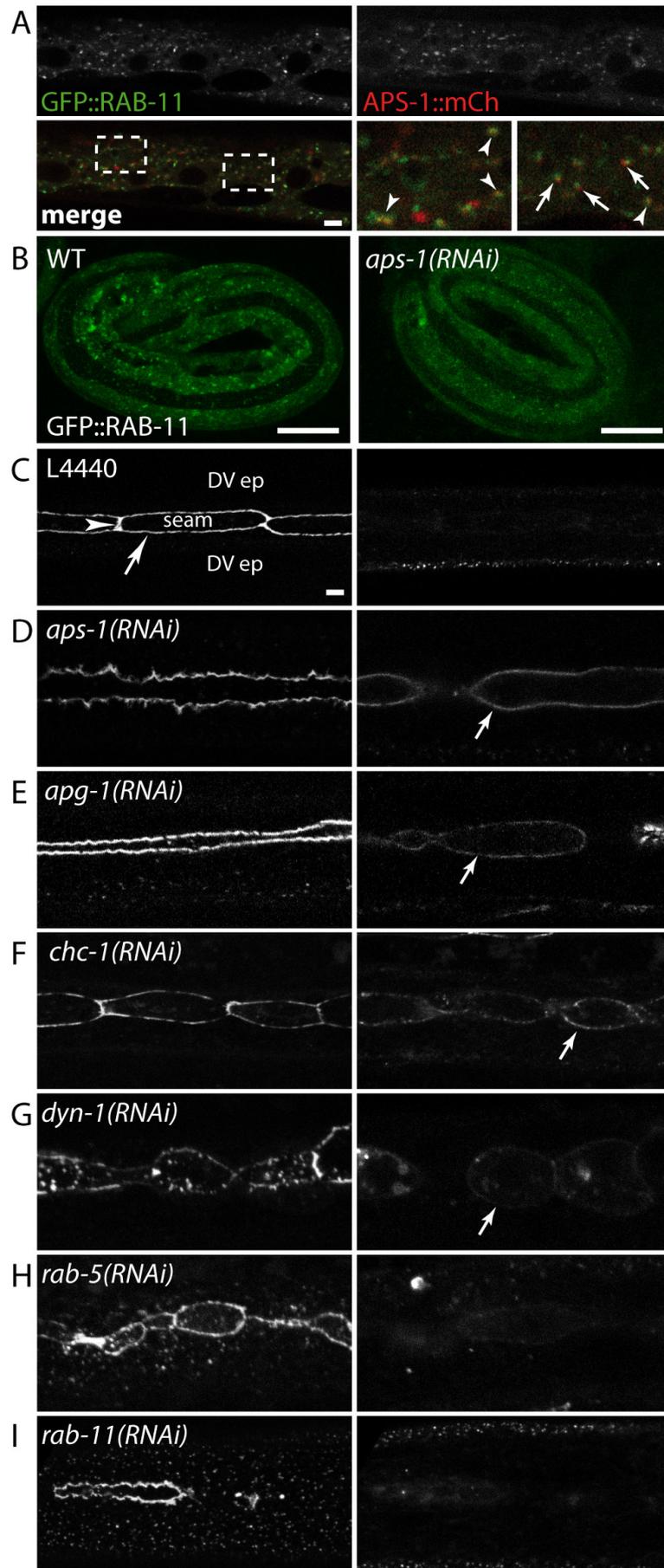


Figure 4: A membrane traffic pathway required for HMR-1 trafficking

A) The two fusion proteins APS-1::mCherry and GFP::RAB-11 were often found closely apposed on vesicular structures. Details of overlapping staining (left inset, arrowheads) or closely apposed structures (right inset, arrows) are shown. **B)** Control and *aps-1(RNAi)* embryos expressing GFP::RAB-11 in the epidermis were observed at the 3-fold stage. There is a significant reduction in the level of RAB-11 punctate staining in *aps-1(RNAi)* embryos. C-I) Larvae expressing HMR-1::GFP were observed 24h to 48h after RNAi treatment. Left panels show confocal sections of an apical view; right panels are confocal sections taken 3mm below the apical section shown on the left in the same larvae. In control larvae (**C**) HMR-1 is only visible in a belt-like pattern in lateral seam cells (seam); junctions are visible between the seam cells and the dorsal and ventral epidermal cells (DV ep, arrow) and between seam cells (arrowhead). In *aps-1(RNAi)* (**D**), *apg-1(RNAi)* (**E**) and *chc-1(RNAi)* (**F**) larvae a clear basolateral signal (arrow) can be observed in the right panels; note that in D and E seam cells have fused and the junctions between seam cells are no longer visible. In *dyn-1(RNAi)* (**G**), *rab-5(RNAi)* (**H**) and *rab-11(RNAi)* (**I**) HMR-1 accumulates inside (G-H) seam cells or in the dorso-ventral hypodermis (**I**). Some cortical basolateral localisation of HMR-1 is visible in *dyn-1(RNAi)* larvae (G, arrow in right panel). Note that in *rab-11(RNAi)* larvae HMR-1 tends to disappear very rapidly following the loss of RAB-11 making it difficult to find intermediate steps. Scale bar is 10mm.

aps-1(RNAi) embryos (FigS3) we could not assess their localisation in older embryos due to the lack of signal: endogenous proteins could not be detected and PAR-6::GFP gives a significant nuclear and cytoplasmic signal in control embryos preventing its precise localisation (not shown). We therefore cannot exclude that like in the intestine PAR-6 could be mislocalised to the basolateral membrane. However if the intestine the basolateral membrane is converted to an apical membrane as shown by the formation of ectopic lumens containing microvilli, there is no such conversion in the epidermis: the cuticle is only secreted towards the apical pole and the perlecan UNC-52 is exclusively secreted at the basal cortex. We therefore propose that AP-1 is required for the maintenance of apical junctions in the epidermis while there is a polarity conversion of the basolateral pole in the intestine, both phenotypes relying on the apical function of AP-1.

A putative HMR-1 recycling pathway

AP-1 is known to localise in the TGN and to be associated with various endosomal structures. To characterise the localisation of AP-1 we co-expressed *gfp::rab-11* together with *aps-1::mCherry* in the epidermis. We found that both proteins were often closely apposed and sometimes colocalised (Fig4A). RAB-11 is associated with recycling endosomes (Ullrich et al, 1996) and AP-1 could therefore sort recycling proteins upstream of RAB-11. Consistently with that hypothesis we found that the GFP::RAB-11 signal was significantly reduced in *aps-1(RNAi)* embryos in the

epidermis (Fig4B) as in the intestine {Shafaq-zadah, in revision #210} suggesting that AP-1 acts upstream of RAB-11.

We next reasoned that if AP-1 controls HMR-1 sorting, other membrane traffic components could be implicated in HMR-1 localisation. Because most essential endocytic proteins are required during early embryogenesis we targeted clathrin (CHC-1), dynamin (DYN-1), RAB-5 and RAB-11 in larvae. We found that they were ultimately all required for the maintenance of the HMR-1 signal; however we only report here the cellular phenotypes observed in cells where HMR-1 was still visible at its belt-like localisation in larvae which displayed a mild phenotype as recorded by DIC. We first confirmed the missorting of HMR-1 to the basolateral membrane following *aps-1* and *apg-1* depletion (Fig4D-E; left panels correspond to the normal localisation and right panels to lateral staining). In *chc-1(RNAi)* larvae HMR-1::GFP was already affected after less than 24h of RNAi treatment, with HMR-1 visible at the basolateral membrane (Fig4F) suggesting that AP-1 could recruit clathrin to control HMR-1 localisation. In *dyn-1(RNAi)* larvae HMR-1 was found accumulating inside epidermal cells and a weak basolateral signal could sometimes be seen suggesting that in normal conditions a transcytosis route is used to recycle mistargeted HMR-1. In *rab-5(RNAi)* larvae HMR-1 was found on punctae throughout the cytoplasm. Finally the depletion of *rab-11* by RNAi induced a rapid loss of HMR-1 signal in most cells. Significantly only clathrin and AP-1 seem to be required for HMR-1 apical sorting. Because dynamin is unlikely to be required for sorting it could be the first step in basolateral to apical transcytosis. The existence of such a route is probably essential to maintain a correct localisation of E-cadherin as was proposed in *Drosophila* {Langevin, 2005 #232}.

Conclusion

We have shown that AP-1 controls the sorting of the E-cadherin-catenin complex and the maintenance of epithelial junctions in *C. elegans* epidermal cells. The late arrest during elongation could be explained by the existence of a transcytotic route used by E-cadherin which could partially compensate the random sorting of E-cadherin. Because the loss of AP-1 induces embryonic lethality in several organisms we propose that this function could reflect an essential role for AP-1 in E-cadherin sorting to the apical membrane in *C. elegans* or to the basolateral membrane in mammals.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Anne Pacquelet and Roland Le Borgne for critical reading of the manuscript. Strains were provided by the CGC (University of Minnesota, USA) and the NBP (Tokyo University, Japan). We thank Monica Gotta, Barth Grant, Jeff Hardin, Michel Labouesse, Jeremy Nance, Shigeo Ohno and Simon Tuck for strains and antibodies. We also thank the Microscopy Rennes Imaging Center (Rennes, France), and the IGBMC Imaging Center (Strasbourg, France). This work was supported by INSERM Avenir and Région Bretagne ACOMB grants R06488NS and 3252, the Ligue contre le Cancer – Région Bretagne, the Fondation pour la Recherche Médicale, Rennes Métropole and Université de Rennes 1.

BIBLIOGRAPHY

- Benhra, N., Lallet, S., Cotton, M., Le Bras, S., Dussert, A. and Le Borgne, R.** (2011). AP-1 Controls the Trafficking of Notch and Sanpodo toward E-Cadherin Junctions in Sensory Organ Precursors. *Curr Biol* **21**, 87-95.
- Blankenship, J. T., Fuller, M. T. and Zallen, J. A.** (2007). The Drosophila homolog of the Exo84 exocyst subunit promotes apical epithelial identity. *J Cell Sci* **120**, 3099-110.
- Brenner, S.** (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Chisholm, A. D. and Hardin, J.** (2005). Epidermal morphogenesis. *WormBook*, 1-22.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Francis, R. and Waterston, R. H.** (1991). Muscle cell attachment in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **114**, 465-79.
- Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J. and Baum, B.** (2008). Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol* **18**, 1631-8.
- Harris, K. P. and Tepass, U.** (2008). Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the Drosophila neuroectoderm through regulation of apical endocytosis. *J Cell Biol* **183**, 1129-43.
- Kamath, R. S. and Ahringer, J.** (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-21.
- Koppen, M., Simske, J. S., Sims, P. A., Firestein, B. L., Hall, D. H., Radice, A. D., Rongo, C. and Hardin, J. D.** (2001). Cooperative regulation of AJM-1 controls junctional integrity in *Caenorhabditis elegans* epithelia. *Nat Cell Biol* **3**, 983-91.
- Langevin, J., Morgan, M. J., Sibarita, J. B., Aresta, S., Murthy, M., Schwarz, T., Camonis, J. and Bellaiche, Y.** (2005). Drosophila exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane. *Dev Cell* **9**, 365-76.
- Leibfried, A., Fricke, R., Morgan, M. J., Bogdan, S. and Bellaiche, Y.** (2008). Drosophila Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis. *Curr Biol* **18**, 1639-48.
- Leung, B., Hermann, G. J. and Priess, J. R.** (1999). Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol* **216**, 114-34.
- Levayer, R., Pelissier-Monier, A. and Lecuit, T.** (2011). Spatial regulation of Dia and Myosin-II by RhoGEF2 controls initiation of E-cadherin endocytosis during epithelial morphogenesis. *Nat Cell Biol* **13**, 529-40.
- Liegeois, S., Benedetto, A., Garnier, J. M., Schwab, Y. and Labouesse, M.** (2006). The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **173**, 949-61.
- Michaux, G., Gansmuller, A., Hindelang, C. and Labouesse, M.** (2000). CHE-14, a protein with a sterol-sensing domain, is required for apical sorting in *C. elegans* ectodermal epithelial cells. *Curr Biol* **10**, 1098-107.
- Montpetit, A., Cote, S., Brustein, E., Drouin, C. A., Lapointe, L., Boudreau, M., Meloche, C., Drouin, R., Hudson, T. J., Drapeau, P. et al.** (2008). Disruption of AP1S1, causing a novel neurocutaneous syndrome, perturbs development of the skin and spinal cord. *PLoS Genet* **4**, e1000296.

Shafaq-zadah, M., Brocard, L., Solari, F. and Michaux, G. (in revision). AP-1 is required for the maintenance of apico-basal polarity in the *C. elegans* intestine.

Shaye, D. D., Casanova, J. and Llimargas, M. (2008). Modulation of intracellular trafficking regulates cell intercalation in the *Drosophila* trachea. *Nat Cell Biol* **10**, 964-70.

Shim, J., Sternberg, P. W. and Lee, J. (2000). Distinct and redundant functions of mu1 medium chains of the AP-1 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **11**, 2743-56.

Simske, J. S., Koppen, M., Sims, P., Hodgkin, J., Yonkof, A. and Hardin, J. (2003). The cell junction protein VAB-9 regulates adhesion and epidermal morphology in *C. elegans*. *Nat Cell Biol* **5**, 619-25.

Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M. and Parton, R. G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* **135**, 913-24.

Williams, B. D. and Waterston, R. H. (1994). Genes critical for muscle development and function in *Caenorhabditis elegans* identified through lethal mutations. *J Cell Biol* **124**, 475-90.

Yochem, J., Tuck, S., Greenwald, I. and Han, M. (1999). A gp330/megalin-related protein is required in the major epidermis of *Caenorhabditis elegans* for completion of molting. *Development* **126**, 597-606.

Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., von Figura, K. and Schu, P. (1999). Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J Biol Chem* **274**, 5385-90.

SUPPLEMENTARY FIGURES

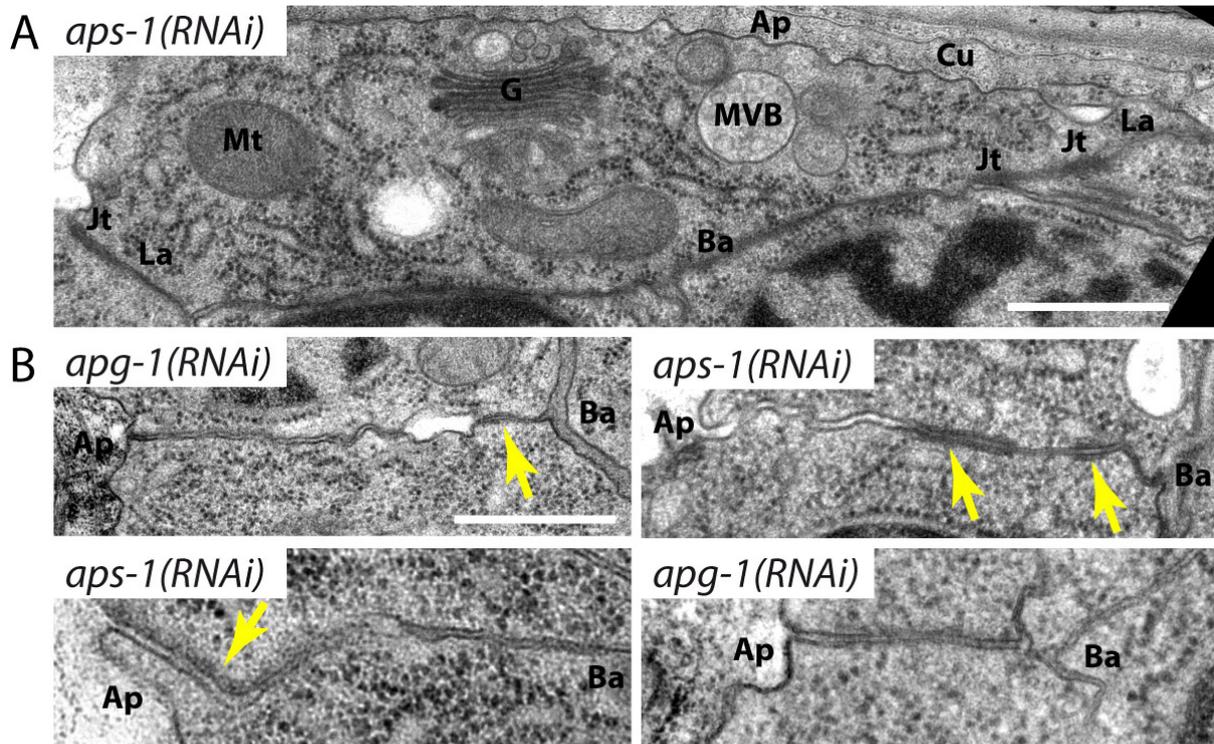


Figure S1: AP-1 is required for junction maintenance

A) Ultrastructure of an epidermal seam cell in a 3-fold stage *aps-1(RNAi)* embryo. The apical pole is at the top (Ap) and the basal membrane at the bottom (Ba); lateral membrane (La) is visible on each side with junctions (Jt; the junction on the right is in a very basal position and interrupted). Mitochondria (Mt), Golgi (G) and light MVB (MVB) are visible and have a normal ultrastructure and the cuticle layer (Cu) is strictly apical. **B)** Junction ultrastructure in 3-fold stage *aps-1(RNAi)* or *apg-1(RNAi)* embryo. Junctions (yellow arrow) can be either very basal (top left), interrupted (top right), visible only on one side of the membrane (bottom left) or not visible at all (bottom right). Scale bar is 1mm.

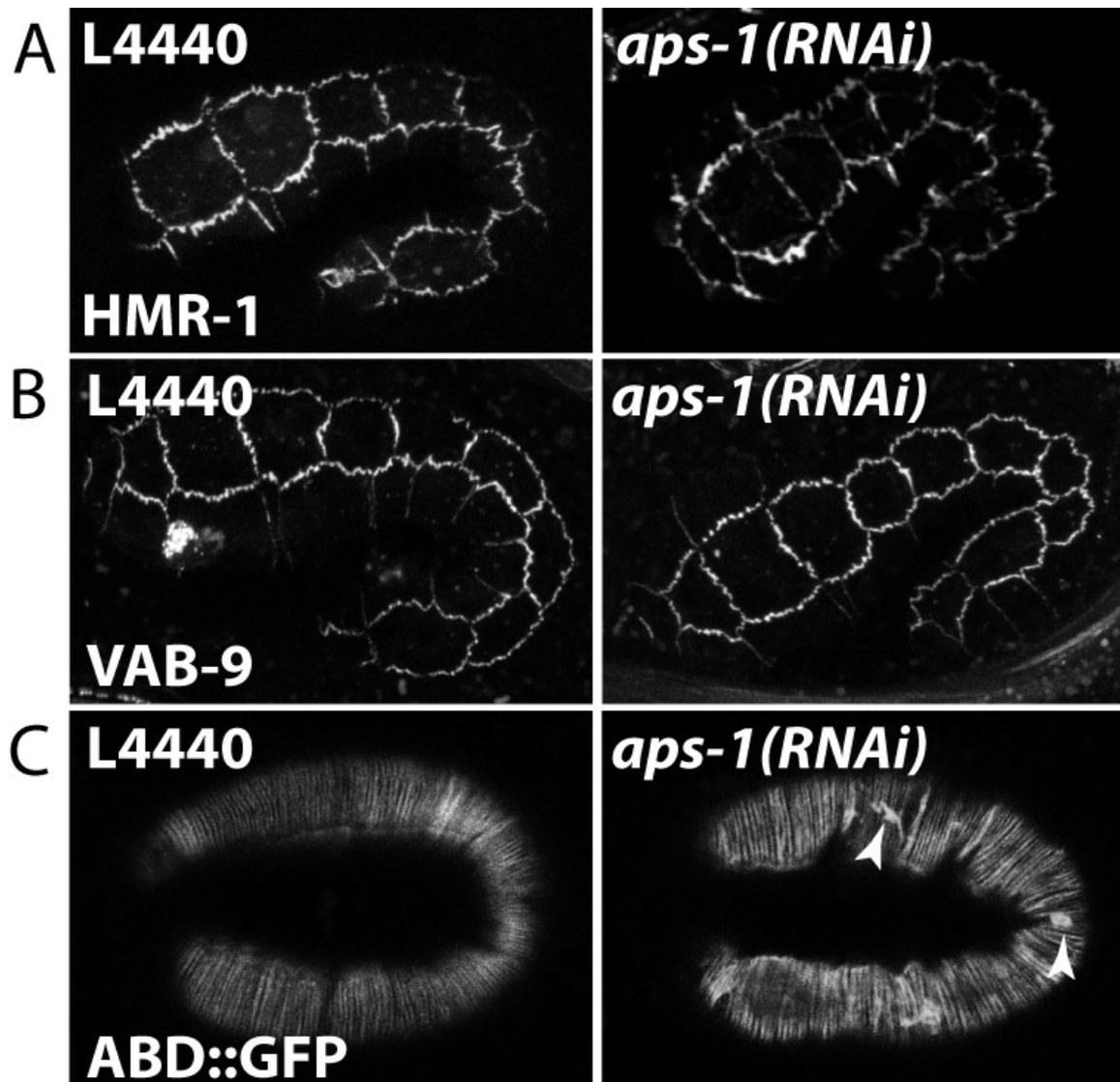


Figure S2: Localisation of CCC components and interactors

A-B) Control and *aps-1(RNAi)* embryos expressing HMR-1::GFP (A) and VAB-9::GFP (B) fusion proteins were observed at the 1.5-fold stage. At that stage no mislocalisation of these proteins could be observed. C) Control and *aps-1(RNAi)* embryos expressing an ABD::GFP fusion protein which stains actin were observed at the 3-fold stage. While the overall organisation of actin was not affected the bundles are slightly thicker and aggregates (arrow) are forming.

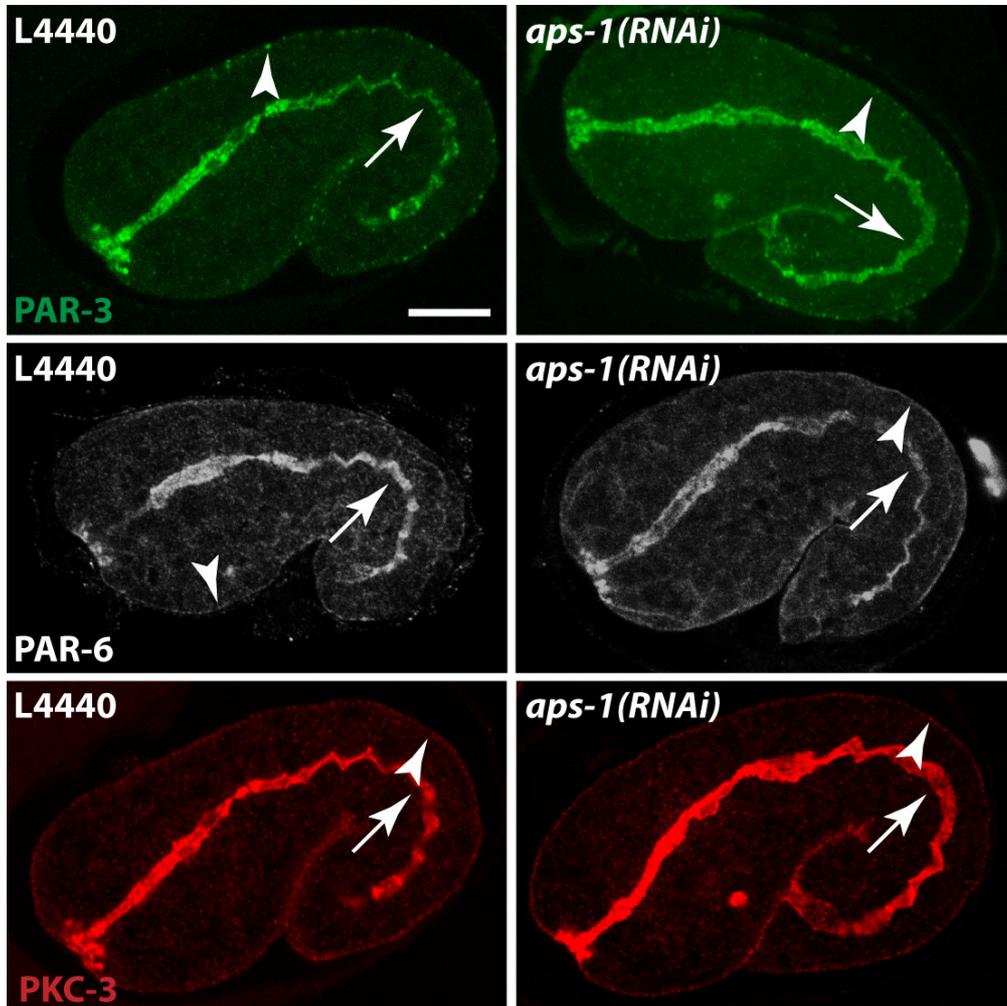


Figure S3: Localisation of apical polarity determinants

Control and *aps-1(RNAi)* embryos stained for PAR-3, PAR-6 and PKC-3 were observed at the 1.5-fold stage. At that stage no mislocalisation of these proteins could be observed in the epidermis (arrowhead) or the intestine (arrow).

DISCUSSION

I. AP-1 contrôle le tri apical

Au cours de cette étude, nous avons montré que le complexe adaptateur pour la clathrine AP-1 est impliqué dans le tri basolatéral dans l'épithélium intestinal de *C. elegans*. Ceci confirme la fonction basolatérale de ce complexe observée chez les mammifères et chez *Drosophila melanogaster* (Folsch et al., 1999 ; Benhra et al., 2011), suggérant que cette fonction est conservée dans ces différents espèces. Chez *C. elegans* ce défaut de trafic basolatéral se traduit par une localisation aspécifique à la membrane basolatérale et apicale. C'est pourquoi on parle d'un défaut de « tri » et non de transport. Chez les mammifères, cette délocalisation de protéines cargos basolatérales suite à l'inhibition d'AP-1B, dépend du cargo. Ainsi, la protéine LDLR se délocalise au pôle apical alors que la protéine TfnR devient basolatérale et apicale (Folsch et al., 1999). Chez la drosophile, la protéine basolatérale Sanpodo se délocalise au pôle apical dans les clones mutants AP-1 (Benhra et al., 2011). Dans les neurones du nématode, AP-1 contrôle la localisation du récepteur ODR-10 à la membrane du cil dendritique qui correspond à la membrane basolatérale d'une cellule épithéliale (Dotti and Simons, 1990 ; Dwyer et al., 2001). Ceci suggère qu'AP-1, chez les mammifères, la drosophile et *C. elegans*, est impliqué dans un processus de tri basolatéral.

Nous avons également démontré que chez *C. elegans*, AP-1 contrôle le tri apical de la protéine transmembranaire PEPT-1. Ce trafic est spécifique du cargo puisque la localisation apicale de la protéine intégrale NHX-2 n'est pas affectée par l'inhibition d'AP-1. Cette fonction de tri apical d'AP-1 est nouvelle. En effet, chez les mammifères, la perte de fonction du complexe AP-1- μ 1B n'affecte pas la localisation des protéines apicales (Folsch et al., 1999). De la même façon, les souris KO pour AP-1- μ 1A montrent une localisation apicale normale de la protéine apicale Zo-1 (Meyer et al., 2000). Le laboratoire de Rodriguez-Boulan a démontré l'implication de la clathrine spécifiquement dans le transport basolatéral, corroborant la fonction d'AP-1B dans le trafic basolatéral sans perturber la localisation des protéines apicales (Deborde et al., 2008). De plus, cette étude révèle qu'aucun adaptateur pour la clathrine ne semble être requis pour le transport apical parce que la clathrine ne l'est pas.

A l'instar des mammifères, il existe chez le nématode deux complexes AP-1 en fonction de la sous-unité μ : μ -APM-1 et μ -UNC-101 ubiquitairement exprimées (Shim et al., 2000). Nous avons démontré que c'est la sous-unité μ -APM-1 qui contrôle aussi bien le tri apical que le tri basolatéral alors que l'autre sous-unité n'affecte pas cette polarité dans les cellules intestinales du ver. Dans les cellules de mammifères, les complexes AP-1- μ 1A et AP-1- μ 1B ont des fonctions spécifiques et distinctes. AP-1- μ 1B est exclusivement exprimé dans les cellules

épithéliales et est impliqué dans le tri basolatéral tandis qu'AP-1- μ 1A est ubiquitairement exprimé et régule le transport du TGN vers les endosomes (Le Borgne et al., 1996 ; Meyer et al., 2000) et ne semble pas affecté le trafic basolatéral chez la souris (Meyer et al., 2000).

Le fait d'observer une relocalisation symétrique d'une protéine normalement exclusivement apicale ou basolatérale peut être dû à un défaut de jonctions cellulaires qui ne remplissent plus leur fonction de barrière de diffusion membranaire. Nos résultats démontrent que dans l'intestin, les jonctions cellulaires sont intègres : les différentes protéines des jonctions forment bien une ceinture jonctionnelle apicale, confirmée par ailleurs en microscopie électronique. Un défaut de transcytose pourrait également expliquer ce phénotype de perte de tri polarisé. Sachant que cette transcytose nécessite un événement d'internalisation, nous avons inhibé la dynamine afin de voir si on est capable de phénocopier AP-1. Ce n'est pas le cas, l'inhibition de *dyn-1* induit la formation de vésicules cytoplasmiques juxta-membranaires mais ne perturbe pas la localisation apicale ou basolatérale des protéines PEPT-1 ou SLCF-1 respectivement. Nous pensons donc que ni la diffusion membranaire, ni la transcytose ne sont responsables du phénotype de tri observé lors de la déplétion d'AP-1.

Enfin cette fonction de tri est conservée dans les cellules neuronales du ver où l'inhibition d'AP-1 induit une localisation homogène du récepteur ODR-10 à la fois sur la membrane de la dendrite et de l'axone alors que celui-ci se localise exclusivement au niveau du cil dendritique (Dwyer et al., 2001).

Nous avons décidé d'examiner si d'autres gènes essentiels du trafic intracellulaire étaient capables de réguler le tri des protéines apicales et basolatérales et donner un phénotype similaire à AP-1. Sur l'ensemble des gènes que nous avons analysés, aucun ne phénocopie AP-1. Tous ces gènes perturbent le « transport » de PEPT-1 et de SLCF-1 mais n'altèrent pas leur tri. Nos données indiquent que seul AP-1 est impliqué dans un processus original de tri apical et qu'un crible exhaustif serait nécessaire pour essayer d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans ce processus. Le laboratoire de Verena Göbel a démontré récemment que les glycosphingolipides GSL se localisent à la membrane apicale intestinale et régule la localisation apicale de la protéine ERM-1 (Zhang et al., 2011). Normalement à la membrane apicale, ERM-1 se délocalise de façon homogène sur la membrane apicale et basolatérale des cellules intestinales en l'absence de ces lipides, donnant un phénotype similaire à AP-1.

II. AP-1 régule la localisation apicale de PAR-6 et CDC-42

Cette fonction apicale d'AP-1 est essentielle pour la localisation du déterminant de polarité apicale PAR-6 chez *C. elegans*. En effet, l'inhibition d'AP-1 induit un défaut de localisation de la protéine PAR-6 qui se localise à la membrane apicale et basolatérale alors qu'elle est strictement apicale dans un contexte normal. Or, PAR-6 est cytosolique et il est peu probable qu'elle soit directement dépendante d'AP-1 ou du trafic intracellulaire pour sa localisation apicale. Un candidat sérieux qui pourrait expliquer cette délocalisation indirecte de PAR-6 est la protéine transmembranaire Crumbs qui interagit avec PAR-6 dans d'autres modèles (Lemmers et al., 2004 ; Morais-de-Sa et al., 2010). Or, chez *C. elegans*, Crumbs *crb-1* n'est pas une protéine essentielle et sa localisation n'est pas altérée lorsqu'on déplète AP-1.

La GTPase CDC-42 est potentiellement un candidat intéressant pour le recrutement de PAR-6 à la membrane apicale. D'une part, parce que la localisation apicale de CDC-42 est altérée dans les embryons déficients pour AP-1, et d'autre part parce que CDC-42 interagit avec PAR-6 grâce au domaine semi-Crib de cette dernière (Joberty et al., 2000 ; Gotta et al., 2001 ; Lin et al., 2000). La localisation apicale de PAR-6 dépend de son interaction avec CDC-42 : ainsi, en l'absence de Cdc42, Par6 ne se localise pas correctement dans l'épithélium du notum chez la drosophile (Georgiou et al., 2008). Pendant la gastrulation du nématode, CDC-42 est active au pôle apical (membrane libre de tout contact) où elle peut recruter PAR-6 (Anderson et al., 2008). Enfin, dans les astrocytes, Cdc42 est nécessaire pour recruter Par6 et aPKC au front de migration (Osmani et al., 2010).

Quel est le lien entre CDC-42 et le trafic intracellulaire et en particulier AP-1? Le laboratoire d'Etienne-Manneville a montré que Cdc42 se localise sur des endosomes positifs pour EEA-1 et se déplace sur des vésicules vers le front de migration où il s'accumule de façon dépendante d'Arf6 (Osmani et al., 2010). Cdc42 sous sa forme active est capable de se lier à la membrane et il a été montré que Cdc42 possède un motif géranyl-géranyl (Nomanbhoy et al., 1999) comme les protéines Rabs (Preising and Ayuso, 2004). Or, les protéines Rabs sont capables d'interagir avec des membranes lipidiques et il n'est donc pas à exclure que cette modification lipidique soit suffisante pour permettre à Cdc42 d'être transportée par des vésicules. Chez *C. elegans*, une telle modification est peu probable car le site CAAX, responsable de cette isoprénylation est inexistant. Néanmoins, Cdc42 reste un candidat sérieux puisque les travaux de Baust et collaborateurs indiquent que Cdc42 est un interacteur potentiel d'AP-1 : en effet, *in vitro*, Cdc42 est recrutée sur des liposomes enrichis en AP-1

(Baust et al., 2006). Il est donc possible que la localisation apicale de CDC-42 soit directement dépendante d'AP-1 et que CDC-42 à son tour recrute PAR-6.

Il est toutefois possible que la localisation apicale de CDC-42 ne soit pas directement dépendante d'AP-1. En effet, la localisation de certains lipides est essentielle : PIP2 est enrichi à la membrane apicale et permet de recruter Cdc42 *via* l'annexine-2 dans les cellules MDCK (Bryant and Mostov, 2008) qui à son tour va permettre le recrutement de Par6 et d'aPKC. Chez *S. cerevisiae*, la phosphatidylsérine possède une localisation asymétrique (Fairn et al., 2011). Lors de la division, elle se localise au niveau du cou du bourgeon et sur la membrane du bourgeon elle-même, issue de la cellule-mère (Fairn et al., 2011). Dans ce contexte, Cdc42 a une localisation polarisée qui coïncide avec celle de la phosphatidylsérine qui, par ailleurs, est strictement nécessaire pour le recrutement polarisé de Cdc42 (Fairn et al., 2011). Il sera pertinent d'analyser la localisation de PIP2 et de la phosphatidylsérine *chez C. elegans* grâce à des sondes telles que le domaine PH de la phospholipase δ qui reconnaît spécifiquement PIP2 (Martin-Belmonte et al., 2007). Cela permettra de voir si ces lipides ont une localisation polarisée chez le nématode et si leur localisation est dépendante d'AP-1. D'autre part, cette investigation permettra d'établir l'implication de ces lipides dans le transport apical et plus particulièrement dans la localisation de CDC-42.

III. Mécanisme du tri apical

Nous venons de démontrer que le complexe AP-1 est impliqué dans le trafic apical de PEPT-1 ou encore de CDC-42. Il est pertinent de comprendre comment AP-1 trie ces protéines apicales. Concernant le complexe AP-1B, les motifs tyrosine et dileucine entre autre ont été identifiés et sont reconnus par AP-1B qui contrôle le trafic basolatéral (Folsch et al., 1999 ; Deborde et al., 2008 ; Odorizzi and Trowbridge, 1997). Actuellement aucun motif apical reconnu par le complexe AP-1 n'a été identifié. Nous pourrions essayer d'analyser la séquence de PEPT-1, reconnue par AP-1, qui serait potentiellement nécessaire et suffisante pour le tri apical, si une telle séquence existe.

Une étude récente indique que ce signal pourrait être plus complexe qu'un simple motif peptidique. En effet, le transport membranaire du canal potassium Kir2.1 est dicté par sa structure tridimensionnelle : deux signaux distincts portés par les extrémités N- et C-terminales de cette protéine sont nécessaires et suffisants pour l'adressage membranaire de cette protéine (Ma et al., 2011). La structure tridimensionnelle permet de rapprocher

physiquement ces deux motifs normalement éloignés dans la structure primaire. Ces motifs cytoplasmiques interagissent avec AP-1 et sont essentiels pour cette interaction et le transport subséquent à la membrane plasmique (Ma et al., 2011).

L'addition d'un résidu glucidique peut également se comporter comme un signal de transport apical et cette hypothèse pourrait être analysée chez *C. elegans*. En effet, la localisation de l'enzyme gastrique H,K-ATPase à la membrane apicale dépend de sa N-glycosylation dans les cellules polarisées LLC-PK1 (Vagin et al., 2004). L'ajout de ce motif sucré est nécessaire et suffisant pour adresser la sous-unité β 1 de l'enzyme Na,K-ATPase normalement basolatérale vers la membrane apicale (Vagin et al., 2005). Des études biochimiques et génétiques seront donc nécessaires afin de comprendre si de telles modifications existent chez le nématode et si leurs fonctions dans le transport apical sont conservées ou non.

L'ancre GPI est une modification lipidique de certaines protéines dictant leur transport à la membrane apicale et cette ancre est nécessaire et suffisante pour cet adressage polarisé (Lisanti et al., 1990). Le transport de cette protéine « taguée ancre-GPI » s'effectue à travers la voie de sécrétion (RE et Golgi) et des études ont montré son interaction préférentielle avec des radeaux lipidiques, riches en cholestérol et en sphingolipides (Sangiorgio et al., 2004). Les cavéoles sont formés de radeaux lipidiques enrichis en cholestérol et en sphingolipides (Parker et al., 2009). Chez *C. elegans*, les cavéolines CAV-1 et CAV-2 sont requises pour la formation des cavéoles et CAV-2 possède une localisation apicale dans les cellules intestinales. Dans ces cellules, CAV-2 est impliquée dans le trafic apical de lipides, régulant potentiellement le transport apical des protéines cargos associées (Parker et al., 2009). En 2011, le laboratoire de Keen a réalisé une étude protéomique des radeaux lipidiques de *C. elegans* par analyse des membranes suite à un traitement au détergent Triton X100 (Rao et al., 2011). Les radeaux lipidiques sont connus pour être résistants aux détergents, ainsi la composition protéique de la fraction insoluble a été analysée par gelC-MS/MS. 44 protéines ont ainsi été identifiées et confirmées par des programmes informatiques dont 21 possédaient une ancre GPI présomptive prédite par les programmes et potentiellement confirmée par PLC qui dissocie l'ancre (Rao et al., 2011). Dans ce crible ni AP-1, ni CDC-42 n'ont été retrouvés ; il est donc peu probable que la fonction apicale du complexe AP-1 dépende des radeaux lipidiques ou de l'ancre GPI. Néanmoins, les GSL qui sont enrichis dans les radeaux lipidiques, sont impliqués dans le trafic apico-basal chez *C. elegans* (Zhang et al., 2011). L'altération des voies de biosynthèse de ces lipides perturbe le tri apical mais n'affecte que faiblement la localisation des protéines basolatérales telles que LET-413 ou encore NHX-7.

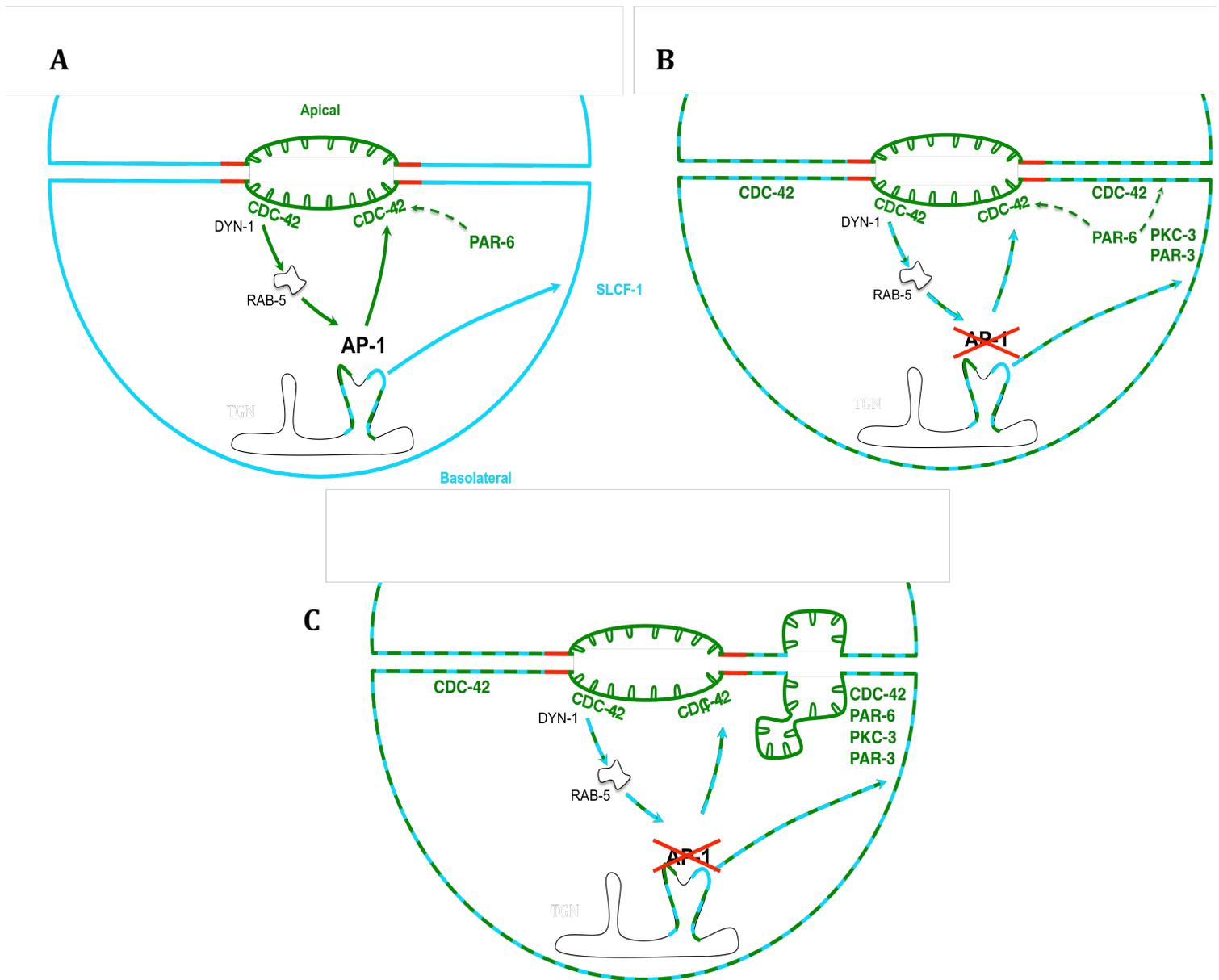


Figure 31 : AP-1 contrôle la formation des lumières

(A) Dans un contexte normal, CDC-42 et PAR-6 se localisent à la membrane apicale luminaire des cellules intestinales et la protéine SLCF-1 est strictement située à la membrane basolatérale. (B) La perte de fonction du complexe AP-1 perturbe le tri apical de CDC-42 et de PAR-6 qui se localisent à la membrane basolatérale. Il est plus probable que ce soit CDC-42 qui soit délocalisée à la membrane basolatérale où elle recrute alors PAR-6. A la membrane latérale, CDC-42 et PAR-6 vont recruter PKC-3, PAR-3 initiant localement une membrane ectopique apicale. (C) Cette conversion apico-basale résulte en la formation d'une lumière ectopique. Notons que en absence d'AP-1, le tri basolatérale de SLCF-1 est également altéré. Il est à noter que l'inhibition de la dynamine (dyn-1) et rab-5 perturbe le transport de PAR-6 et CDC-42 mais n'affecte pas leur tri.

L'ensemble de ces observations indique que les mécanismes du transport apical sont très complexes. L'information qui dicte ce transport apical peut être portée directement par la séquence de la protéine : à l'image des motifs identifiés pour le complexe AP-1B concernant le trafic basolatéral, on peut imaginer qu'un petit peptide puisse exister qui n'a pas encore été identifié. Mais comme nous venons de le constater, ce motif peut être porté par deux séquences éloignées mais rapprochées dans la structure tridimensionnelle et reconnue spécifiquement par AP-1. Des similitudes phénotypiques existent entre l'inhibition d'AP-1 et l'altération des glycosphingolipides, suggérant qu'AP-1 pourrait être impliqué dans le transport polarisé de ces lipides, qui secondairement réguleraient le trafic des protéines apicales.

IV. L'inhibition d'AP-1 induit la formation de lumières ectopiques

Dans le tissu intestinal du nématode *C. elegans*, la perte de fonction d'AP-1 induit un défaut du maintien de la polarité apico-basale et plus généralement une perte de polarité épithéliale qui se manifeste par la formation de lumières apicales ectopiques. Dans ce contexte, le déterminant de polarité PAR-6 ainsi que CDC-42 se délocalisent à la membrane basolatérale alors que la localisation apicale de PAR-3 et de PKC-3 n'est pas modifiée. PAR-3 est exclue du complexe PAR-6/PKC-3, il n'est donc pas étonnant qu'elle ne soit pas recrutée à la membrane basolatérale (Nagai-Tamai et al., 2002 ; Morais-de-Sa et al., 2010). Cependant, il est assez inattendu de constater que PKC-3 ne soit pas non plus recrutée. CDC-42 se trouve sur toute la membrane basolatérale et on sait qu'elle interagit avec PAR-6 et donc cette interaction permet probablement le recrutement et la stabilisation de celle-ci sur cette membrane basolatérale. Il se peut donc que l'interaction entre PAR-6 et PKC-3 ne soit pas suffisamment stable pour permettre le maintien de PKC-3 à la membrane basolatérale. Cependant, localement à la membrane latérale, PAR-6, PAR-3 et PKC-3 sont recrutées et cette localisation coïncide avec la formation de lumière apicale ectopique (Figure 31). De nombreuses protéines apicales autre que les Pars sont recrutées dans ces lumières ectopiques telles que NHX-2, OPT-2/PEPT-1 ou encore la protéine de jonction AJM-1. On observe donc localement une conversion apicale de la membrane latérale. L'étude en microscopie électronique confirme la formation des lumières ectopiques mais indique aussi que l'épithélium intestinal est intègre et les jonctions, bien qu'allongées sont fonctionnelles. Les lumières ectopiques ne communiquent pas avec la lumière principale grâce à la présence de jonctions cellulaires. Ces phénotypes AP-1 sont très similaires à ceux observés lorsque la

biosynthèse des GSL est perturbée (Zhang et al., 2011). Dans ce contexte, le défaut de tri apico-basal induit une identité apicale à la membrane latérale conduisant à la formation de lumières ectopiques latérales. Ces lumières ectopiques sont des structures apicales qui recrutent donc des protéines apicales telles que ERM-1, OPT-2/PEPT-1, PAR-6 ou encore les protéines de jonction AJM-1 et HMP-1. Comme pour AP-1, les lumières ectopiques ne communiquent pas avec la lumière principale grâce à la présence de jonctions et l'épithélium intestinal est, ici encore, intègre (Zhang et al., 2011).

Lorsqu'on perturbe la formation du GSL, la protéine PAR-6::GFP est incapable de se localiser à la membrane intestinale apicale et s'accumule dans le cytoplasme et au niveau des lumières ectopiques, un phénotype qu'on observe également lorsqu'on inhibe AP-1. Par ailleurs, la perte de fonction de *par-6* induit la formation de « bulles » positives pour le marqueur apical IFB-2, de part et d'autre de la lumière principale (Totong et al., 2007). Ces structures peuvent être des lumières ectopiques, suggérant que c'est la restriction apicale de PAR-6 qui serait requise pour réguler la formation d'une lumière unique.

CDC-42 interagit avec PAR-6 et cette interaction est nécessaire pour le recrutement de PAR-6 à la membrane apicale des cellules intestinales. Il est donc plus probable que ce soit CDC-42 qui soit la cible directe du complexe AP-1 et qui orchestre alors cette conversion apico-basale et la formation de lumières ectopiques. Plusieurs données bibliographiques viennent étayer cette hypothèse : dans les kystes Caco-2, l'inhibition de Cdc42 induit la formation de lumières ectopiques positives pour la protéine apicale aPKC et la protéine jonctionnelle Zo-1, suggérant que Cdc42 est requise pour correctement positionner les protéines apicales (Jaffe et al., 2008). Le laboratoire de Keith Mostov a démontré le rôle essentiel de Cdc42 et de sa GEF Tuba dans la formation d'une lumière unique dans un kyste MDCK (Bryant et al., 2010).

Les compartiments VACs (Vacuolar Apical Compartments) transportent Cdc42 à la membrane luminale apicale grâce à l'annexine-2 qui s'associe avec le phosphoinositide PIP2 (Martin-Belmonte et al., 2007). Lorsque Cdc42 est correctement positionnée, elle va alors recruter Par6 et aPKC afin d'initier la luminogenèse. Ces VACs sont également responsables du transport apical et de la sécrétion de la podocalyxine dans l'espace luminal, essentiel pour la formation d'une lumière (Vega-Salas et al., 1987). De plus, l'association de l'annexine-2 avec Cdc42 sur des vésicules positives pour Rab11 au cours de la luminogenèse est requise pour l'adressage apical de la podocalyxine (Bryant et al., 2010). La fonction apicale de Rab11 est particulièrement intéressante : dans les cellules intestinales de *C. elegans*, RAB-11 se localise sub-apicalement et la perte de fonction d'AP-1 et l'altération du GSL induisent le

même phénotype de perte de localisation apicale (Shafaq-Zadah, soumis ; Zhang et al., 2011). Le compartiment positif pour RAB-11 pourrait être requis pour le transport de vésicules enrichies en GSL à la membrane apicale, régulant ainsi la formation d'une membrane luminale apicale. Par ailleurs, Rab11 contrôle le transport de la podocalyxine de manière dépendante de Cdc42 et de Tuba et est impliquée dans la formation d'une lumière unique puisque l'inhibition de rab11 induit des lumières ectopiques dans les cellules MDCK (Bryant et al., 2010).

V. AP-1 est impliqué dans le maintien de l'adhésion cellulaire : cause de létalité ?

Dans l'épithélium de l'épiderme, la perte de fonction d'AP-1 induit un défaut dramatique des jonctions cellulaires. Nous avons ainsi démontré qu'AP-1 est requis pour correctement localiser le complexe cadhérine/caténine à la membrane sub-apicale. Les embryons AP-1 montrent un défaut de tri des composants du complexe CCC (Cadherin Catenin Complex) HMR-1, HMP-1 et de VAB-9 qui se manifeste par une localisation apicale et basale de ces protéines, par rapport à une localisation normale strictement apicale. Ceci suggère que la fonction de tri apical d'AP-1 observée dans l'intestin est également conservée dans l'épiderme. Ceci est confirmée dans les larves : alors que la déplétion de *rab-5* ou *rab-11* induit une perturbation de la localisation de HMR-1, seule AP-1 et la clathrine contrôle son tri apical. L'autre complexe jonctionnel DAC formé de DLG-1 et d'AJM-1 forme bien une ceinture jonctionnelle avec une accumulation ponctuée intracellulaire. En microscopie électronique, on constate que les jonctions sont étendues et décrochées du pôle apical et se positionnent beaucoup plus basalement. On constate que les membranes ne sont plus jointives au pôle apical et sur une coupe transversale d'un embryon, on peut voir que certaines cellules présentent un renflement, résultat d'un problème d'adhésion. Le fait d'observer des jonctions étendues peut refléter un défaut de compaction ; cette compaction est normalement assurée par LET-413 qui est basolatérale (Legouis et al., 2000). Or, la localisation de cette protéine n'est pas perturbée lorsqu'on inhibe AP-1. De la même façon, l'accumulation de DLG-1 et d'AJM-1 dans le cytoplasme n'est probablement pas la seule cause de ce défaut d'adhésion. En effet, la déplétion de *dlg-1* cause la perte des structures denses aux électrons mais n'affecte que moyennement la polarité et l'adhésion cellulaire (McMahon et al., 2001).

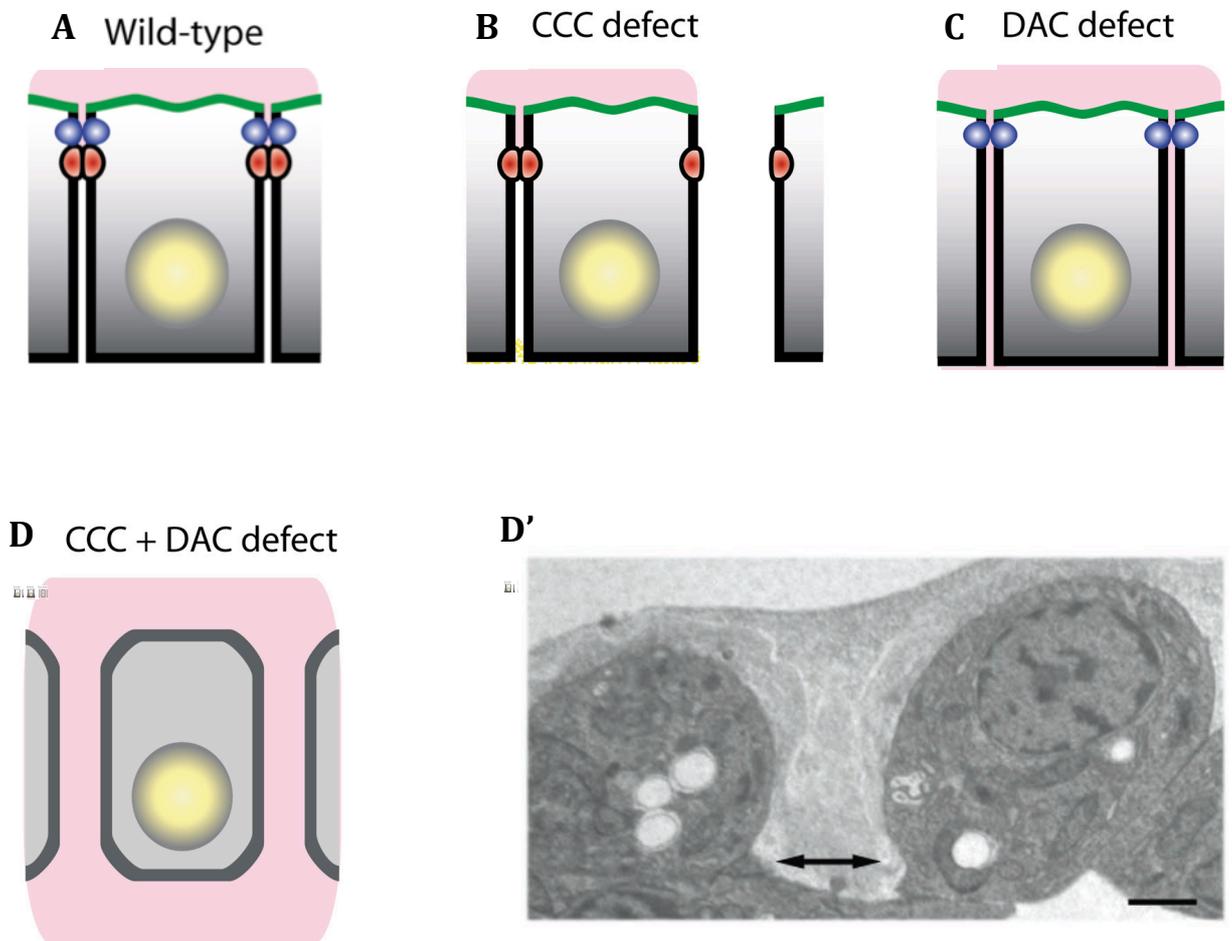


Figure 32 : Maintien de l'adhésion cellulaire

(A) Cellules épithéliales du nématode avec la présence du CeAJ formé par le complexe CCC en bleu et le DAC en rouge. (B) la perte de fonction des composants du CCC tels que HMR-1, HMP-1 ou HMP-2 n'affecte pas l'adhésion cellulaire dans les cellules épidermales et intestinales. (C) De la même façon l'absence du complexe DAC (DLG-1 ou AJM-1) ne cause pas non plus un défaut majeur de l'adhésion cellulaire. (D) Cependant l'absence simultanée des deux complexes CCC et DAC entraîne une perte dramatique de l'adhésion cellulaire de l'épithélium intestinal et épidermal, les cellules ne sont plus jointives. (Wormbook)

(D') Cette image de ME montre que la déplétion simultanée de la claudine VAB-9 (CCC) et d'AJM-1 (DAC) inuit une perte totale d'adhésion des deux cellules épidermales voisines : les cellules ne sont plus jointives (Simske et al., 2003).

Ce problème d'adhésion est probablement dû à un défaut simultané de localisation du CCC et du DAC, causant cette perte d'adhésion des cellules épidermales (Figure 32). Cette hypothèse est cohérente avec les résultats de Segbert et collaborateurs : l'inhibition seule de HMP-1 (CCC) ou de DLG-1 (DAC) ne perturbe pas la formation du tube intestinal, tandis que l'inhibition simultanée de ces deux gènes induit un détachement des cellules intestinales et un défaut de formation du tube (Segbert et al., 2004). Le même phénotype est observé dans les embryons privés de la claudine VAB-9 et d'AJM-1 dans les cellules épidermales (Simske et al., 2003).

La cadhérine est une protéine transmembranaire dont le transport nécessite le trafic intracellulaire et potentiellement AP-1. En effet, la délocalisation de la cadhérine et de ses partenaires à la membrane basale est uniquement due à un défaut de trafic et non pas un problème de diffusion membranaire. D'une part, parce que cette localisation ectopique basale du complexe cadhérine n'est pas en continuité avec la cadhérine apicale et d'autre part, la protéine transmembranaire apicale CHE-14 reste apicale, au moins dans un premier temps. Contrairement à l'épithélium intestinal, dans l'épiderme on ne constate pas de conversion apico-basale évidente : le protéoglycane héparane sulfate UNC-52 est sécrété correctement basalement et la cuticule est sécrétée uniquement à la membrane apicale. Les membranes apicales et basolatérales semblent conserver leur identité polarisée ainsi que leurs fonctions spécifiques en l'absence du complexe AP-1. Cette variation entre les deux épithéliums peut s'expliquer par le fait que la fonction d'un gène peut varier d'un épithélium à l'autre : dans les cellules intestinales, PAR-3 contrôle la formation des jonctions cellulaires alors que dans l'épiderme, la formation de ces jonctions ne requiert pas PAR-3 (Achilleos et al., 2010). Notons que le positionnement très basal des jonctions cause une expansion de la membrane apicale au détriment de la membrane basolatérale.

La cadhérine peut-elle être un cargo d'AP-1? Dans les cellules de mammifères la E-cadhérine possède un motif dileucine qui est suffisant et nécessaire pour son transport à la membrane basolatérale (Miranda et al., 2001). Dans les cellules polarisées LLC-PK1, dépourvues du complexe AP-1- μ B normalement impliqué dans le transport basolatéral, ce motif est capable de dicter la localisation correcte de la E-cadhérine. Cependant, la sous-unité μ 1B reconnaît spécifiquement le motif tyrosine alors que c'est la sous-unité β qui reconnaît le motif dileucine (Anderson et al., 1977 ; Rapoport et al., 1998). Il n'est donc pas exclu que le complexe AP-1- μ A puisse contrôler le trafic basolatéral de la E-cadhérine indépendamment d'AP-1B. Cette observation est confirmée par le laboratoire de Rodriguez-Boulan, montrant

que la perte de la clathrine perturbe bien la localisation basolatérale de la E-cadhérine qui devient apical dans les cellules MDCK mais ne requiert pas AP-1B (Deborde et al., 2008). Cependant, ces données sont en contradiction avec les résultats de Mimura et de Ling. Dans les cellules LLC-PK1, la β -caténine et la E-cadhérine sont enrichies dans le cytoplasme alors qu'elles sont sur la membrane basolatérale dans les cellules exprimant AP-1B (Mimura et al., 2011). De plus, la phosphatidylinositol phosphate kinase de type I γ interagit avec la E-cadhérine dans les cellules MDCK et est reconnue par le complexe AP-1B. Ainsi, AP-1B interagit indirectement avec la E-cadhérine *via* cette kinase et assure ainsi le transport basolatéral de la cadhérine (Ling et al., 2007). Ce qui suggère un rôle important du complexe AP-1B dans le transport de la cadhérine. Notons enfin que chez le poisson zèbre, la déplétion d'AP1S1 induit une diminution significative de la cadhérine à la membrane des cellules épithéliales épidermales (Montpetit et al., 2008). Chez *C. elegans*, la cadhérine HMR-1 ne possède pas de motif dileucine mais un seul motif tyrosine, faisant d'HMR-1 un cargo potentiel d'AP-1. Des manipulations de mutations de ce motif ainsi que des tests d'interactions permettront de savoir si HMR-1 est un cargo d'AP-1.

AP-1 colocalise partiellement avec RAB-11 et contrôle sa localisation aussi bien dans l'épiderme de *C. elegans* que dans le notum de drosophile (Shafaq-Zadah et al., soumis ; Benhra et al., 2011). De plus, il a été montré que dans les cellules MDCK, la déplétion de Rab11 affecte la localisation basolatérale de la E-cadhérine qui s'accumule alors dans le cytoplasme (Desclozeaux et al., 2008 ; Langevin et al., 2005). Ceci suggère qu'une fonction d'AP-1 pourrait être la régulation du processus de recyclage de la cadhérine assuré par le compartiment RAB-11, au cours de l'élongation du ver.

Qu'est-ce qui cause la létalité? L'absence du complexe AP-1 induit une létalité embryonnaire chez *C. elegans* au cours du processus d'élongation. Le phénotype observé dans l'intestin n'explique pas pourquoi l'embryon meurt : la morphologie des cellules intestinales est intacte, les jonctions sont présentes et sont fonctionnelles bien qu'allongées. Certes, il y a formation de nombreuses lumières ectopiques mais l'animal est dans sa coquille et ne mange pas encore donc ce défaut n'est certainement pas responsable de l'arrêt du développement de l'embryon de *C. elegans*.

On observe en revanche un défaut d'adhésion cellulaire évident dans le tissu épidermal qui est la conséquence d'un défaut du maintien des jonctions apicales. Il est possible que ce défaut de jonction apparaisse dans l'intestin mais comme celui-ci n'est pas soumis à de fortes tensions mécaniques, ce défaut n'est pas prononcé. Par contre, l'épiderme est soumis à des tensions

musculaires intenses lors de l'élongation, c'est pourquoi le maintien des jonctions apicales est essentiel pour assurer la cohésion des cellules. Au cours de ce processus d'élongation, le remodelage des jonctions est essentiel et le trafic nécessaire. Ces deux aspects sont affectés lorsqu'on inhibe AP-1. En effet, les embryons déficients pour AP-1 montrent une accumulation de débris cellulaires dans l'espace entre le ver et la coquille. Ces débris proviennent des cellules épidermales puisqu'ils sont positifs pour le marqueur des cellules épidermales CHE-14. Enfin, lorsqu'on analyse des embryons AP-1 tardifs, on observe que la protéine transmembranaire apicale CHE-14 n'est plus uniquement apicale mais aussi basolatérale, tout comme DLG-1. Ceci confirme que les jonctions des cellules épidermales deviennent de plus en plus défectueuses et ne remplissent plus leur fonction de barrière et qu'*in fine*, l'identité polaire des deux membranes est perdue. Ce défaut d'adhésion est probablement responsable de la létalité embryonnaire causée par la perte d'AP-1.

Ce phénotype d'adhésion semble être conservé : chez le poisson zèbre, la perte d'AP1S1 cause une perte de l'intégrité de l'épithélium monocouche et une malformation de l'épiderme de la queue notamment due à un défaut de localisation membranaire de la E-cadhérine (Montpetit et al., 2008). Dans les cellules LLC-PK1, la perte de fonction d'AP-1B perturbe également l'organisation en monocouche des cellules, ce qui indique que les cellules ne sont plus correctement adhésives (Folsch et al., 1999). Meyer et collaborateurs ont constaté que les cryosections des embryons de souris KO pour AP-1- μ A étaient difficiles à réaliser car les tissus ne sont plus intègres ; ce qui pourrait être dû à un défaut de cohésion entre les cellules ou entre les cellules et la matrice extracellulaire (Meyer et al., 2000). L'ensemble de ces données suggère que cette fonction d'AP-1 dans l'adhésion cellulaire semble être conservée même si chez la drosophile, AP-1 ne régule ni la localisation de la cadhérine ni l'adhésion cellulaire (Benhra et al., 2011).

Quant à la fonction d'AP-1 dans la régulation de la polarité épithéliale observée chez *C. elegans*, elle ne semble pas conservée a priori dans les autres espèces. La fonction de transport basolatéral d'AP-1 est partagée par les mammifères et la drosophile mais l'implication d'AP-1 dans la polarité apico-basale de l'épithélium semble spécifique du nématode. En effet, dans les souris KO pour AP-1- μ 1A, Zo-1 se localise correctement à la membrane apicale et LDLR à la membrane basolatérale (Meyer et al., 2000). De la même façon, la déplétion de la clathrine ne perturbe pas la formation des jonctions serrées (Zo-1) ainsi que la localisation de protéines apicales bien que la E-cadhérine soit délocalisée (Deborde et al., 2008). La perte de l'organisation en monocouche des cellules LLC-PK1 dépourvues d'AP-1B semble plus relever d'un défaut d'adhésion que d'une perte générale de

la polarité épithéliale (Folsch et al., 1999). Cependant, ces études sont réalisées dans des épithéliums monocouches ; qu'en est-il de la fonction d'AP-1 et de la clathrine dans des kystes?

VI. Conclusion

Chez le nématode *C. elegans*, le complexe adaptateur pour la clathrine régule le maintien de la polarité épithéliale tant dans le tissu intestinal que dans le tissu épidermal. AP-1 est impliqué dans un processus de tri apical et c'est la première fois qu'une telle fonction est identifiée pour un adaptateur pour la clathrine. Cette fonction apicale est essentielle dans les deux épithéliums : dans l'intestin, AP-1 permet de correctement localiser le déterminant de polarité PAR-6 et la GTPase CDC-42 alors que dans l'épiderme, il est essentiel pour le positionnement apical de la E-cadhérine HMR-1. L'altération de ces processus induits par la déplétion d'AP-1 résulte en la formation de lumières ectopiques dans l'intestin et une perte d'adhésion dramatique dans l'épiderme. Ce dernier aspect est très probablement responsable de la létalité embryonnaire induite par la perte de fonction d'AP-1. D'une façon générale, dans les deux cas la fonction majeure d'AP-1 est le tri apical (Figure 33).

Il sera par la suite intéressant d'étudier l'interaction possible entre AP-1 et CDC-42 d'une part et entre AP-1 et la cadhérine HMR-1 d'autre part. CDC-42 et HMR-1 sont toutes les deux mal triées lorsqu'AP-1 est inhibé : elles sont donc deux cargos potentiels du complexe AP-1. Des études *in vivo* de colocalisation entre AP-1 et ces protéines seront nécessaires chez le ver ainsi que des tests d'interaction par immunoprécipitations ou par GST-pull down. Des tests *in silico* seront également indispensables afin d'identifier des motifs potentiels de ces protéines reconnus par AP-1 et nécessaires pour le transport apical. Par exemple HMR-1 possède un motif tyrosine ; en mutant spécifiquement ce motif, nous serons en mesure d'évaluer l'impact d'un tel motif sur le transport polarisé de la cadhérine. Cela permettra peut-être *in fine* d'identifier un motif consensus qui serait nécessaire et suffisant pour transporter spécifiquement un cargo vers la membrane apicale.

Quelle est la relation entre AP-1 et les glycosphingolipides (GSL)? L'inhibition d'AP-1 et des GSL induit un phénotype similaire : un défaut de tri apical. AP-1 peut-il être impliqué dans le transport apical des GSL : pour cela on pourrait analyser la localisation de ces lipides en l'absence d'AP-1 et établir un relation d'épistasie entre ces deux acteurs du trafic apical. Afin de mieux caractériser le processus de tri apical, nous avons effectué un crible non exhaustif

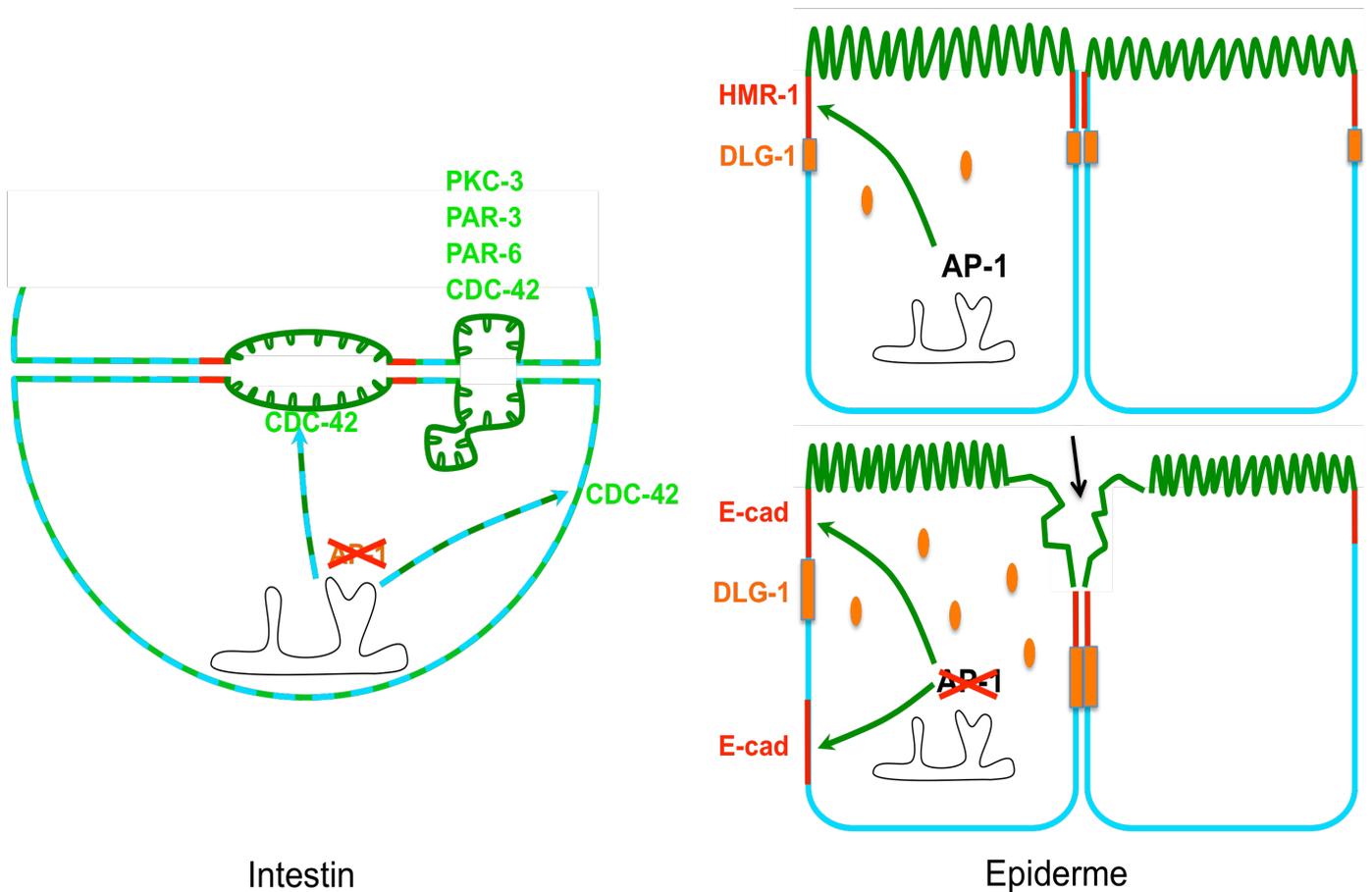


Figure 33 : Modèle pour AP-1 dans le tri apical

AP-1 contrôle aussi bien le tri apical que basolatéral. Cependant sa fonction apicale est essentielle puisqu'elle permet de maintenir la polarité épithéliale dans l'épithélium tubulaire intestinal en localisant correctement CDC-42 et PAR-6. L'inhibition d'AP-1 induit une conversion apicale de la membrane latérale et la formation de lumière ectopique. Cette fonction de tri apical est conservée dans l'épithélium monocouche de l'épiderme, où AP-1 contrôle le tri apical de la cadhérine. En l'absence d'AP-1, la cadhérine est ectopiquement localisée à la membrane basolatérale et DLG-1/AJM-1 s'accumulent de façon ponctuelle dans le cytoplasme. La microscopie électronique révèle un défaut dramatique des jonctions responsable de la perte d'adhésion constatée dans l'épiderme des embryons déficients pour AP-1, représentée schématiquement ici par la flèche noire.

afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans ce processus. Nous pourrions donc exploiter ce crible afin de mieux comprendre les mécanismes de la voie apicale.

Enfin, AP-1 est impliqué dans le maintien de la polarité épithéliale dans l'épithélium intestinal de *C. elegans*. Cependant, aucune donnée en cellules de mammifères ne démontre une telle fonction pour AP-1 dans un épithélium monocouche ; qu'en est-il dans une culture de cellule en kyste? Il sera pertinent de caractériser la fonction d'AP-1 dans le contrôle de la polarité épithéliale dans un tel système et ainsi voir si cette fonction d'AP-1 est conservée chez les mammifères. Notre étude chez le nématode *C. elegans* a permis de révéler une fonction essentielle et nouvelle du complexe adaptateur pour la clathrine dans le tri apical ainsi que dans le maintien de la polarité épithéliale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aceto, D., Beers, M. and Kemphues, K. J.** (2006). Interaction of PAR-6 with CDC-42 is required for maintenance but not establishment of PAR asymmetry in *C. elegans*. *Dev Biol* **299**, 386-97.
- Achilleos, A., Wehman, A. M. and Nance, J.** (2010). PAR-3 mediates the initial clustering and apical localization of junction and polarity proteins during *C. elegans* intestinal epithelial cell polarization. *Development* **137**, 1833-42.
- Aguilar, R. C., Boehm, M., Gorshkova, I., Crouch, R. J., Tomita, K., Saito, T., Ohno, H. and Bonifacino, J. S.** (2001). Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J Biol Chem* **276**, 13145-52.
- Anderson, D. C., Gill, J. S., Cinalli, R. M. and Nance, J.** (2008). Polarization of the *C. elegans* embryo by RhoGAP-mediated exclusion of PAR-6 from cell contacts. *Science* **320**, 1771-4.
- Anderson, R. G., Goldstein, J. L. and Brown, M. S.** (1977). A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature* **270**, 695-9.
- Ang, A. L., Folsch, H., Koivisto, U. M., Pypaert, M. and Mellman, I.** (2003). The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* **163**, 339-50.
- Aranda, V., Haire, T., Nolan, M. E., Calarco, J. P., Rosenberg, A. Z., Fawcett, J. P., Pawson, T. and Muthuswamy, S. K.** (2006). Par6-aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nat Cell Biol* **8**, 1235-45.
- Astanina, K. and Jacob, R.** (2010). KIF5C, a kinesin motor involved in apical trafficking of MDCK cells. *Cell Mol Life Sci* **67**, 1331-42.
- Au, J. S., Puri, C., Ihrke, G., Kendrick-Jones, J. and Buss, F.** (2007). Myosin VI is required for sorting of AP-1B-dependent cargo to the basolateral domain in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* **177**, 103-14.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. and Knust, E.** (2001). *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638-43.
- Baig, A., Bao, X., Wolf, M. and Haslam, R. J.** (2009). The platelet protein kinase C substrate pleckstrin binds directly to SDPR protein. *Platelets* **20**, 446-57.
- Balklava, Z., Pant, S., Fares, H. and Grant, B. D.** (2007). Genome-wide analysis identifies a general requirement for polarity proteins in endocytic traffic. *Nat Cell Biol* **9**, 1066-73.
- Bartels, D. J., Mitchell, D. A., Dong, X. and Deschenes, R. J.** (1999). Erf2, a novel gene product that affects the localization and palmitoylation of Ras2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 6775-87.
- Baust, T., Czupalla, C., Krause, E., Bourel-Bonnet, L. and Hoflack, B.** (2006). Proteomic analysis of adaptor protein 1A coats selectively assembled on liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3159-64.
- Beatty, A., Morton, D. and Kemphues, K.** (2010). The *C. elegans* homolog of *Drosophila* Lethal giant larvae functions redundantly with PAR-2 to maintain polarity in the early embryo. *Development* **137**, 3995-4004.
- Beck, K., Boswell, B. A., Ridgway, C. C. and Bachinger, H. P.** (1996). Triple helix formation of procollagen type I can occur at the rough endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **271**, 21566-73.
- Beck, K. A. and Keen, J. H.** (1991). Self-association of the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. *J Biol Chem* **266**, 4437-41.
- Beers, M. and Kemphues, K.** (2006). Depletion of the co-chaperone CDC-37 reveals two modes of PAR-6 cortical association in *C. elegans* embryos. *Development* **133**, 3745-54.

- Ben-Tekaya, H., Miura, K., Pepperkok, R. and Hauri, H. P.** (2005). Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC. *J Cell Sci* **118**, 357-67.
- Benesch, S., Polo, S., Lai, F. P., Anderson, K. I., Stradal, T. E., Wehland, J. and Rottner, K.** (2005). N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J Cell Sci* **118**, 3103-15.
- Benhra, N., Lallet, S., Cotton, M., Le Bras, S., Dussert, A. and Le Borgne, R.** (2011). AP-1 Controls the Trafficking of Notch and Sanpodo toward E-Cadherin Junctions in Sensory Organ Precursors. *Curr Biol* **21**, 87-95.
- Benhra, N., Vignaux, F., Dussert, A., Schweisguth, F. and Le Borgne, R.** (2010). Neuralized promotes basal to apical transcytosis of delta in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **21**, 2078-86.
- Betschinger, J., Mechtler, K. and Knoblich, J. A.** (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326-30.
- Bilder, D.** (2004). Epithelial polarity and proliferation control: links from the Drosophila neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev* **18**, 1909-25.
- Bilder, D. and Perrimon, N.** (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* **403**, 676-80.
- Blobel, G. and Dobberstein, B.** (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**, 835-51.
- Blobel, G. and Sabatini, D.** (1971). Dissociation of mammalian polyribosomes into subunits by puromycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 390-4.
- Boehm, M. and Bonifacino, J. S.** (2001). Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* **12**, 2907-20.
- Bonfanti, L., Mironov, A. A., Jr., Martinez-Menarguez, J. A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H. J., Mironov, A. A. and Luini, A.** (1998). Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* **95**, 993-1003.
- Bonifacino, J. S. and Glick, B. S.** (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-66.
- Bossinger, O., Klebes, A., Segbert, C., Theres, C. and Knust, E.** (2001). Zonula adherens formation in *Caenorhabditis elegans* requires *dlg-1*, the homologue of the *Drosophila* gene discs large. *Dev Biol* **230**, 29-42.
- Boucrot, E., Saffarian, S., Zhang, R. and Kirchhausen, T.** Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One* **5**, e10597.
- Boutin, J. A.** (1997). Myristoylation. *Cell Signal* **9**, 15-35.
- Bouzahzah, B., Albanese, C., Ahmed, F., Pixley, F., Lisanti, M. P., Segall, J. D., Condeelis, J., Joyce, D., Minden, A., Der, C. J. et al.** (2001). Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways. *Mol Med* **7**, 816-30.
- Brenner, S.** (1973). The genetics of behaviour. *Br Med Bull* **29**, 269-71.
- Brown, D. A. and Rose, J. K.** (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-44.
- Bryant, D. M., Datta, A., Rodriguez-Fraticelli, A. E., Peranen, J., Martin-Belmonte, F. and Mostov, K. E.** (2010). A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. *Nat Cell Biol.*
- Bryant, D. M. and Mostov, K. E.** (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 887-901.

- Bu, W., Lim, K. B., Yu, Y. H., Chou, A. M., Sudhakaran, T. and Ahmed, S.** (2010). Cdc42 interaction with N-WASP and Toca-1 regulates membrane tubulation, vesicle formation and vesicle motility: implications for endocytosis. *PLoS One* **5**, e12153.
- Burgess, J., Jauregui, M., Tan, J., Rollins, J., Lallet, S., Leventis, P. A., Boulianne, G. L., Chang, H. C., Le Borgne, R., Kramer, H. et al.** (2011). AP-1 and clathrin are essential for secretory granule biogenesis in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* **22**, 2094-105.
- Burgos, P. V., Mardones, G. A., Rojas, A. L., daSilva, L. L., Prabhu, Y., Hurley, J. H. and Bonifacino, J. S.** (2010). Sorting of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex. *Dev Cell* **18**, 425-36.
- Burtey, A., Rappoport, J. Z., Bouchet, J., Basmaciogullari, S., Guatelli, J., Simon, S. M., Benichou, S. and Benmerah, A.** (2007). Dynamic interaction of HIV-1 Nef with the clathrin-mediated endocytic pathway at the plasma membrane. *Traffic* **8**, 61-76.
- Byland, R., Vance, P. J., Hoxie, J. A. and Marsh, M.** (2007). A conserved dileucine motif mediates clathrin and AP-2-dependent endocytosis of the HIV-1 envelope protein. *Mol Biol Cell* **18**, 414-25.
- Caro, L. G. and Palade, G. E.** (1964). Protein Synthesis, Storage, and Discharge in the Pancreatic Exocrine Cell. An Autoradiographic Study. *J Cell Biol* **20**, 473-95.
- Casanova, J. E., Wang, X., Kumar, R., Bhartur, S. G., Navarre, J., Woodrum, J. E., Altschuler, Y., Ray, G. S. and Goldenring, J. R.** (1999). Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* **10**, 47-61.
- Caviston, J. P. and Holzbaur, E. L.** (2006). Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol* **16**, 530-7.
- Chapuy, B., Tikkanen, R., Muhlhausen, C., Wenzel, D., von Figura, K. and Honing, S.** (2008). AP-1 and AP-3 mediate sorting of melanosomal and lysosomal membrane proteins into distinct post-Golgi trafficking pathways. *Traffic* **9**, 1157-72.
- Chen, C. C., Schweinsberg, P. J., Vashist, S., Mareiniss, D. P., Lambie, E. J. and Grant, B. D.** (2006). RAB-10 is required for endocytic recycling in the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Mol Biol Cell* **17**, 1286-97.
- Chen, C. P., Chiang, M. C., Wang, T. H., Hsueh, C., Chang, S. D., Tsai, F. J., Wang, C. N., Chern, S. R. and Wang, W.** (2010). Microvillus inclusion disease: prenatal ultrasound findings, molecular diagnosis and genetic counseling of congenital diarrhea. *Taiwan J Obstet Gynecol* **49**, 487-94.
- Chiasson, C. M., Wittich, K. B., Vincent, P. A., Faundez, V. and Kowalczyk, A. P.** (2009). p120-catenin inhibits VE-cadherin internalization through a Rho-independent mechanism. *Mol Biol Cell* **20**, 1970-80.
- Chuang, J. Z. and Sung, C. H.** (1998). The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* **142**, 1245-56.
- Collawn, J. F., Stangel, M., Kuhn, L. A., Esekogwu, V., Jing, S. Q., Trowbridge, I. S. and Tainer, J. A.** (1990). Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* **63**, 1061-72.
- Conner, S. D. and Schmid, S. L.** (2003). Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **162**, 773-9.
- Coskun, U. and Simons, K.** (2010). Membrane rafting: from apical sorting to phase segregation. *FEBS Lett* **584**, 1685-93.
- Coucouvani, E. and Martin, G. R.** (1995). Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* **83**, 279-87.
- Crowther, R. A. and Pearse, B. M.** (1981). Assembly and packing of clathrin into coats. *J Cell Biol* **91**, 790-7.

- Cuenca, A. A., Schetter, A., Aceto, D., Kempfues, K. and Seydoux, G.** (2003). Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Development* **130**, 1255-65.
- Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvarezza, S., Schreiner, R. and Rodriguez-Boulan, E.** (2008). Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* **452**, 719-23.
- Delevoe, C., Hurbain, I., Tenza, D., Sibarita, J. B., Uzan-Gafsou, S., Ohno, H., Geerts, W. J., Verkleij, A. J., Salamero, J., Marks, M. S. et al.** (2009). AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *J Cell Biol* **187**, 247-64.
- Dell'Angelica, E. C.** (2009). AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 552-9.
- Dell'Angelica, E. C., Klumperman, J., Stoorvogel, W. and Bonifacino, J. S.** (1998). Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* **280**, 431-4.
- Dell'Angelica, E. C., Mullins, C. and Bonifacino, J. S.** (1999). AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* **274**, 7278-85.
- Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M. and Bonifacino, J. S.** (2000). GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* **149**, 81-94.
- Desclozeaux, M., Venturato, J., Wylie, F. G., Kay, J. G., Joseph, S. R., Le, H. T. and Stow, J. L.** (2008). Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C545-56.
- Dittie, A. S., Hajibagheri, N. and Tooze, S. A.** (1996). The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor. *J Cell Biol* **132**, 523-36.
- Dittie, A. S., Klumperman, J. and Tooze, S. A.** (1999). Differential distribution of mannose-6-phosphate receptors and furin in immature secretory granules. *J Cell Sci* **112** (Pt 22), 3955-66.
- Dittrich, M., Hayashi, S. and Schulten, K.** (2004). ATP hydrolysis in the betaTP and betaDP catalytic sites of F1-ATPase. *Biophys J* **87**, 2954-67.
- Doerflinger, H., Vogt, N., Torres, I. L., Mirouse, V., Koch, I., Nusslein-Volhard, C. and St Johnston, D.** (2010). Bazooka is required for polarisation of the *Drosophila* anterior-posterior axis. *Development* **137**, 1765-73.
- Donson, A. M., Banerjee, A., Gamboni-Robertson, F., Fleitz, J. M. and Foreman, N. K.** (2000). Protein kinase C zeta isoform is critical for proliferation in human glioblastoma cell lines. *J Neurooncol* **47**, 109-15.
- Doray, B., Lee, I., Knisely, J., Bu, G. and Kornfeld, S.** (2007). The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Mol Biol Cell* **18**, 1887-96.
- Dotti, C. G. and Simons, K.** (1990). Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell* **62**, 63-72.
- Drake, M. T., Zhu, Y. and Kornfeld, S.** (2000). The assembly of AP-3 adaptor complex-containing clathrin-coated vesicles on synthetic liposomes. *Mol Biol Cell* **11**, 3723-36.
- Duncan, M. C. and Peifer, M.** (2008). Regulating polarity by directing traffic: Cdc42 prevents adherens junctions from crumblin' aPart. *J Cell Biol* **183**, 971-4.
- Dwyer, N. D., Adler, C. E., Crump, J. G., L'Etoile, N. D. and Bargmann, C. I.** (2001). Polarized dendritic transport and the AP-1 mu1 clathrin adaptor UNC-101 localize odorant receptors to olfactory cilia. *Neuron* **31**, 277-87.

- Ellis, M. A., Miedel, M. T., Guerriero, C. J. and Weisz, O. A.** (2004). ADP-ribosylation factor 1-independent protein sorting and export from the trans-Golgi network. *J Biol Chem* **279**, 52735-43.
- Emr, S., Glick, B. S., Linstedt, A. D., Lippincott-Schwartz, J., Luini, A., Malhotra, V., Marsh, B. J., Nakano, A., Pfeffer, S. R., Rabouille, C. et al.** (2009). Journeys through the Golgi--taking stock in a new era. *J Cell Biol* **187**, 449-53.
- Englund, P. T.** (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem* **62**, 121-38.
- Etienne-Manneville, S.** (2004). Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci* **117**, 1291-300.
- Fairn, G. D., Hermansson, M., Somerharju, P. and Grinstein, S.** (2011). Phosphatidylserine is polarized and required for proper Cdc42 localization and for development of cell polarity. *Nat Cell Biol*.
- Fields, I. C., King, S. M., Shteyn, E., Kang, R. S. and Folsch, H.** (2010). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate localization in recycling endosomes is necessary for AP-1B-dependent sorting in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* **21**, 95-105.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Fogg, V. C., Liu, C. J. and Margolis, B.** (2005). Multiple regions of Crumbs3 are required for tight junction formation in MCF10A cells. *J Cell Sci* **118**, 2859-69.
- Folsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S. and Mellman, I.** (1999). A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* **99**, 189-98.
- Folsch, H., Pypaert, M., Maday, S., Pelletier, L. and Mellman, I.** (2003). The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains. *J Cell Biol* **163**, 351-62.
- Fromme, J. C., Orci, L. and Schekman, R.** (2008). Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends Cell Biol* **18**, 330-6.
- Gaidarov, I. and Keen, J. H.** (1999). Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol* **146**, 755-64.
- Gallusser, A. and Kirchhausen, T.** (1993). The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J* **12**, 5237-44.
- Gaynor, E. C. and Emr, S. D.** (1997). COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants. *J Cell Biol* **136**, 789-802.
- Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J. and Baum, B.** (2008). Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol* **18**, 1631-8.
- Ghosh, P. and Kornfeld, S.** (2004). The cytoplasmic tail of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor contains four binding sites for AP-1. *Arch Biochem Biophys* **426**, 225-30.
- Gillooly, D. J., Morrow, I. C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N. J., Gaullier, J. M., Parton, R. G. and Stenmark, H.** (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J* **19**, 4577-88.
- Goldstein, B. and Macara, I. G.** (2007). The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell* **13**, 609-22.
- Gonzalo, S., Greentree, W. K. and Linder, M. E.** (1999). SNAP-25 is targeted to the plasma membrane through a novel membrane-binding domain. *J Biol Chem* **274**, 21313-8.
- Goodman, O. B., Jr. and Keen, J. H.** (1995). The alpha chain of the AP-2 adaptor is a clathrin binding subunit. *J Biol Chem* **270**, 23768-73.

Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. and Benovic, J. L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-50.

Goodwin, J. S., Drake, K. R., Rogers, C., Wright, L., Lippincott-Schwartz, J., Philips, M. R. and Kenworthy, A. K. (2005). Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol* **170**, 261-72.

Gotta, M., Abraham, M. C. and Ahringer, J. (2001). CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr Biol* **11**, 482-8.

Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E. and Skaer, H. (1996). The *Drosophila* genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* **122**, 951-9.

Greaves, J., Prescott, G. R., Gorleku, O. A. and Chamberlain, L. H. (2009). The fat controller: roles of palmitoylation in intracellular protein trafficking and targeting to membrane microdomains (Review). *Mol Membr Biol* **26**, 67-79.

Gribaldo, S., Poole, A. M., Daubin, V., Forterre, P. and Brochier-Armanet, C. (2010). The origin of eukaryotes and their relationship with the Archaea: are we at a phylogenomic impasse? *Nat Rev Microbiol* **8**, 743-52.

Griffiths, G. and Simons, K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**, 438-43.

Hehly, H. and Stamnes, M. (2007). Regulating cytoskeleton-based vesicle motility. *FEBS Lett* **581**, 2112-8.

Hemery, I., Durand-Schneider, A. M., Feldmann, G., Vaerman, J. P. and Maurice, M. (1996). The transcytotic pathway of an apical plasma membrane protein (B10) in hepatocytes is similar to that of IgA and occurs via a tubular pericentriolar compartment. *J Cell Sci* **109** (Pt 6), 1215-27.

Hermann, G. J., Schroeder, L. K., Hieb, C. A., Kershner, A. M., Rabbitts, B. M., Fonarev, P., Grant, B. D. and Priess, J. R. (2005). Genetic analysis of lysosomal trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **16**, 3273-88.

Hirst, J., Bright, N. A., Rous, B. and Robinson, M. S. (1999). Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* **10**, 2787-802.

Hirst, J., L, D. B., Francisco, G. C., Sahlender, D. A., Seaman, M. N., Dacks, J. B. and Robinson, M. S. (2011). The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol* **9**, e1001170.

Hirst, J., Sahlender, D. A., Choma, M., Sinka, R., Harbour, M. E., Parkinson, M. and Robinson, M. S. (2009). Spatial and functional relationship of GGAs and AP-1 in *Drosophila* and HeLa cells. *Traffic* **10**, 1696-710.

Hoegel, C., Constantinescu, A. T., Schwager, A., Goehring, N. W., Kumar, P. and Hyman, A. A. (2010). LGL can partition the cortex of one-cell *Caenorhabditis elegans* embryos into two domains. *Curr Biol* **20**, 1296-303.

Hollander, M. C., Blumenthal, G. M. and Dennis, P. A. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer* **11**, 289-301.

Hollestelle, M. J., Lai, K. W., van Deuren, M., Lenting, P. J., de Groot, P. G., Sprong, T. and Bovenschen, N. (2011). Cleavage of von Willebrand factor by granzyme M destroys its factor VIII binding capacity. *PLoS One* **6**, e24216.

Horiguchi, K., Hanada, T., Fukui, Y. and Chishti, A. H. (2006). Transport of PIP3 by GAKIN, a kinesin-3 family protein, regulates neuronal cell polarity. *J Cell Biol* **174**, 425-36.

Huber, L. A., Pimplikar, S., Parton, R. G., Virta, H., Zerial, M. and Simons, K. (1993). Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J Cell Biol* **123**, 35-45.

- Humphreys, R. C., Krajewska, M., Krnacik, S., Jaeger, R., Weiher, H., Krajewski, S., Reed, J. C. and Rosen, J. M.** (1996). Apoptosis in the terminal endbud of the murine mammary gland: a mechanism of ductal morphogenesis. *Development* **122**, 4013-22.
- Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., Macara, I. G. and Margolis, B.** (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* **5**, 137-42.
- Isakoff, S. J., Cardozo, T., Andreev, J., Li, Z., Ferguson, K. M., Abagyan, R., Lemmon, M. A., Aronheim, A. and Skolnik, E. Y.** (1998). Identification and analysis of PH domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel in vivo assay in yeast. *EMBO J* **17**, 5374-87.
- Jaffe, A. B., Kaji, N., Durgan, J. and Hall, A.** (2008). Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol* **183**, 625-33.
- Jeanes, A., Gottardi, C. J. and Yap, A. S.** (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* **27**, 6920-9.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. and Macara, I. G.** (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* **2**, 531-9.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E.** (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499-509.
- Kametaka, S., Sawada, N., Bonifacino, J. S. and Waguri, S.** (2010). Functional characterization of protein-sorting machineries at the trans-Golgi network in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* **123**, 460-71.
- Kamiguchi, H., Long, K. E., Pendergast, M., Schaefer, A. W., Rapoport, I., Kirchhausen, T. and Lemmon, V.** (1998). The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci* **18**, 5311-21.
- Kampmann, M. and Blobel, G.** (2009). Biochemistry. Nascent proteins caught in the act. *Science* **326**, 1352-3.
- Kanaani, J., Diacovo, M. J., El-Husseini Ael, D., Bredt, D. S. and Baekkeskov, S.** (2004). Palmitoylation controls trafficking of GAD65 from Golgi membranes to axon-specific endosomes and a Rab5a-dependent pathway to presynaptic clusters. *J Cell Sci* **117**, 2001-13.
- Kanai, F., Liu, H., Field, S. J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G. E., Cantley, L. C. and Yaffe, M. B.** (2001). The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* **3**, 675-8.
- Kang, J., Bai, Z., Zegarek, M. H., Grant, B. D. and Lee, J.** Essential roles of snap-29 in *C. elegans*. *Dev Biol* **355**, 77-88.
- Kaplan, O. I., Molla-Herman, A., Cevik, S., Ghossoub, R., Kida, K., Kimura, Y., Jenkins, P., Martens, J. R., Setou, M., Benmerah, A. et al.** (2010). The AP-1 clathrin adaptor facilitates cilium formation and functions with RAB-8 in *C. elegans* ciliary membrane transport. *J Cell Sci* **123**, 3966-77.
- Karp, C. M., Tan, T. T., Mathew, R., Nelson, D., Mukherjee, C., Degenhardt, K., Karantza-Wadsworth, V. and White, E.** (2008). Role of the polarity determinant crumbs in suppressing mammalian epithelial tumor progression. *Cancer Res* **68**, 4105-15.
- Kato, Y., Sugiura, T., Nakadera, Y., Sugiura, M., Kubo, Y., Sato, T., Harada, A. and Tsuji, A.** (2009). Investigation of the role of oligopeptide transporter PEPT1 and sodium/glucose cotransporter SGLT1 in intestinal absorption of their substrates using small GTP-binding protein Rab8-null mice. *Drug Metab Dispos* **37**, 602-7.
- Kavran, J. M., Klein, D. E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y. and Lemmon, M. A.** (1998). Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* **273**, 30497-508.

- Kay, A. J. and Hunter, C. P.** (2001). CDC-42 regulates PAR protein localization and function to control cellular and embryonic polarity in *C. elegans*. *Curr Biol* **11**, 474-81.
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G. and Cheng, N. S.** (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**, 311-20.
- Kirchhausen, T.** (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 705-32.
- Kirchhausen, T.** (2000). Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**, 699-727.
- Klumperman, J., Kuliawat, R., Griffith, J. M., Geuze, H. J. and Arvan, P.** (1998). Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. *J Cell Biol* **141**, 359-71.
- Knust, E. and Bossinger, O.** (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* **298**, 1955-9.
- Kojima, Y., Akimoto, K., Nagashima, Y., Ishiguro, H., Shirai, S., Chishima, T., Ichikawa, Y., Ishikawa, T., Sasaki, T., Kubota, Y. et al.** (2008). The overexpression and altered localization of the atypical protein kinase C lambda/iota in breast cancer correlates with the pathologic type of these tumors. *Hum Pathol* **39**, 824-31.
- Koppen, M., Simske, J. S., Sims, P. A., Firestein, B. L., Hall, D. H., Radice, A. D., Rongo, C. and Hardin, J. D.** (2001). Cooperative regulation of AJM-1 controls junctional integrity in *Caenorhabditis elegans* epithelia. *Nat Cell Biol* **3**, 983-91.
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B. and Echard, A.** (2006). Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr Biol* **16**, 1719-25.
- Krahn, M. P., Klopfenstein, D. R., Fischer, N. and Wodarz, A.** Membrane targeting of Bazooka/PAR-3 is mediated by direct binding to phosphoinositide lipids. *Curr Biol* **20**, 636-42.
- Krahn, M. P., Klopfenstein, D. R., Fischer, N. and Wodarz, A.** (2010). Membrane targeting of Bazooka/PAR-3 is mediated by direct binding to phosphoinositide lipids. *Curr Biol* **20**, 636-42.
- Kumfer, K. T., Cook, S. J., Squirrell, J. M., Eliceiri, K. W., Peel, N., O'Connell, K. F. and White, J. G.** (2010). CGEF-1 and CHIN-1 regulate CDC-42 activity during asymmetric division in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Mol Biol Cell* **21**, 266-77.
- Langevin, J., Morgan, M. J., Sibarita, J. B., Aresta, S., Murthy, M., Schwarz, T., Camonis, J. and Bellaiche, Y.** (2005). *Drosophila* exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane. *Dev Cell* **9**, 365-76.
- Le Borgne, R., Griffiths, G. and Hoflack, B.** (1996). Mannose 6-phosphate receptors and ADP-ribosylation factors cooperate for high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes. *J Biol Chem* **271**, 2162-70.
- Le Borgne, R. and Hoflack, B.** (1997). Mannose 6-phosphate receptors regulate the formation of clathrin-coated vesicles in the TGN. *J Cell Biol* **137**, 335-45.
- Lee, J., Jongeward, G. D. and Sternberg, P. W.** (1994). *unc-101*, a gene required for many aspects of *Caenorhabditis elegans* development and behavior, encodes a clathrin-associated protein. *Genes Dev* **8**, 60-73.
- Lee, M. and Vasioukhin, V.** (2008). Cell polarity and cancer--cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor. *J Cell Sci* **121**, 1141-50.
- Lefkir, Y., de Chasse, B., Dubois, A., Bogdanovic, A., Brady, R. J., Destaing, O., Bruckert, F., O'Halloran, T. J., Cosson, P. and Letourneur, F.** (2003). The AP-1 clathrin-adaptor is required for lysosomal enzymes sorting and biogenesis of the contractile vacuole complex in *Dictyostelium* cells. *Mol Biol Cell* **14**, 1835-51.

- Legouis, R., Gansmuller, A., Sookhareea, S., Boshier, J. M., Baillie, D. L. and Labouesse, M.** (2000). LET-413 is a basolateral protein required for the assembly of adherens junctions in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol* **2**, 415-22.
- Leibfried, A., Fricke, R., Morgan, M. J., Bogdan, S. and Bellaiche, Y.** (2008). *Drosophila* Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis. *Curr Biol* **18**, 1639-48.
- Lemmers, C., Medina, E., Delgrossi, M. H., Michel, D., Arsanto, J. P. and Le Bivic, A.** (2002). hINAD1/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem* **277**, 25408-15.
- Lemmers, C., Michel, D., Lane-Guermonprez, L., Delgrossi, M. H., Medina, E., Arsanto, J. P. and Le Bivic, A.** (2004). CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell* **15**, 1324-33.
- Lemmon, M. A.** (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* **4**, 201-13.
- Lemmon, M. A. and Ferguson, K. M.** (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* **350 Pt 1**, 1-18.
- Letourneur, F. and Klausner, R. D.** (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* **69**, 1143-57.
- Li, J., Kim, H., Aceto, D. G., Hung, J., Aono, S. and Kemphues, K. J.** (2010). Binding to PKC-3, but not to PAR-3 or to a conventional PDZ domain ligand, is required for PAR-6 function in *C. elegans*. *Dev Biol* **340**, 88-98.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D. and Pawson, T.** (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* **2**, 540-7.
- Ling, K., Bairstow, S. F., Carbonara, C., Turbin, D. A., Huntsman, D. G. and Anderson, R. A.** (2007). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase modulates adherens junction and E-cadherin trafficking via a direct interaction with mu 1B adaptin. *J Cell Biol* **176**, 343-53.
- Lisanti, M. P., Caras, I. W., Gilbert, T., Hanzel, D. and Rodriguez-Boulan, E.** (1990). Vectorial apical delivery and slow endocytosis of a glycolipid-anchored fusion protein in transfected MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7419-23.
- Losev, E., Reinke, C. A., Jellen, J., Strongin, D. E., Bevis, B. J. and Glick, B. S.** (2006). Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* **441**, 1002-6.
- Lu, H. and Bilder, D.** (2005). Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **7**, 1232-9.
- Ludwig, T., Le Borgne, R. and Hoflack, B.** (1995). Roles for mannose-6-phosphate receptors in lysosomal enzyme sorting, IGF-II binding and clathrin-coat assembly. *Trends Cell Biol* **5**, 202-6.
- Lui-Roberts, W. W., Collinson, L. M., Hewlett, L. J., Michaux, G. and Cutler, D. F.** (2005). An AP-1/clathrin coat plays a novel and essential role in forming the Weibel-Palade bodies of endothelial cells. *J Cell Biol* **170**, 627-36.
- Ma, D., Taneja, T. K., Hagen, B. M., Kim, B. Y., Ortega, B., Lederer, W. J. and Welling, P. A.** (2011). Golgi export of the Kir2.1 channel is driven by a trafficking signal located within its tertiary structure. *Cell* **145**, 1102-15.
- Ma, Y., Takeuchi, M., Sugiura, R., Sio, S. O. and Kuno, T.** (2009). Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast. *Genes Cells* **14**, 1015-28.
- Maeda, Y. and Kinoshita, T.** (2011). Structural remodeling, trafficking and functions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Prog Lipid Res* **50**, 411-24.

- Makarova, O., Roh, M. H., Liu, C. J., Laurinec, S. and Margolis, B.** (2003). Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* **302**, 21-9.
- Mao, Z., Streets, A. J. and Ong, A. C.** (2011). Thiazolidinediones inhibit MDCK cyst growth through disrupting oriented cell division and apicobasal polarity. *Am J Physiol Renal Physiol* **300**, F1375-84.
- Margeta, M. A., Wang, G. J. and Shen, K.** (2009). Clathrin adaptor AP-1 complex excludes multiple postsynaptic receptors from axons in *C. elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1632-7.
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V. and Mostov, K.** (2007). PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* **128**, 383-97.
- Massol, R. H., Boll, W., Griffin, A. M. and Kirchhausen, T.** (2006). A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10265-70.
- McMahon, L., Legouis, R., Vonesch, J. L. and Labouesse, M.** (2001). Assembly of *C. elegans* apical junctions involves positioning and compaction by LET-413 and protein aggregation by the MAGUK protein DLG-1. *J Cell Sci* **114**, 2265-77.
- Medioni, C., Astier, M., Zmojdzian, M., Jagla, K. and Semeriva, M.** (2008). Genetic control of cell morphogenesis during *Drosophila melanogaster* cardiac tube formation. *J Cell Biol* **182**, 249-61.
- Mellman, I.** (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 575-625.
- Metcalf, D. J., Nightingale, T. D., Zenner, H. L., Lui-Roberts, W. W. and Cutler, D. F.** (2008). Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J Cell Sci* **121**, 19-27.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E. L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K. and Schu, P.** (2000). *mu1A*-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J* **19**, 2193-203.
- Michaelson, D., Ali, W., Chiu, V. K., Bergo, M., Silletti, J., Wright, L., Young, S. G. and Philips, M.** (2005). Postprenylation CAAX processing is required for proper localization of Ras but not Rho GTPases. *Mol Biol Cell* **16**, 1606-16.
- Michaux, G., Gansmuller, A., Hindelang, C. and Labouesse, M.** (2000). CHE-14, a protein with a sterol-sensing domain, is required for apical sorting in *C. elegans* ectodermal epithelial cells. *Curr Biol* **10**, 1098-107.
- Michel, D., Arsanto, J. P., Massey-Harroche, D., Beclin, C., Wijnholds, J. and Le Bivic, A.** (2005). PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J Cell Sci* **118**, 4049-57.
- Mimura, M., Masuda, A., Nishiumi, S., Kawakami, K., Fujishima, Y., Yoshie, T., Mizuno, S., Miki, I., Ohno, H., Hase, K. et al.** (2011). AP1B plays an important role in intestinal tumorigenesis with the truncating mutation of an APC gene. *Int J Cancer*.
- Mironov, A. A., Weidman, P. and Luini, A.** (1997). Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules. *J Cell Biol* **138**, 481-4.
- Montpetit, A., Cote, S., Brustein, E., Drouin, C. A., Lapointe, L., Boudreau, M., Meloche, C., Drouin, R., Hudson, T. J., Drapeau, P. et al.** (2008). Disruption of AP1S1, causing a novel neurocutaneous syndrome, perturbs development of the skin and spinal cord. *PLoS Genet* **4**, e1000296.
- Morais-de-Sa, E., Mirouse, V. and St Johnston, D.** (2010). aPKC phosphorylation of Bazooka defines the apical/lateral border in *Drosophila* epithelial cells. *Cell* **141**, 509-23.
- Moreno-De-Luca, A., Helmers, S. L., Mao, H., Burns, T. G., Melton, A. M., Schmidt, K. R., Fernhoff, P. M., Ledbetter, D. H. and Martin, C. L.** Adaptor protein complex-4 (AP-4)

deficiency causes a novel autosomal recessive cerebral palsy syndrome with microcephaly and intellectual disability. *J Med Genet* **48**, 141-4.

Morris, S. M. and Cooper, J. A. (2001). Disabled-2 colocalizes with the LDLR in clathrin-coated pits and interacts with AP-2. *Traffic* **2**, 111-23.

Mostov, K. E. (1994). Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* **12**, 63-84.

Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. and Robinson, M. S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* **162**, 909-18.

Muller, T., Hess, M. W., Schiefermeier, N., Pfaller, K., Ebner, H. L., Heinz-Erian, P., Ponstingl, H., Partsch, J., Rollinghoff, B., Kohler, H. et al. (2008). MYO5B mutations cause microvillus inclusion disease and disrupt epithelial cell polarity. *Nat Genet* **40**, 1163-5.

Murray, N. R., Jamieson, L., Yu, W., Zhang, J., Gokmen-Polar, Y., Sier, D., Anastasiadis, P., Gatalica, Z., Thompson, E. A. and Fields, A. P. (2004). Protein kinase Ciota is required for Ras transformation and colon carcinogenesis in vivo. *J Cell Biol* **164**, 797-802.

Myllyharju, J. and Kivirikko, K. I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* **20**, 33-43.

Myster, S. H., Cavallo, R., Anderson, C. T., Fox, D. T. and Peifer, M. (2003). Drosophila p120catenin plays a supporting role in cell adhesion but is not an essential adherens junction component. *J Cell Biol* **160**, 433-49.

Naga Prasad, S. V., Laporte, S. A., Chamberlain, D., Caron, M. G., Barak, L. and Rockman, H. A. (2002). Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J Cell Biol* **158**, 563-75.

Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A. and Ohno, S. (2002). Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells* **7**, 1161-71.

Nakagawa, T., Setou, M., Seog, D., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K. and Hirokawa, N. (2000). A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell* **103**, 569-81.

Nakayama, Y., Shivas, J. M., Poole, D. S., Squirrell, J. M., Kulkoski, J. M., Schleede, J. B. and Skop, A. R. (2009). Dynamin participates in the maintenance of anterior polarity in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Dev Cell* **16**, 889-900.

Nam, S. C. and Choi, K. W. (2003). Interaction of Par-6 and Crumbs complexes is essential for photoreceptor morphogenesis in *Drosophila*. *Development* **130**, 4363-72.

Nance, J. (2005). PAR proteins and the establishment of cell polarity during *C. elegans* development. *Bioessays* **27**, 126-35.

Nance, J., Munro, E. M. and Priess, J. R. (2003). *C. elegans* PAR-3 and PAR-6 are required for apicobasal asymmetries associated with cell adhesion and gastrulation. *Development* **130**, 5339-50.

Nickel, W., Brugger, B. and Wieland, F. T. (1998). Protein and lipid sorting between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 493-501.

Nickel, W., Brugger, B. and Wieland, F. T. (2002). Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding. *J Cell Sci* **115**, 3235-40.

Nolan, M. E., Aranda, V., Lee, S., Lakshmi, B., Basu, S., Allred, D. C. and Muthuswamy, S. K. (2008). The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. *Cancer Res* **68**, 8201-9.

Nomanbhoy, T. K., Erickson, J. W. and Cerione, R. A. (1999). Kinetics of Cdc42 membrane extraction by Rho-GDI monitored by real-time fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* **38**, 1744-50.

- Novick, P. and Brennwald, P.** (1993). Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* **75**, 597-601.
- Odorizzi, G. and Trowbridge, I. S.** (1997). Structural requirements for basolateral sorting of the human transferrin receptor in the biosynthetic and endocytic pathways of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* **137**, 1255-64.
- Ohgaki, R., Matsushita, M., Kanazawa, H., Ogihara, S., Hoekstra, D. and van Ijzendoorn, S. C.** (2010). The Na⁺/H⁺ exchanger NHE6 in the endosomal recycling system is involved in the development of apical bile canalicular surface domains in HepG2 cells. *Mol Biol Cell* **21**, 1293-304.
- Ohno, S.** (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 641-8.
- Ohno, Y., Kihara, A., Sano, T. and Igarashi, Y.** (2006). Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 474-83.
- Orci, L., Stamnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T. H. and Rothman, J. E.** (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**, 335-49.
- Orgogozo, V., Schweisguth, F. and Bellaiche, Y.** (2002). Binary cell death decision regulated by unequal partitioning of Numb at mitosis. *Development* **129**, 4677-84.
- Osmani, N., Peglion, F., Chavrier, P. and Etienne-Manneville, S.** (2010). Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J Cell Biol* **191**, 1261-9.
- Palade, G.** (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 867.
- Parker, S., Walker, D. S., Ly, S. and Baylis, H. A.** (2009). Caveolin-2 is required for apical lipid trafficking and suppresses basolateral recycling defects in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **20**, 1763-71.
- Paulick, M. G. and Bertozzi, C. R.** (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* **47**, 6991-7000.
- Pearse, B. M.** (1976). Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 1255-9.
- Pelham, H. R.** (1996). The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct Funct* **21**, 413-9.
- Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H. and Christofori, G.** (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* **392**, 190-3.
- Peterson, M. R., Burd, C. G. and Emr, S. D.** (1999). Vac1p coordinates Rab and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in Vps45p-dependent vesicle docking/fusion at the endosome. *Curr Biol* **9**, 159-62.
- Pettitt, J., Cox, E. A., Broadbent, I. D., Flett, A. and Hardin, J.** (2003). The *Caenorhabditis elegans* p120 catenin homologue, JAC-1, modulates cadherin-catenin function during epidermal morphogenesis. *J Cell Biol* **162**, 15-22.
- Pevsner, J. and Scheller, R. H.** (1994). Mechanisms of vesicle docking and fusion: insights from the nervous system. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 555-60.
- Pfeffer, S. R.** (1994). Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 522-6.
- Ponting, C. P.** (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci* **5**, 2353-7.
- Porter, K. R., Claude, A. and Fullam, E. F.** (1945). A Study of Tissue Culture Cells by Electron Microscopy : Methods and Preliminary Observations. *J Exp Med* **81**, 233-46.
- Prehoda, K. E.** (2009). Polarization of *Drosophila* neuroblasts during asymmetric division. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001388.

- Preising, M. and Ayuso, C.** (2004). Rab escort protein 1 (REP1) in intracellular traffic: a functional and pathophysiological overview. *Ophthalmic Genet* **25**, 101-10.
- Ramachandran, R., Pucadyil, T. J., Liu, Y. W., Acharya, S., Leonard, M., Lukiyanchuk, V. and Schmid, S. L.** (2009). Membrane insertion of the pleckstrin homology domain variable loop 1 is critical for dynamin-catalyzed vesicle scission. *Mol Biol Cell* **20**, 4630-9.
- Randak, C., Langnas, A. N., Kaufman, S. S., Phillips, A. D., Wisecarver, J. L., Hadorn, H. B. and Vanderhoof, J. A.** (1998). Pretransplant management and small bowel-liver transplantation in an infant with microvillus inclusion disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **27**, 333-7.
- Rao, W., Isaac, R. E. and Keen, J. N.** (2011). An analysis of the *Caenorhabditis elegans* lipid raft proteome using geLC-MS/MS. *J Proteomics* **74**, 242-53.
- Rapoport, I., Chen, Y. C., Cupers, P., Shoelson, S. E. and Kirchhausen, T.** (1998). Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J* **17**, 2148-55.
- Razi, M., Chan, E. Y. and Tooze, S. A.** (2009). Early endosomes and endosomal coatome are required for autophagy. *J Cell Biol* **185**, 305-21.
- Regala, R. P., Weems, C., Jamieson, L., Khor, A., Edell, E. S., Lohse, C. M. and Fields, A. P.** (2005). Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **65**, 8905-11.
- Robinson, M. S.** (1994). The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 538-44.
- Robinson, M. S.** (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol* **14**, 167-74.
- Robinson, M. S. and Bonifacino, J. S.** (2001). Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 444-53.
- Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P. J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A. and Bastiaens, P. I.** (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* **307**, 1746-52.
- Roelofsen, H., van der Veere, C. N., Ottenhoff, R., Schoemaker, B., Jansen, P. L. and Oude Elferink, R. P.** (1994). Decreased bilirubin transport in the perfused liver of endotoxemic rats. *Gastroenterology* **107**, 1075-84.
- Rogalski, T. M., Gilchrist, E. J., Mullen, G. P. and Moerman, D. G.** (1995). Mutations in the unc-52 gene responsible for body wall muscle defects in adult *Caenorhabditis elegans* are located in alternatively spliced exons. *Genetics* **139**, 159-69.
- Rohr, S., Bit-Avrágim, N. and Abdelilah-Seyfried, S.** (2006). Heart and soul/PRKCi and nagie oko/Mpp5 regulate myocardial coherence and remodeling during cardiac morphogenesis. *Development* **133**, 107-15.
- Roland, J. T., Bryant, D. M., Datta, A., Itzen, A., Mostov, K. E. and Goldenring, J. R.** (2010). Rab GTPase-Myo5B complexes control membrane recycling and epithelial polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2789-94.
- Rossi, D. J. and Weissman, I. L.** (2006). Pten, tumorigenesis, and stem cell self-renewal. *Cell* **125**, 229-31.
- Rothman, J. E.** (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63.
- Ruemmele, F. M., Muller, T., Schiefermeier, N., Ebner, H. L., Lechner, S., Pfaller, K., Thoni, C. E., Goulet, O., Lacaille, F., Schmitz, J. et al.** (2010). Loss-of-function of MYO5B is the main cause of microvillus inclusion disease: 15 novel mutations and a CaCo-2 RNAi cell model. *Hum Mutat* **31**, 544-51.
- Salaun, C., Greaves, J. and Chamberlain, L. H.** (2010). The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J Cell Biol* **191**, 1229-38.
- Sanders, S. L., Whitfield, K. M., Vogel, J. P., Rose, M. D. and Schekman, R. W.** (1992). Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell* **69**, 353-65.

- Sangiorgio, V., Pitto, M., Palestini, P. and Masserini, M.** (2004). GPI-anchored proteins and lipid rafts. *Ital J Biochem* **53**, 98-111.
- Santiago-Martinez, E., Soplop, N. H., Patel, R. and Kramer, S. G.** (2008). Repulsion by Slit and Roundabout prevents Shotgun/E-cadherin-mediated cell adhesion during Drosophila heart tube lumen formation. *J Cell Biol* **182**, 241-8.
- Saraogi, I. and Shan, S. O.** (2010). Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *Traffic* **12**, 535-42.
- Saraste, J. and Kuismanen, E.** (1984). Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell* **38**, 535-49.
- Sato, K., Sato, M., Audhya, A., Oegema, K., Schweinsberg, P. and Grant, B. D.** (2006). Dynamic regulation of caveolin-1 trafficking in the germ line and embryo of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **17**, 3085-94.
- Sato, T., Mushiake, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A. et al.** (2007). The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature* **448**, 366-9.
- Schmid, S. L.** (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* **66**, 511-48.
- Schuck, S., Gerl, M. J., Ang, A., Manninen, A., Keller, P., Mellman, I. and Simons, K.** (2007). Rab10 is involved in basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Traffic* **8**, 47-60.
- Seabra, M. C. and Coudrier, E.** (2004). Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic* **5**, 393-9.
- Seaman, M. N., McCaffery, J. M. and Emr, S. D.** (1998). A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol* **142**, 665-81.
- Segbert, C., Johnson, K., Theres, C., van Furden, D. and Bossinger, O.** (2004). Molecular and functional analysis of apical junction formation in the gut epithelium of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **266**, 17-26.
- Shahinian, S. and Silvius, J. R.** (1995). Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry* **34**, 3813-22.
- Shi, S. H., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* **112**, 63-75.
- Shibata, Y., Fujii, T., Dent, J. A., Fujisawa, H. and Takagi, S.** (2000). EAT-20, a novel transmembrane protein with EGF motifs, is required for efficient feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **154**, 635-46.
- Shim, J., Sternberg, P. W. and Lee, J.** (2000). Distinct and redundant functions of mu1 medium chains of the AP-1 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **11**, 2743-56.
- Shin, K., Fogg, V. C. and Margolis, B.** (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 207-35.
- Shin, K., Straight, S. and Margolis, B.** (2005). PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol* **168**, 705-11.
- Simmen, T., Honing, S., Icking, A., Tikkanen, R. and Hunziker, W.** (2002). AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* **4**, 154-9.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M. and Stenmark, H.** (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494-8.
- Singh, R. K., Lau, D., Noviello, C. M., Ghosh, P. and Guatelli, J. C.** (2009). An MHC-I cytoplasmic domain/HIV-1 Nef fusion protein binds directly to the mu subunit of the AP-1 endosomal coat complex. *PLoS One* **4**, e8364.

- Sotillos, S., Diaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J. and Campuzano, S.** (2004). DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* **166**, 549-57.
- Spang, A.** (2009). On vesicle formation and tethering in the ER-Golgi shuttle. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 531-6.
- Stengel, K. and Zheng, Y.** (2011). Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal*.
- Stenmark, H., Aasland, R. and Driscoll, P. C.** (2002). The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS Lett* **513**, 77-84.
- Stockli, J., Honing, S. and Rohrer, J.** (2004). The acidic cluster of the CK2 site of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor (CD-MPR) but not its phosphorylation is required for GGA1 and AP-1 binding. *J Biol Chem* **279**, 23542-9.
- Straight, S. W., Shin, K., Fogg, V. C., Fan, S., Liu, C. J., Roh, M. and Margolis, B.** (2004). Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell* **15**, 1981-90.
- Styers, M. L., O'Connor, A. K., Grabski, R., Cormet-Boyaka, E. and Sztul, E.** (2008). Depletion of beta-COP reveals a role for COP-I in compartmentalization of secretory compartments and in biosynthetic transport of caveolin-1. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C1485-98.
- Sugimoto, H., Sugahara, M., Folsch, H., Koide, Y., Nakatsu, F., Tanaka, N., Nishimura, T., Furukawa, M., Mullins, C., Nakamura, N. et al.** (2002). Differential recognition of tyrosine-based basolateral signals by AP-1B subunit mu1B in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* **13**, 2374-82.
- Sundborger, A., Soderblom, C., Vorontsova, O., Evergren, E., Hinshaw, J. E. and Shupliakov, O.** An endophilin-dynamain complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *J Cell Sci* **124**, 133-43.
- Sztul, E., Kaplin, A., Saucan, L. and Palade, G.** (1991). Protein traffic between distinct plasma membrane domains: isolation and characterization of vesicular carriers involved in transcytosis. *Cell* **64**, 81-9.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K. J., Miwa, J. and Ohno, S.** (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **125**, 3607-14.
- Tarpey, P. S., Stevens, C., Teague, J., Edkins, S., O'Meara, S., Avis, T., Barthorpe, S., Buck, G., Butler, A., Cole, J. et al.** (2006). Mutations in the gene encoding the Sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, AP1S2, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* **79**, 1119-24.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. and Fehon, R.** (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **35**, 747-84.
- Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Daniel, J. M., Ireton, R. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hummingbird, D. K. and Reynolds, A. B.** (2000). Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* **148**, 189-202.
- Torii, S., Saito, N., Kawano, A., Zhao, S., Izumi, T. and Takeuchi, T.** (2005). Cytoplasmic transport signal is involved in phogrin targeting and localization to secretory granules. *Traffic* **6**, 1213-24.
- Totong, R., Achilleos, A. and Nance, J.** (2007). PAR-6 is required for junction formation but not apicobasal polarization in *C. elegans* embryonic epithelial cells. *Development* **134**, 1259-68.
- Traub, L. M., Ostrom, J. A. and Kornfeld, S.** (1993). Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *J Cell Biol* **123**, 561-73.

- Ungewickell, E. J. and Hinrichsen, L.** (2007). Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 417-25.
- Vagin, O., Tokhtaeva, E., Yakubov, I., Shevchenko, E. and Sachs, G.** (2008). Inverse correlation between the extent of N-glycan branching and intercellular adhesion in epithelia. Contribution of the Na,K-ATPase beta1 subunit. *J Biol Chem* **283**, 2192-202.
- van de Pavert, S. A., Kantardzhieva, A., Malysheva, A., Meuleman, J., Versteeg, I., Levelt, C., Klooster, J., Geiger, S., Seeliger, M. W., Rashbass, P. et al.** (2004). Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci* **117**, 4169-77.
- Van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C. and Rapoport, T. A.** (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**, 36-44.
- van Hengel, J., D'Hooge, P., Hooghe, B., Wu, X., Libbrecht, L., De Vos, R., Quondamatteo, F., Klempt, M., Brakebusch, C. and van Roy, F.** (2008). Continuous cell injury promotes hepatic tumorigenesis in cdc42-deficient mouse liver. *Gastroenterology* **134**, 781-92.
- van Meer, G. and Simons, K.** (1988). Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* **36**, 51-8.
- Vega-Salas, D. E., Salas, P. J. and Rodriguez-Boulan, E.** (1987). Modulation of the expression of an apical plasma membrane protein of Madin-Darby canine kidney epithelial cells: cell-cell interactions control the appearance of a novel intracellular storage compartment. *J Cell Biol* **104**, 1249-59.
- Vieira, O. V., Verkade, P., Manninen, A. and Simons, K.** (2005). FAPP2 is involved in the transport of apical cargo in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* **170**, 521-6.
- Vleminckx, K., Vakaet, L., Jr., Mareel, M., Fiers, W. and van Roy, F.** (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* **66**, 107-19.
- Wakabayashi, Y., Dutt, P., Lippincott-Schwartz, J. and Arias, I. M.** (2005). Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15087-92.
- Wang, J., Sun, H. Q., Macia, E., Kirchhausen, T., Watson, H., Bonifacino, J. S. and Yin, H. L.** (2007). PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal. *Mol Biol Cell* **18**, 2646-55.
- Wang, Q., Hurd, T. W. and Margolis, B.** (2004). Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust. *J Biol Chem* **279**, 30715-21.
- Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G. and Yin, H. L.** (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **114**, 299-310.
- Watts, J. L., Etemad-Moghadam, B., Guo, S., Boyd, L., Draper, B. W., Mello, C. C., Priess, J. R. and Kempthues, K. J.** (1996). par-6, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3. *Development* **122**, 3133-40.
- Welchman, D. P., Mathies, L. D. and Ahringer, J.** (2007). Similar requirements for CDC-42 and the PAR-3/PAR-6/PKC-3 complex in diverse cell types. *Dev Biol* **305**, 347-57.
- Willenborg, C. and Prekeris, R.** (2011). Apical protein transport and lumen morphogenesis in polarized epithelial cells. *Biosci Rep* **31**, 245-56.

- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E.** (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67-76.
- Wright, L. P. and Philips, M. R.** (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res* **47**, 883-91.
- Yamamoto, K., Fujii, R., Toyofuku, Y., Saito, T., Koseki, H., Hsu, V. W. and Aoe, T.** (2001). The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **20**, 3082-91.
- Yap, A. S., Niessen, C. M. and Gumbiner, B. M.** (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* **141**, 779-89.
- Zaremba, S. and Keen, J. H.** (1983). Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *J Cell Biol* **97**, 1339-47.
- Zegers, M. M. and Hoekstra, D.** (1998). Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells. *Biochem J* **336** (Pt 2), 257-69.
- Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C. and Korsmeyer, S. J.** (2000). Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* **290**, 1761-5.
- Zhang, H., Abraham, N., Khan, L. A., Hall, D. H., Fleming, J. T. and Gobel, V.** (2011). Apicobasal domain identities of expanding tubular membranes depend on glycosphingolipid biosynthesis. *Nat Cell Biol* **13**, 1189-201.
- Zhang, H., Squirrell, J. M. and White, J. G.** (2008). RAB-11 permissively regulates spindle alignment by modulating metaphase microtubule dynamics in *Caenorhabditis elegans* early embryos. *Mol Biol Cell* **19**, 2553-65.
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Liang, S., Barchetti, A., Giannakakis, A., Cadungog, M. G., O'Brien-Jenkins, A., Massobrio, M., Roby, K. F. et al.** (2006). Integrative genomic analysis of protein kinase C (PKC) family identifies PKC ϵ as a biomarker and potential oncogene in ovarian carcinoma. *Cancer Res* **66**, 4627-35.
- Zhu, Y., Traub, L. M. and Kornfeld, S.** (1998). ADP-ribosylation factor 1 transiently activates high-affinity adaptor protein complex AP-1 binding sites on Golgi membranes. *Mol Biol Cell* **9**, 1323-37.
- Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., von Figura, K. and Schu, P.** (1999). Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J Biol Chem* **274**, 5385-90.

RÉSUMÉ

La polarité épithéliale est un processus essentiel au cours du développement d'un organisme. Ici, nous nous focalisons sur le tissu épithélial intestinal et épidermal de *C. elegans* pour comprendre comment la cellule maintient sa polarité en définissant un pôle apical et un pôle basolatéral. Afin d'assurer la mise en place et le maintien de cette polarité, des protéines appelées déterminants de polarité interviennent. Parmi ces déterminants, le module PAR-3/PAR-6/aPKC et CDC-42 sont des acteurs majeurs pour spécifier la polarité apicale.

Nous avons montré que le complexe adaptateur pour la clathrine AP-1, un régulateur clé du trafic intracellulaire remplit une fonction inattendue dans ce processus. En effet, nous avons confirmé le rôle d'AP-1 dans le tri basolatéral observé chez les mammifères, mais de façon intéressante nous avons démontré qu'AP-1 contrôle également le tri apical d'une protéine transmembranaire ainsi que la localisation asymétrique apicale de CDC-42 et PAR-6. En effet, l'inhibition d'AP-1 cause une délocalisation basolatérale de CDC-42 et PAR-6. La perte de fonction d'AP-1 induit une conversion de la membrane latérale en membrane apicale et la formation de lumières intestinales ectopiques.

La perte de fonction du complexe AP-1 induit également une létalité embryonnaire qui peut s'expliquer par le phénotype identifié dans l'épiderme. Dans cet épithélium, AP-1 contrôle l'intégrité des jonctions cellulaires et notamment le tri apical de la E-cadhérine.

Nos résultats démontrent une fonction essentielle d'AP-1 dans le tri apical, directement responsable du maintien de la polarité épithéliale.

Mots-clés : complexe AP-1, CDC-42, tri apical, polarité épithéliale, jonctions cellulaires.

SUMMARY

Epithelial polarity is an essential process occurring during organisms development. Here we focus on the *C. elegans* intestinal and epidermal epithelial tissue to better understand how the cell maintains its polarity by defining an apical and a basolateral membrane. The establishment and the maintenance of this polarity is ensured by polarity determinants proteins and among this, the PAR3/PAR-6/aPKC and CDC-42 are essential components to specify apical polarity.

We have shown that the clathrin adaptor complex AP-1, an essential regulator of intracellular traffic, is involved in that process. We confirmed that AP-1 is indeed implicated in basolateral cargo sorting, consistent with mammalian AP-1 function but surprisingly AP-1 also controls the apical sorting of a transmembrane protein as well as the asymmetric localisation of PAR-6 and CDC-42. The AP-1 loss of function induces a conversion of the lateral membrane into apical identity and eventually the formation of ectopic lumens.

The AP-1 inhibition also causes an embryonic lethality which may be explained by the phenotype observed within the epidermis. In that context, AP-1 controls the cell junction integrity and interestingly the apical sorting of E-cadherin.

Together our data demonstrate an essential function for AP-1 in apical sorting that directs epithelial polarity maintenance.

Key words: AP-1 complex, CDC-42, apical sorting, epithelial polarity, cell junctions.