

## CARACTERISATION DE LA PROTEINE ALIX ET DE LA MACHINERIE ESCRT CHEZ L'AMIBE DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM.UN LIEN ENTRE ENDOCYTOSE ET SIGNALISATION DEVELOPPEMENTALE?

Sara Mattei

### ▶ To cite this version:

Sara Mattei. CARACTERISATION DE LA PROTEINE ALIX ET DE LA MACHINERIE ESCRT CHEZ L'AMIBE DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM.UN LIEN ENTRE ENDOCYTOSE ET SIGNALISATION DEVELOPPEMENTALE?. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011554

## HAL Id: tel-00011554 https://theses.hal.science/tel-00011554

Submitted on 7 Feb 2006

**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.



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I UFR DE BIOLOGIE

## THESE

Pour l'obtention du grade de

#### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I

**Discipline : Biologie Cellulaire** 

Présentée et soutenue publiquement par

#### Sara MATTEI

Le 19 décembre 2005

## Caractérisation de la protéine Alix et de la machinerie ESCRT chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*.

Un lien entre endocytose et signalisation développementale ?

Co-Direction de thèse :

Mr Michel SATRE Mme Laurence AUBRY

Membres du Jury :

Mr Rémy SADOUL Mme Rosine HAGUENAUER-TSAPIS Mr François LETOURNEUR Examinateur Rapporteur Rapporteur

Thèse préparée au sein du laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés DRDC/CEA-Grenoble

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au Commissariat à l'Energie Atomique de Grenoble, dans le laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés dirigé M. Michel Satre. Je tiens à lui exprimer ma très grande reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour ces conseils et son soutien tout au long de ce travail.

Je remercie M. le Professeur Rémy Sadoul d'avoir accepté la présidence du jury de cette thèse et pour l'intérét qu'il a manifesté vis à vis de ce travail. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Mme Rosine Haguenauer-Tsapis et à M. François Letourneur pour m'avoir donnée de leur temps précieux afin d'évaluer ce travail et pour l'intéressante discussion lors de la soutenance.

Puisque j'étais trop émue le 19 décembre pour le dire de vive voix, je profite de cette page pour dire un immense merci à mon directeur de thèse. Mme Laurence Hubry, pour la compétence avec laquelle elle a dirigé ce travail, pour sa disponibilité, sa gentillesse, nos passionnantes discussions et son engagement qui est allé bien au delà de ce qu'on pouvait attendre d'un directeur de thèse. Ces quatre années ont été une très belle aventure grâce à toi. Merci.

Je tiens également à exprimer mes plus vifs remerciements à M. Gérard Klein pour ses nombreux conseils, pour m'avoir initiée aux joies de la biochimie et tenté de m'initier à celles de la bioinformatique... mais également pour avoir grandement enrichi ma collection de CD...

Merci à tous les membres du laboratoire BBOI et tout particulièrement à ceux de l'équipe Dicty : Nelly, Magali, Karine, Franz, Bernard, les Sebastiens et Jérémie pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre soutien tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier Christelle, Nicole, Nathalie, Toff, Christian, Denis, Arnaud et Laurent pour m'avoir si souvent conseillée, soutenue et fait rire pendant ces quatre années. Merci pour les barbecues, les margharitas, les week-ends au ski...

Je tiens à dédier cette thèse à tous les membres de la Tribu sans qui elle n'aurait pas existé. Merci d'être là, de vos encouragements et de votre soutien sans faille depuis si longtemps. J'ai beaucoup de chance...Je la dédie également à mon compagnon, Eric, à qui je témoigne ici tout mon amour.

#### Résumé :

Ce travail a porté sur l'étude de la protéine multimodulaire Alix chez *Dictyostelium discoideum*, un organisme eucaryote où développement multicellulaire et programme de mort cellulaire sont étroitement liés. L'invalidation d'*alx* montre que cette protéine est essentielle à la différenciation cellulaire et à la morphogenèse au cours du développement multicellulaire mais pas au programme de mort. Une approche structure/fonction a révélé que le domaine susceptible de participer à des torsades d'hélices de cette protéine est indispensable à sa fonction développementale. De plus, sa distribution cellulaire indique qu'Alix est localisé dans la voie endocytaire en association avec la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), impliquée dans le tri et la formation du corps multivésiculaire (MVB). Cependant, l'invalidation des gènes codants pour différents composants des complexes ESCRT induit des phénotypes dissemblables. Ceci suggère que soit ces protéines ont des rôles dans d'autres processus cellulaires soit que cette voie n'est pas perturbée de la même façon dans les différents mutants.

MOTS-CLÉS : Dictyostelium, développement, Alix, ESCRT, MVB

#### Summary :

In this study, we have characterized the multimodular protein Alix in *Dictyostelium discoideum*. In this eucaryotic organism, the developmental cycle includes a multicellular phase that involves both differentiation and a programmed cell death. The disruption of *alx* leads to a major developmental defect and an aberrant morphogenesis but the programmed cell death is not impaired. A structure/function approach reveals that the coiled-coil domain is essential for the Alix developmental function. In addition, we show that Alix is associated with the endosomal pathway in collaboration with the ESCRT machinery involved in the sorting of the membrane proteins and the biogenesis of the multivesicular body (MVB). The disruption of the components of the MVB sorting machinery leads to different phenotypes suggesting either additional roles in other processes for some components or a differential implication of the proteins in this process.

KEYWORDS : Dictyostelium, development, Alix, ESCRT, MVB

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADNc	:	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	:	adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
Amp <sup>r</sup>	:	cassette de résistance à l'ampicilline
ARN	:	acide ribonucléique
ATP	:	adénosine 5'-triphosphate
BrEt	:	bromure d'éthidium
BSA	:	albumine sérique bovine
CHES	:	acide N-cyclohexyl-2-aminoéthane sulfonique
DEPC	:	diethylpyrocarbonate
DMPC	:	dimethylpyrocarbonate
dNTP	:	désoxynucléotide triphosphate
ESCRT	:	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
Généticine <sup>r</sup>	:	cassette de résistance à la généticine
Hepes	:	acide 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethane sulfonique
kDa	:	kilodaltons
kDa Mes	:	kilodaltons acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique
kDa Mes MOPS	: : :	kilodaltons acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique acide morpholino-propane sulfonique
kDa Mes MOPS MVB	: : :	kilodaltons acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique acide morpholino-propane sulfonique corps multivésiculaire
kDa Mes MOPS MVB PBS	: : : :	kilodaltons acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique acide morpholino-propane sulfonique corps multivésiculaire tampon phosphate salin
kDa Mes MOPS MVB PBS PFA	: : : :	kilodaltons acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique acide morpholino-propane sulfonique corps multivésiculaire tampon phosphate salin paraformaldéhyde
kDa Mes MOPS MVB PBS PFA PCR	: : : : :	kilodaltons acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique acide morpholino-propane sulfonique corps multivésiculaire tampon phosphate salin paraformaldéhyde réaction de polymérisation de l'ADN en chaîne
kDa Mes MOPS MVB PBS PFA PCR PIPES	: : : : : :	kilodaltons acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique acide morpholino-propane sulfonique corps multivésiculaire tampon phosphate salin paraformaldéhyde réaction de polymérisation de l'ADN en chaîne acide piperazine-1,4-bis (2-ethane sulfonique)
kDa Mes MOPS MVB PBS PFA PCR PIPES p/v	: : : : : :	kilodaltons acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique acide morpholino-propane sulfonique corps multivésiculaire tampon phosphate salin paraformaldéhyde réaction de polymérisation de l'ADN en chaîne acide piperazine-1,4-bis (2-ethane sulfonique) poids pour volume
kDa Mes MOPS MVB PBS PFA PCR PIPES p/v v/v	: : : : : : :	kilodaltons acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique acide morpholino-propane sulfonique corps multivésiculaire tampon phosphate salin paraformaldéhyde réaction de polymérisation de l'ADN en chaîne acide piperazine-1,4-bis (2-ethane sulfonique) poids pour volume volume pour volume
kDa Mes MOPS MVB PBS PFA PCR PIPES p/v v/v SDS	: : : : : : :	kilodaltons acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique acide morpholino-propane sulfonique corps multivésiculaire tampon phosphate salin paraformaldéhyde réaction de polymérisation de l'ADN en chaîne acide piperazine-1,4-bis (2-ethane sulfonique) poids pour volume volume pour volume dodécyl sulfate de sodium
kDa Mes MOPS MVB PBS PFA PCR PIPES p/v v/v SDS TBS	: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	kilodaltons acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique acide morpholino-propane sulfonique corps multivésiculaire tampon phosphate salin paraformaldéhyde réaction de polymérisation de l'ADN en chaîne acide piperazine-1,4-bis (2-ethane sulfonique) poids pour volume volume pour volume dodécyl sulfate de sodium tampon Tris salin

I. L'endocytose	5
1. Généralités	5
2. Le corps multivésiculaire	
II. L'amibe Dictyostelium discoideum	
1. Un organisme modèle	
2. Le cycle de différenciation	
3. Les différents types cellulaires	41
4. La mort des cellules tiges	
III. Les objectifs de la thèse	45

## 

I.	Techniques de Biologie Cellulaire	
1.	Souches et Méthodes de culture	49
2.	Electroporation de D. discoideum et clonage sur tapis de K. aerogenes	51
3.	Test du développement en monocouche	
4.	Immunofluorescence	
5.	Marquage β-galactosidase et GFP	53
II.	Techniques de Biologie Moléculaire	
1.	Sous-clonage	55
2.	Southern-blot	
3.	Northern-blot	
III.	Techniques de Biochimie	61
1.	Expression de protéines recombinantes	61
2.	Pull-Down	63
3.	Purification des anticorps	64
4.	Analyse des protéines par immunodétection	65
5.	Fractionnement	66
6.	Immunoprécipitation	
7.	Inhibition du protéasome	69
8.	Biotinylation	69
IV.	Le système Double-Hybride	
1.	Principe	71
2.	Description du système utilisé	71
3.	Les vecteurs	71
4.	Les milieux de culture	72
5.	Les grandes étapes du criblage	73
6.	Protocoles des différentes étapes	75

RESULTATS	77
Chapitre I: Caractérisation de la protéine Alix chez Dictyostelium	79
I. La protéine Alix de <i>Dictyostelium</i>	81
1. Description du gène et de la protéine	81
2. Production d'anticorps anti-Alix	83
3. Expression spatio-temporelle de Dd-Alix	84
II. Obtention et caractérisation de la souche <i>alx</i> nulle	85
1. Obtention de la souche <i>alx</i> nulle	86
2. Caractérisation de la souche <i>alx</i> nulle	88
III. Localisation intracellulaire de Dd-Alix	94
1. Dd-Alix est partiellement associé à une fraction membranaire	94
2. La protéine Âlix est présente sur des structures vésiculaires	95
3. Dd-Alix est associé à des compartiments endocytaires précoces	98
IV. Etude fonctionnelle de la protéine Dd-Alix	100
1. Le domaine médian de Dd-Alix est essentiel à la fonction développementale de la protéine	100
2. La surexpression d'Alix dans la souche parentale induit la régulation négative de la protéine	
endogène	103

	3.	Le domaine coiled-coil est nécessaire à la localisation nucléaire et le domaine Nt à la localisation	
	vés	iculaire	106
V	. ]	Discussion	. 109
	1.	Dd-Alix est essentiel au développement multicellulaire de Dictyostelium	109
	2.	Dd-Alix n'est pas nécessaire à la mort des tiges	109
	3.	Alix est une protéine multimodulaire dont le domaine coiled-coil est essentiel à la fonction	
	dév	eloppementale	110
	4.	Dd-Alix est associé à la voie endocytaire	113
	5.	Dd-Alix régule son niveau d'expression	113

Chapitre II: Alix et la machinerie ESCRT:	115
I. La machinerie ESCRT chez <i>Dictyostelium</i>	117
1. Recherche des homologues des composants de la machinerie ESCRT	117
2. Description des protéines Dd-Tsg101, Dd-Vps4 et Dd-Vps32	118
3. Développement d'anticorps spécifiques de Dd-Tsg101, Dd-Vps4 et Dd-Vps32	122
II. Alix fonctionne dans la voie endocytaire en association avec certains des composants o	de
la machinerie ESCRT	124
1. Analyse des vésicules Alix-positives	124
2. L'invalidation d'Alix conduit à une modification du profil protéique de la membrane plasmique.	127
3. Apport des mutants ESCRT	128
III. Caractérisation du mutant tsg101 nul	139
1. Les souches <i>alx</i> et <i>tsg101</i> nulles ont un phénotype développemental différent	139
2. Tsg101 est impliqué dans le contrôle de l'expression de la protéine Alix	141
IV. Discussion	143
1. Le génome de <i>Dictyostelium</i> contient tous les homologues de la machinerie ESCRT	143
2. Les vésicules Alix-positives portent la protéine Vps32 et des protéines ubiquitinées	143
3. Formation de compartiments de classe É chez <i>Dictyostelium</i>	144
4. Les acteurs de la machinerie ont des rôles différentiels	145
5. Tsg101 est impliqué dans le contrôle de l'expression de Dd-Alix	147

## 

I.	Recherche de nouveaux partenaires d'Alix	
1.	Elaboration de l'appât	151
2.	Analyse sommaire des clones positifs	153
II.	Analyse du lien entre Alix et l'ubiquitine	
1.	Dd-Alix est ubiquitiné dans la Levure	154
2.	Le site d'ubiquitination est porté par le domaine PP	156
3.	Alix est ubiquitiné chez Dictyostelium	157
Ш.	La Formine, un partenaire d'Alix ?	
1.	Description des deux formines identifiées	160
2.	Confirmation de l'interaction entre AlixCPP et la Formine 1 chez la Levure	161
3.	Confirmation de l'interaction entre le domaine FH2 de la Formine 1 et Dd-Alix in vitro	162
4.	La Formine 1 est-elle un partenaire d'Alix in vivo?	164
IV.	Discussion	
1.	Dd-Alix est ubiquitiné	168
2.	Dd-Alix interagit avec les formines?	170

CONCLUSIONS	
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	

# INTRODUCTION

#### I. L'ENDOCYTOSE

#### 1. Généralités

#### a) Les différents types d'endocytose

Le terme générique d'endocytose désigne l'ensemble des processus permettant à une cellule d'internaliser aussi bien des liquides que des solides en les englobant dans des vésicules dérivées de la membrane plasmique. Le matériel internalisé est ensuite transféré vers un ensemble hétérogène de vésicules regroupées sous le nom de compartiment endocytaire. Ces vésicules vont permettre, soit le recyclage du matériel internalisé vers la membrane plasmique, soit sa dégradation en le transportant aux compartiments lysosomaux. L'endocytose assure ainsi l'entrée de nutriments dans la cellule, de molécules effectrices (hormones, facteurs de croissance, anticorps...) mais aussi de pathogènes (virus et bactéries) qui profitent de ces mécanismes pour pénétrer dans la cellule (Pelkmans and Helenius, 2003). Selon le type de matériel endocyté et les acteurs moléculaires utilisés pour l'internalisation, différents termes sont utilisés (voir Fig.1) (pour revues, voir Conner and Schmid (2003) et Johannes and Lamaze (2002 ):



Figure 1: Représentation schématique des différentes catégories d'endocytose. La phagocytose permet l'entrée de grosses particules solides. La macropinocytose permet l'entrée de grands volumes de fluide et de molécules solubles. La voie clathrine-dépendante fait intervenir la dynamine et permet l'internalisation de récepteurs spécifiques. L'endocytose dépendant de la cavéoline se fait au niveau de domaines lipidiques particuliers riches en cholestérol, grâce à une protéine transmembranaire, la cavéoline, et dépend également de la dynamine. L'internalisation par les radeaux lipidiques se fait également au niveau de domaines lipidiques particuliers mais elle est indépendante de la cavéoline. Elle peut faire intervenir la dynamine. (Figure adaptée de Conner and Schmid, 2003).

#### • La pinocytose ou endocytose de phase fluide

La pinocytose permet l'entrée de fluide dans la cellule. On distingue la micropinocytose qui génère des vésicules inférieures à 200 nm de diamètre de la macropinocytose générant des vésicules supérieures à 1  $\mu$ m. La quantité de matériel extracellulaire internalisée est directement proportionnelle à sa concentration dans le milieu et le volume de la vésicule de transport. Ce processus très dynamique, sous-tendu par le cytosquelette d'actine, est constitutif dans certaines lignées tumorales et

dans les souches axéniques de *Dictyostelium discoideum*, mais il est le plus souvent induit par des facteurs de croissance et des agents mitogènes.

#### • La phagocytose

La phagocytose permet l'entrée dans la cellule de particules solides de plus de 0,5 µm de diamètre comme des bactéries et des débris cellulaires ou encore des billes de latex pour des besoins expérimentaux. Elle a une fonction nutritive chez certains organismes comme *Dictyostelium* et un rôle immunitaire chez les organismes plus complexes. La formation du phagosome comprend 4 étapes : la liaison de la particule à la surface cellulaire via un récepteur, la mise en place d'un réseau sous-cortical de F-actine, l'émission de pseudopodes qui vont entourer complètement la particule et l'englober dans une vésicule et enfin, le départ du manteau d'actine pour permettre la fusion avec les lysosomes (formation de phagolysosomes). Le récepteur qui reconnait la particule à internaliser est le plus souvent de type lectine. Cependant, les phagocytes professionnels commes les neutrophiles, les cellules dentritiques et les macrophages présentent une plus grande diversité de récepteurs phagocytiques couplés à des voies de signalisation distinctes. Le terme de phagosome regroupe en réalité une grande hétérogénéité de vésicules qui varient suivant le type de récepteurs utilisés et le type de particules internalisées et dont la composition protéique évolue depuis le moment de leur formation à la membrane plasmique jusqu'à la formation du phagolysosome (pour revue, voir Jutras and Desjardins (2005)).

#### • L'endocytose à récepteurs via les puits recouverts de clathrine

L'endocytose à récepteurs permet une reconnaissance spécifique des molécules à internaliser ainsi qu'une concentration du ligand dans la vésicule formée (Anderson et al., 1977). L'internalisation se fait au niveau de régions spécialisées de la membrane plasmique, appelées puits recouverts de clathrine. La clathrine est composée de six chaînes polypeptidiques (trois chaînes lourdes et trois chaînes légères) assemblées en une structure à trois branches appelée triskèle. Ces triskèles peuvent s'auto-assembler pour former une cage rigide autour de la vésicule (Ungewickell and Branton, 1981). La formation de la cage de clathrine nécessite de nombreuses autres protéines (pour revue, Mousavi et

La formation de la cage de claimme necessite de nonoreuses autres proteines (pour revue, Mousavi et al., 2004), notamment le complexe hétérotétramérique AP-2 (AP, *adaptor* ou *assembly protein*) composé de deux grandes sous-unités d'environ 100 kDa appelées adaptine- $\alpha$  et adaptine- $\beta$ 2, d'une sous-unité moyenne d'environ 50 kDa, l'adaptine- $\mu$ 2 et une petite sous-unité d'environ 17 kDa, l'adaptine- $\sigma$ 2 (Kirchhausen, 1999). Ce complexe adopte une structure dite en « tête de Mickey » comme le montre la Fig.2.



Figure 2 : Clathrine et complexe AP-2. A . Représentation schématique d'un triskèle de clathrine : 3 chaînes lourdes et 3 chaînes légères s'associent en une structure à trois branches. Les chaînes lourdes interagissent avec la sous-unité  $\beta 2$  de la protéine AP-2. B . Image de microscopie électronique d'une cage de clathrine : Les triskèles de clathrine s'associent entre eux pour former une cage. C : Le complexe AP-2 : il est composé de 4 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta 2$ ,  $\mu 2$  et  $\sigma 2$ ). Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta 2$  constituent le corps du complexe et  $\mu 2$  et  $\sigma 2$  se situent au coeur de la molécule. (Fig 2A et B d'après D. Owen et P. Evans. The ELSO gazette, 2002 ; Fig 2C d'après (Mousavi et al., 2004)).

La formation du manteau de clathrine au niveau de la membrane plasmique induit son invagination mais la fission permettant la séparation de la vésicule fait intervenir la dynamine (pour revue (Sever, 2002)). La dynamine est une GTPase qui peut s'auto-assembler pour former un collier autour du col de membrane reliant la vésicule à la membrane plasmique. L'hydrolyse du GTP induit un changement de conformation qui entraîne la séparation de la vésicule de la membrane plasmique par constriction ou par étirement. La vésicule ainsi libérée dans le cytosol perd son manteau de clathrine en moins d'une minute (Cremona, 2001) sous l'effet de l'ATPase Hsc70 (*Heat Shock Cognate* 70 kDa) et de son cofacteur, l'auxiline (Ungewickell et al., 1995). Elle pourra alors fusionner avec les endosomes précoces.

#### • L'endocytose via les radeaux lipidiques et les cavéoles

Les radeaux lipidiques sont des régions de la membrane plasmique présentant un enrichissement particulier en cholestérol, sphingolipides et protéines avec une ancre lipidique. Leur insolubilité en détergent à froid est une particularité souvent utilisée pour leur isolement.

Certaines de ces régions contiennent de la cavéoline, une protéine transmembranaire qui lie le cholestérol. Elles prennent alors le nom de cavéoles. L'endocytose cavéolaire a été bien caractérisée dans les cellules endothéliales. Elle est constitutive et dépend de la dynamine (Oh et al., 1998). Dans ces cellules, les cavéoles peuvent constituer 10 à 20 % de la surface cellulaire. Dans les autres types cellulaires, la mise en oeuvre d'une endocytose cavéole-dépendante est plus contreversée. Il s'agit alors d'un processus régulé et la dynamine est recrutée en réponse à un signal (Pelkmans et al., 2002). Cette endocytose nécessite également un réarrangement du cytosquelette d'actine.

Les cavéoles représentent un type de microdomaines lipidiques de la membrane plasmique. Les autres microdomaines riches en cholestérol sont généralement appelés radeaux (lipidiques) ; ce sont des petites structures d'environ 50 nm de diamètre présentes un peu partout à la surface cellulaire. L'internalisation par les radeaux lipidiques a été mise en évidence en montrant l'existence d'une activité endocytaire indépendante de la clathrine et de la dynamine qui conduit notamment à l'entrée de la ricine, une toxine de plante qui lie les glycolipides et les glycoprotéines (Llorente et al., 1998), de protéines ayant une ancre GPI (Sabharanjak et al., 2002) ou encore de la toxine cholérique qui lie le ganglioside GM1, un marqueur de raft (Kirkham et al., 2005). Cette dernière peut toutefois être également internalisée via la voie clathrine et les cavéoles. Certaines voies d'entrée par les radeaux lipidiques font aussi intervenir la dynamine. C'est le cas pour l'internalisation du récepteur à l'interleukine 2 (Lamaze et al., 2001) et du récepteur aux  $\gamma$ c cytokines (Sauvonnet et al., 2005) (Pour revue concernant ce type endocytose voir Kirkham and Parton (2005)).

#### b) Les compartiments endocytaires

La nomenclature des compartiments endocytaires varie selon le type cellulaire ou encore les auteurs. Cependant, deux grandes catégories de compartiments ont été identifiées : les endosomes et les lysosomes. La catégorie des endosomes peut être subdivisée en deux classes : les endosomes précoces qui regroupent les endosomes de tri et de recyclage et les endosomes tardifs. Cette division repose essentiellement sur des caractérisations cinétiques d'internalisation de marqueurs et la présence de protéines spécifiques de ces différents compartiments. Parmi elles, les protéines de la famille des Rab qui sont des petites GTPases qui régulent notamment le transport vésiculaire, la fusion et l'attachement des vésicules dans l'endocytose et l'exocytose. Les protéines Rab4, Rab5 et Rab11 sont généralement associées aux endosomes précoces, alors que les protéines Rab7 et Rab9 sont spécifiques des endosomes tardifs (pour revue (Seabra and Wasmeier, 2004)). Les récepteurs membranaires qui empruntent la voie de recyclage comme le récepteur à la transferrine sont également des marqueurs des endosomes précoces, alors que les endosomes tardifs est un marqueur des endosomes tardifs. Enfin, les endosomes tardifs et les lysosomes sont enrichis en glycoprotéines de la famille lamp, généralement absentes des autres compartiments endocytaires.



Figure 3 Représentation schématique des différents compartiments endocytaires. Suite à son internalisation depuis un puits recouvert de clathrine, le récepteur est envoyé à un endosome de tri (1). Suivant son devenir, le récepteur peut recycler à la membrane plasmique directement (2) soit en passant par un endosome de recyclage (3). S'il doit être dégradé, le récepteur est reconnu par la machinerie de tri et de formation de l'endosome multivésiculaire (MVB) qui le séquestre dans les vésicules internes de ce compartiment (4). Cette machinerie reconnait également les protéines issues de la voie de néosynthèse (5). Ce compartiment évolue/fusionne avec les endosomes tardifs (6) puis avec les lysosomes permetttant la dégradation de son contenu (7). Dans certains types cellulaires, l'endosome multivésiculaire fusionne avec la membrane plasmique, libérant ainsi des exosomes (8). D'après Raiborg et al. (2003).

#### Les endosomes

Le matériel internalisé transite tout d'abord par un endosome de tri. Le pH légèrement acide (proche de 6) de ce compartiment favorise la dissociation des différents ligands de leur récepteur.



Figure 4 : Les endosomes précoces.

La morphologie de ces compartiments a été chez particulièrement étudiée les mammifères. Les endosomes de tri possèdent une région centrale plutôt vésiculaire de laquelle émane un réseau de fins tubules (Gruenberg and Maxfield, 1995). Les récepteurs devant être recyclés mais qui ne présentent aucun signal particulier vont ségréger dans les régions tubulaires de l'endosome de tri en suivant le flux membranaire. C'est la voie de recyclage par défaut. La forme en tubules assure un

ratio surface membranaire/volume bien supérieur à celui de la région vésiculaire et permettrait ainsi de concentrer passivement des protéines dépourvues de signaux spécifiques (Maxfield and McGraw, 2004). Ces protéines repartent à la membrane plasmique soit directement soit en passant par l'endosome de recyclage au pH proche de 6,5 et composé également de longs tubules membranaires.

Pour le moment, aucun signal spécifique pour le recyclage n'a pu être mis en évidence. Cependant, plusieurs études réalisées sur les GPCR (récepteurs couplés aux protéines G) de mammifères ont montré l'importance de différentes séquences situées sur la queue cytoplasmique des récepteurs pour un tri « actif » vers la voie de recyclage et non pas par défaut (Gage et al., 2001 ; Galet et al., 2003 ; Vargas and Von Zastrow, 2004).

Les récepteurs devant être dégradés poursuivent leur cheminement dans la voie endocytaire. Différents motifs de tri ont été identifiés dans les domaines cytosoliques des protéines transmembranaires (Gruenberg, 2001 ; Maxfield and McGraw, 2004). On peut citer par exemple les signaux YXX $\Phi$  (où Y= tyrosine, X = un acide aminé quelconque et  $\Phi$ = un acide aminé avec une chaîne latérale hydrophobe) et [DE] XXXL[LI] (où D = acide aspartique, E = acide glutamique, X= un acide aminé quelconque, L = leucine et I = isoleucine) qui sont essentiels pour une internalisation rapide des protéines mais également pour le ciblage aux lysosomes (pour revue voir Bonifacino and Traub (2003)). En plus de ces motifs, de nombreuses protéines membranaires ciblées à la dégradation ont été montrées comme ubiquitinées. Cette ubiquitination intervient à la fois comme signal d'internalisation à la membrane plasmique et comme signal de tri vers les lysosomes (Aguilar and Wendland, 2003) (voir Chapitre 2 de l'Introduction).

L'endosome tardif (pH entre 5 et 6) est rejoint par les protéines membranaires issues de l'endosome de tri et destinées à la dégradation, mais également par des protéines issues de la voie de néosynthèse.



Figure 5 : Les endosomes tardifs.

Le terme d'endosomes tardifs regroupe un ensemble de vésicules possédant elles-même des vésicules internes et/ou des réseaux multilamellaires. Suivant les auteurs, une partie de ces vésicules (les corps multivésiculaires ou MVB) assurent le transport entre deux compartiments intracellulaires stables : l'endosome précoce et l'endosome tardif. C'est le modèle dit de « navette ». L'autre modèle dit de « maturation » propose que l'endosome

précoce soit formé *de novo*, probablement par fusion des différentes vésicules d'endocytose. Sa composition évolue, d'une part, par la perte des composants qui recyclent, et d'autre part, par l'arrivée de nouveaux éléments apportés depuis le TGN (Gruenberg and Maxfield, 1995). Dans ce cas, le terme d'endosome tardif regroupe l'ensemble de ces vésicules à différents stades de maturation, et un des stades correspond au MVB. Parfois, ce terme de MVB est également donné à la place d'endosome

tardif (pour revues, voir Gruenberg and Maxfield (1995) et Pillay et al. (2002)). La formation et la fonction des MVB seront l'objet du chapitre 2 de l'Introduction.

#### • Les lysosomes

Les lysosomes (pH autour de 5) sont classiquement décrits comme les compartiments terminaux de la voie endocytaire. Ils contiennent de nombreuses hydrolases actives à pH acide qui vont pouvoir dégrader le matériel internalisé.



Figure 6 : Les lysosomes.

Les enzymes lysosomales sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, puis sont transportées dans l'appareil de Golgi où elles subissent des modifications posttraductionnelles. Une de ces modifications est une phosphorylation sur des sucres qui leur permet ensuite d'être reconnues par des récepteurs du mannose-6-phosphate et d'être ainsi transportées jusqu'aux endosomes tardifs. Lorsque l'endosome tardif fusionne

avec le lysosome, les enzymes sont délivrées dans la lumière du lysosome. Cette fusion permet également la dégradation des vésicules internes de l'endosome tardif et de leur contenu par les enzymes lysosomales.

#### 2. Le corps multivésiculaire

Le corps multivésiculaire (MVB) est un composant de la voie endocytaire situé après les endosomes de tri. Il reçoit les protéines endocytées depuis la membrane plasmique ainsi que des protéines néosynthétisées venues du TGN comme les précurseurs des enzymes lysosomales. Ces protéines membranaires destinées aux lysosomes sont le plus souvent ubiquitinées (voir plus loin). Elles vont être reconnues par la machinerie de tri et de formation du MVB puis séquestrées dans les vésicules internes de celui-ci. Lors de la fusion du MVB avec les lysosomes, les protéines portées par les vésicules intraluminales vont être dégradées ou maturées par les enzymes lysosomales alors que les protéines de la membrane limitante du MVB sont protégées. La répartition des protéines transmembranaires entre la membrane limitante et les membranes internes du MVB est donc un élément clé de leur devenir.

L'étude des corps multivésiculaires dans les organismes multicellulaires a révélé non seulement leur rôle crucial dans la dégradation et la maturation des protéines membranaires mais également dans la réponse immunitaire et le bourgeonnement viral (Katzmann et al., 2002).



Figure 7 : Schéma général de la voie de tri des protéines membranaires ubiquitinées et de leur ciblage dans le MVB. L'ubiquitine indiquée par le triangle jaune est attachée aux protéines membranaires endocytées depuis la membrane plasmique ou issues du TGN. Cette ubiquitine permet la reconnaissance des protéines membranaires par la machinerie de tri et de formation du MVB (voir plus loin) et leur séquestration dans les vésicules internes de celuici. La machinerie de tri est située sur des microdomaines particuliers de l'endosomes enrichis en clathrine (indiquée en rouge). Après fusion du MVB avec les lysosomales. (Schéma issu de (Raiborg et al., 2003)).

#### a) Les protéines triées dans la voie du MVB

Des protéines membranaires de la membrane plasmique ou issues de la voie de néosynthèse ont été décrites pour être prises en charge par la machinerie de tri et de formation du MVB (voir Tableau 1).

Organisme	Protéine	Exemple	Fonction
Levure	Récepteurs de la membrane plasmique	Ste2	Récepteur au facteur α des phéromones
		Ste3	Récepteur au facteur <b>a</b> des phéromones
		Fur4	Perméase à uracile
	Protéines transmembranaires	Gap1	Perméase générale des acides aminés
	de la membrane plasmique	Ste6	Transporteur du facteur <b>a</b>
		Tat2	Perméase au tryptophane

	Protéines transmembranaires	CPS	Hydrolase vacuolaire
	roteines transmembranaires issues de la voie de néosynthèse	СРҮ	Hydrolase vacuolaire
		Sna3	Fonction inconnue
	Récepteurs de la membrane plasmique	EGFR	Récepteur à l'EGF
		GHR	Récepteur à l'hormone de croissance
		β2-AR	Récepteur β2 adrénergique
Mammifères		CXCR4	Récepteur aux chémokines
	Protéines transmembranires de la membrane plasmique	E-cadhérine	Jonctions cellulaires
		ENaC	Canal sodium
	Protéines transmembranaires issues de la voie de néosynthèse	LAP	Phosphatase acide lysosomale

Tableau 1 : Exemples de protéines ciblées dans la voie du MVB chez la Levure et chez les mammifères. Adapté de la revue Katzmann et al. (2002)).

Les récepteurs membranaires destinés à la dégradation comme par exemple le récepteur à l'EGF (récepteur de type tyrosine-kinase) dans les cellules de mammifères ou les récepteurs Ste2 et Ste3 (récepteurs de type GPCR) chez la Levure sont dirigés dans les vésicules internes du MVB afin d'être dégradés par les enzymes lysosomales après fusion du MVB avec les lysosomes.

Le devenir des transporteurs membranaires dépend également de cette machinerie. Par exemple, la présence à la membrane de la perméase Gap1 qui est un transporteur général des acides aminés dépend de la richesse du milieu en azote. Lorsque le milieu contient peu de sources azotées, la perméase est stabilisée à la membrane plasmique. Lorsque les levures sont placées dans un milieu riche en azote, la perméase est ubiquitinée, reconnue par la machinerie de tri et envoyée à la dégradation dans la vacuole *via* la voie MVB. De plus, la protéine néosynthétisée est également ubiquitinée et ciblée directement depuis le TGN vers la voie MVB pour être dirigée vers la vacuole (Nikko et al., 2003).

Enfin, la maturation de certains précurseurs d'enzymes lysosomales dépend également de cette voie :

#### • La protéine CPS (*carboxypeptidase S*) :

Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur transmembranaire (pCPS). Ce précurseur est ubiquitiné et délivré depuis l'appareil de Golgi aux endosomes où il est reconnu par la machinerie de tri et séquestré dans les vésicules internes du MVB. Lorsque ces vésicules sont délivrées dans la lumière vacuolaire, le précurseur est clivé de son ancre transmembranaire libérant une enzyme soluble mature, l'enzyme mCPS (Spormann et al., 1992).

#### • La protéine CPY (*carboxypeptidase Y*) :

Cette enzyme vacuolaire est transportée depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi où elle est glycosylée. Ce précurseur glycosylé appelé p2CPY contient une séquence de ciblage à la vacuole reconnue par la protéine Vps10 qui est un récepteur transmembranaire situé dans l'appareil de Golgi. Le complexe Vps10-p2CPY est envoyé depuis l'appareil de Golgi aux endosomes où il se dissocie. Le récepteur Vps10 retourne dans l'appareil de Golgi alors que le précurseur p2CPY présent dans la lumière de l'endosome va ensuite être délivré dans la lumière vacuolaire où il sera maturé en mCPY (Cereghino et al., 1995). Lorsque la voie du MVB est perturbée, le recyclage du récepteur Vps10 vers l'appareil de Golgi ne se fait plus correctement et la protéine CPY nouvellement synthétisée est envoyée par défaut dans la voie de sécrétion.

Comme le devenir de ces protéines est intimement lié à la voie du MVB, elles sont souvent utilisées comme marqueurs pour évaluer le bon fonctionnement de la machinerie qui contrôle cette voie. Ainsi, le taux de dégradation des récepteurs membranaires (EGFR, Ste2...) ainsi que le taux de sécrétion de la protéine CPY dans le milieu extracellulaire rendent compte du déroulement de la voie. Le devenir de la perméase Gap1 suivant le milieu de culture ou la maturation du précurseur pCPS sont également souvent utilisés.

#### b) Les signaux d'entrée

L'ubiquitination des cibles membranaires est un signal d'entrée dans les vésicules internes du MVB (Aguilar and Wendland, 2003). L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés, très conservée, qui peut être attachée covalemment à une autre protéine par un lien isopeptidique entre le groupement NH2 de la chaîne latérale d'une lysine de la protéine cible et le groupement COOH de la glycine terminale de l'ubiquitine. Ce processus est réalisé grâce à l'action de trois enzymes qui agissent séquentiellement : tout d'abord l'enzyme E1 (*ubiquitin-activating enzyme*) qui active et forme un lien thiol-ester de haute énergie avec l'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite prise en charge par l'enzyme E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*) par transthiolation qui, en coopération avec l'enzyme E3 (*ubiquitin ligase*) transfère l'ubiquitine sur une lysine de la protéine cible.



**Figure 8 : L'ubiquitination.** L'ubiquitine libre est attachée par un lien thiol-ester à l'enzyme E1 de façon ATP-dépendante. L'ubiquitine est ensuite transférée à l'enzyme de type E2 toujours par un lien thiol-ester. L'enzyme E3 va interagir avec la protéine cible et avec l'enzyme E2 liée à l'ubiquitine et catalyser le transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible. Image issue de Weissman (2001).

Il existe trois familles de ligases E3 (pour revue, voir Pickart (2004)):

#### • les ligases de type HECT (<u>Homologous to E6AP Carboxy Terminus</u>) :

Elles contiennent un domaine C2 en N-terminal qui permet une interaction avec les phospholipides membranaires et/ou des protéines de façon dépendante du  $Ca^{2+}$ , deux à quatre domaines WW qui interagissent avec des régions riches en prolines du substrat et un domaine HECT en C-terminal contenant une cystéine conservée nécessaire pour le lien thiol-ester (Horak, 2003).

#### • les ligases de type RING (<u>*Really Interesting New Gene*</u>) :

Elles sont caractérisées par la présence d'un RING finger défini par une succession de cystéines et d'histidines qui lie deux ions zinc (Freemont, 2000). Certaines de ces ligases agissent sous forme monomérique comme la ligase Cbl, d'autres font partie d'un complexe multiprotéique. Trois complexes sont actuellement décrits : les enzymes SCF, APC et VCB (pour revue, voir Pickart (2001)).

#### • les ligases de type U-box (<u>UFD2 homology proteins</u>) :

Elles possèdent également un domaine RING mais les cystéines nécessaires à la coordination des deux ions zinc sont absentes (Aravind and Koonin, 2000).

L'addition d'une seule ubiquitine sur une protéine cible est définie comme une monoubiquitination. Cependant, différentes lysines d'une même protéine cible peuvent être modifiées par ajout d'une molécule d'ubiquitine sur chacune d'entre elles. On parle alors de poly-monoubiquitination ou multi-monoubiquitination. Enfin, l'ubiquitine elle-même peut être ubiquitinée et former ainsi une chaîne de polyubiquitine grâce à ses trois lysines : la lysine 29, la lysine 48 et la lysine 63 (Arnason and Ellison, 1994). On parle alors de polyubiquitination (pour revue, voir Haglund et al. (2003a)). Suivant la fonction cellulaire dans laquelle est impliquée la protéine ubiquitinée, la

chaîne de polyubiquine sera différente. Une chaîne de polyubiquitination sur les lysines 48 ou 29 est en général un signal de dégradation de la protéine cible par le protéasome alors qu'une polyubiquitination utilisant la lysine 63 a été montrée comme impliquée dans la réparation de l'ADN, l'activation de la traduction et de kinases spécifiques et la régulation de l'activité endocytaire (Strous and Gent, 2002).

L'ubiquitination des protéines de la surface cellulaire intervient au moins à deux endroits dans la voie endocytaire : à la membrane plasmique comme signal d'internalisation et au niveau de l'endosome de tri comme signal d'entrée dans les vésicules internes du MVB. Chez la Levure, la monoubiquitination du récepteur Ste2 est suffisante pour déclencher son internalisation (Terrell et al., 1998). C'est également le cas pour la perméase Gal2 (Horak and Wolf, 2001). Par contre, pour la perméase Fur4, c'est une courte chaîne de polyubiquitine sur lysine 63 qui agit comme signal d'internalisation (Galan and Haguenauer-Tsapis, 1997). L'importance de l'ubiquitination des protéines membranaires dans une étape tardive de la voie endocytaire a d'abord été mise en évidence par Levkowitz et coll. en 1998 en montrant que la surexpression de la ligase Cbl augmente le taux de dégradation de l'EGFR dans les lysosomes sans affecter le taux d'internalisation du récepteur (Levkowitz et al., 1998). La mutation des lysines de la queue cytoplasmique du récepteur CXCR4 n'empêche pas l'internalisation du récepteur depuis la membrane plasmique mais inhibe sa dégradation (Marchese and Benovic, 2001). Chez la Levure, le récepteur au facteur a des phéromones, Ste3, peut être internalisé soit constitutivement de façon ubiquitine-dépendante, soit de façon ubiquitine-indépendante suite à l'activation par son ligand. Cependant, si la mutation des lysines du récepteur n'affecte pas son internalisation ligand-dépendante, elle inhibe sa dégradation dans la vacuole, révélant le rôle de l'ubiquitine dans des étapes postérieures à l'entrée dans la voie (Chen and Davis, 2002). Toujours chez la Levure, il a été montré que certains précurseurs d'enzymes vacuolaires sont monoubiquitinés et que cette monoubiquitination est indispensable à leur entrée dans le MVB (Katzmann et al., 2002). Pour finir, l'ajout d'une étiquette ubiquitine à un récepteur comme le récepteur à la transferrine qui après internalisation recycle normalement à la membrane plasmique suffit à l'envoyer vers la dégradation (Raiborg et al., 2002).

La présence de domaines de reconnaissance de l'ubiquitine dans certaines des protéines impliquées dans le tri des récepteurs au niveau de l'endosome conforte ces données. La reconnaissance de l'ubiquitine est assurée par différents types de domaines qui sont répertoriés dans le Tableau 2.

Nom du domaine	<b>Taille</b> (en aa)	Affinité pour l'ubiquitine (K <sub>d</sub> )	Exemples	
CUE				
conjugation to endoplasmic	≈ 40	≈ 2-160 μM (monoubiquitine)	Vps9, Tollip	
reticulum degradation)				
GAT	≈ 135	≈ 180 µM (monoubiquitine)	Tom1	
(Gga, ARF and Tom1)	100		Tom	
GLUE				
(Gram-like ubiquitin-binding in	≈ 135	≈ 460 μM (monoubiquitine)	Eap45	
Eap45)				
NZF	≈ 35	≈ 100-400 μM (monoubiquitine)	Npl4, Vps36	
(Npl4 zinc finger)			F ) F	
PAZ				
(polyubiquitin-associated zinc	≈ 60	indéterminé	HDAC6	
finger)				
UBA	≈ 50	≈ 10-500 µM (monoubiquitine)	Rad23, Dsk2	
(ubiquitin-associated)		≈ 0.03-9 μM (polyubiquitine)	,	
UEV				
(ubiquitin-conjugating enzyme	≈ 145	≈ 100-500 μM (monoubiquitine)	Tsg101/Vps23	
variant)				
UIM	≈ 20	≈ 100-400 µM (mono- ou poly-	Hrs/Vps27,	
(ubiquitin-interacting motif)		ubiquitine)	STAM, epsins	
VHS	≈ 510	indéterminé	STAM	
(Vps27, Hrs, STAM)				

Tableau 2 : Domaines de reconnaissance de l'ubiquitine et affinité. (adapté de la revue (Hicke et al., 2005)).

Cependant, des signaux de tri autres que l'ubiquitine doivent exister car des protéines non ubiquitinées sont également triées dans les vésicules internes du MVB. C'est le cas de la protéine Sna3, une protéine de *S. cerevisiae* de fonction inconnue (Reggiori and Pelham, 2001) ou de la protéine LRP (*low-density lipoprotein receptor protein*) chez les mammifères (Melman et al., 2002).

#### c) La machinerie de tri

#### (1) Les protéines de classe E et le corps multivésiculaire

Les acteurs de la machinerie de tri ont été mis en évidence chez *S. cerevisiae* mais tous les homologues de ces protéines sont présents chez les mammifères et leur étude indique que leurs fonctions sont conservées. Ces acteurs appartiennent aux protéines Vps (*vacuolar protein sorting*) de classe E (répertoriées dans le Tableau 3), un groupe de protéines indispensables au trafic de certaines

enzymes de la vacuole (Raymond et al., 1992) et de protéines membranaires destinées à la dégradation (Odorizzi et al., 1998), (voir Tableau 1). L'essentiel des protéines Vps de classe E sont assemblées en complexes protéiques hétéromériques, les complexes ESCRT (<u>Endosomal sorting complex required</u> for <u>transport</u>).

Protéines de Levure Homologues		Homologues humains	Complexe
	Vps27 Hse1	Hrs STAM1,2	ESCRT-0
	Vps23 Vps28 Vps37	Tsg101 Vps28 Vps37A, B, C, D	ESCRT-I
	Vps22 Vps25 Vps36	EAP30 EAP25 EAP45	ESCRT-II
	Vps2/Did4 Vps20 Vps24 Vps32/Snf7	CHMP2A, B CHMP6 CHMP3 CHMP4A, B, C/ Snf7-1, 2 et 3	ESCRT-III
	Vps4 Vps60/Mos10 Did2/Fti1/Vps46 Vta1 Bro1/Vps31/Npi3 Vps44	Vps4A, B /SKD1 CHMP5 CHMP1A, B SBP1/Lip5 Alix/AIP1 NHE 6, 7, 8 / SLC9A6	Autres

Tableau 3: Protéines de classe E chez la Levure et leurs homologues chez l'Homme.

Lorsque ces protéines Vps de classe E sont mutées, la formation du MVB est affectée (Odorizzi et al., 1998). Cet organite est alors absent et le cytosol des mutants contient une accumulation de membranes de forme allongée semblable à l'appareil de Golgi. Ces saccules ont été appelées « compartiment de classe E » qui est prévacuolaire. Les protéines ciblées normalement au

MVB vont alors s'accumuler dans les membranes de ces saccules, de même que l'ATPase vacuolaire responsable de l'acidification des compartiments endocytaires (Rieder et al., 1996).



Figure 9 : Compartiment de classe E chez la Levure. Exemple de compartiment de classe E obtenu avec un mutant de l'ATPase Vps4. Adapté de Babst et al. (1997). Ce mutant accumule des membranes regroupées entre elles.

#### (2) Le complexe ESCRT-0

Chez les mammifères, les premières protéines intervenant dans la prise en charge de la protéine membranaire cible ubiquitinée au niveau de l'endosome de tri sont Hrs (<u>Hepatocyte growth</u> factor <u>Regulated tyrosine kinase Substrate</u>), Eps15 et STAM 1/2 (<u>Signal Transducing Adaptor</u> <u>Molecule</u>). Ces trois protéines possèdent toutes un domaine UIM capable de fixer l'ubiquitine (Hicke and Dunn, 2003) et forment un complexe au niveau de microdomaines de l'endosome enrichis en clathrine (Bache et al., 2003b).

Hrs est une protéine multimodulaire possédant un domaine VHS, un domaine FYVE capable de fixer le PI(3)P (phosphatidylinositol-3-phosphate), un lipide retrouvé au niveau de la membrane de l'endosome, un domaine riche en prolines contenant un domaine « *coiled-coil* » et une extrémité C-terminale capable de fixer la clathrine. L'interaction entre Hrs et les protéines STAM se fait via la région « *coiled-coil* » de Hrs et les domaines ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) à l'extrémité C-terminale des protéines STAM (Asao et al., 1997). Cette interaction permet le recrutement des protéines STAM sur les membranes de l'endosome (Bache et al., 2003b). Elle est également importante pour la stabilité des protéines STAM car des mutations dans ces domaines ou l'utilisation de lignées cellulaires déficientes en Hrs augmentent la polyubiquitination des protéines STAM et leur dégradation par le protéasome (Kobayashi et al., 2005).

L'invalidation de *hrs* chez la souris conduit à une mort embryonnaire (Komada and Soriano, 1999; Miura et al., 2000). L'invalidation de *stam1* ou de *stam2* ne se traduit par aucun phénotype anormal majeur mais la double invalidation conduit à une mort embryonnaire suggérant que ces protéines ont des fonctions redondantes (Yamada et al., 2002; Yamada et al., 2001). La perte de fonction de Hrs par ARN interférence (ARNi) (Bache et al., 2003a), comme sa surexpression (Komada et al., 1997) se traduisent par la formation de compartiments endosomaux anormaux qui seraient l'équivalent des compartiments de classe E chez la Levure et par un défaut de dégradation du

récepteur à l'EGF internalisé (Bache et al., 2003b). Bien que Hrs soit présent au niveau des endosomes précoces, les défauts morphologiques observés concernent également les endosomes tardifs et les lysosomes (Bache et al., 2003a).

Chez la levure, l'homologue de Hrs est la protéine Vps27. Elle possède deux domaines UIM qui sont importants pour le tri des protéines issues de la voie de biosynthèse comme de la voie d'internalisation. Une mutation dans un seul domaine suffit à bloquer le tri de l'enzyme vacuolaire CPS comme du récepteur Ste2 (Shih et al., 2002). Cependant, les mutations dans les domaines de fixation de l'ubiquitine n'empêchent pas la formation des vésicules internes du MVB (Bilodeau et al., 2002). Vps27 possède également un domaine FYVE capable de fixer le PI(3)P de l'endosome précoce (Katzmann et al., 2003). Elle interagit avec Hse-1 (Bilodeau et al., 2002), l'homologue de STAM possédant également un domaine UIM, ainsi qu'avec Ent5 et Ent3 (Eugster et al., 2004), deux protéines possédant un domaine ENTH (Epsin NH<sub>2</sub>-Terminal Homology) qui lie les phosphoinositides (De Camilli et al., 2002 ; Eugster et al., 2004). Bien que les protéines Ent3 et Ent5 interagissent avec Vps27, leur recrutement sur les membranes de l'endosome passe par leur capacité à fixer plus spécifiquement le PI(3,5)P<sub>2</sub>. Ce recrutement est nécessaire au tri des protéines cibles car une mutation dans le domaine ENTH de Ent3 empêche le ciblage correcte de l'enzyme CPS à la vacuole (Friant et al., 2003). Cet effet sur le trafic est retrouvé lors de la double invalidation des gènes ent3 et ent5 suggérant que ces protéines ont des fonctions redondantes. Cependant, ces mutants ne présentent pas un phénotype classique de type E, ce qui pourrait s'expliquer par leur implication dans d'autres voies de trafic intracellulaire (Eugster et al., 2004). Les auteurs proposent que ces protéines aient un rôle dans la modification de la courbure membranaire nécessaire à la formation des vésicules internes du MVB (Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003).

Le complexe Hrs/STAM/Eps15, aussi bien chez les mammifères que chez la Levure intervient dans le recrutement du complexe suivant, le complexe ESCRT-I (Bache et al., 2003a ; Katzmann et al., 2003). C'est la raison pour laquelle le complexe Hrs/STAM/eps15 est parfois appelé ESCRT-0. Son rôle serait de recruter et de concentrer au niveau de microdomaines particuliers de l'endosome à la fois les protéines cibles ubiquitinées et la machinerie de tri et de formation du MVB.

Le recrutement de ESCRT-I passe par une double interaction entre Hrs et Tsg101, un composant du complexe ESCRT-I. Le domaine UEV de Tsg101 reconnaît le motif P(S/T)AP (où P= proline, S = sérine, T= thréonine et A= alanine) présent sur la protéine Hrs mais Tsg101 reconnaît également la partie en « *coiled-coil* » et la fin du domaine riche en prolines (Pornillos et al., 2003). Cette double interaction est importante pour le recrutement de Tsg101 par Hrs et pour leurs rôles dans la dégradation des protéines membranaires puisque des mutations ponctuelles qui empêchent ces interactions se traduisent par un défaut de dégradation du récepteur à l'EGF (Lu et al., 2003). Chez la Levure, Vps27 recrute le complexe ESCRT-I par son interaction avec Vps23, l'homologue de Tsg101. Cette interaction nécessite un motif PSAP-*like* présent sur Vps27, le motif PTVP (où V= valine), mais pas uniquement car la mutation de ce motif diminue le recrutement d'ESCRT-I mais ne l'empêche pas

totalement (Katzmann et al., 2003). Ainsi, comme chez les mammifères, il existe plusieurs sites d'interaction entre les deux protéines. Des mutations qui interfèrent avec cette interaction perturbent le tri de certaines cibles comme celui de la protéine chimère CPS-GFP mais pas de Ste-3-GFP ni de CPY (Bilodeau et al., 2003).

Plus récemment, la protéine Hrs a été impliquée dans le recyclage « actif » du récepteur  $\beta 2$  adrénergique ( $\beta 2AR$ ) et du récepteur  $\mu$  aux opioïdes ( $\mu OR$ ) qui retournent rapidement à la membrane plasmique après leur internalisation (Hanyaloglu et al., 2005). Dans des cellules HeLa où Hrs est surexprimé ou au contraire appauvri par l'utilisation de ARNi, les récepteurs qui doivent recycler par une voie « active » restent piégés dans la membrane de l'endosome précoce contrairement aux récepteurs qui recyclent « par défaut » comme le récepteur à la transferrine. Le domaine VHS d'Hrs est indispensable à cette fonction mais pas son domaine UIM. Pour ce recyclage actif, les récepteurs n'ont pas besoin d'être ubiquitinés. Cette fonction dans le recyclage ne fait *a priori* pas intervenir les autres protéines de classe E puisque aucun effet sur le recyclage de ces protéines n'est observé dans des cellules appauvries en Tsg101 par ARNi ou exprimant des formes mutantes de l'ATPase Vps4 (voir plus loin pour le rôle de ces protéines).

(3) Les complexes ESCRT-I, II et III

#### • Le complexe ESCRT-I

Chez *S. cerevisiae* comme dans les cellules de mammifères, le complexe ESCRT-I est cytosolique. Il fait environ 350 kDa et comprend trois protéines : Vps23/Tsg101, Vps28 et Vps37 (Babst et al., 2000 ; Bache et al., 2004 ; Bishop and Woodman, 2001 ; Katzmann et al., 2001). Ce complexe est formé d'un exemplaire de Vps23 et de plusieurs exemplaires de Vps28 et Vps37 (Babst et al., 2000).

La protéine Vps23/Tsg101 possède un domaine UEV capable de lier l'ubiquitine. Ce domaine ressemble au domaine UBC présent dans les enzymes d'ubiquitination de type E2 mais dans lequel il manque une cystéine dans le site catalytique. Sans cette cystéine, le domaine UBC ne peut pas fonctionner comme une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine. Cette reconnaissance est indispensable pour la prise en charge de la protéine cible. Par son intermédiaire, le complexe ESCRT-I reconnaît la protéine cible ubiquitinée et la dirige dans la voie MVB (Katzmann et al., 2001). La structure cristalline de ce domaine a récemment été obtenue à 2 Å de résolution en présence de l'ubiquitine (Sundquist et al., 2004). Le domaine UEV adopte une conformation en hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$ , retrouvée dans les enzymes de type E2 mais avec une hélice en N-terminal supplémentaire et deux hélices en Cterminal en moins. Les feuillets  $\beta$  forment une surface concave qui est le site d'interaction avec l'ubiquitine. Cette interaction est favorisée par une structure en « épingle à cheveux » formée par les feuillets  $\beta 1$  et  $\beta 2$ . Cette structure révèle que le domaine UEV peut lier à la fois l'ubiquitine et les motifs de type P(S/T)AP.



Figure 10 : Structure du domaine UEV en présence de l'ubiquitine et d'un peptide PTAP. Le domaine UEV est représenté en bleu. Il présente quatre hélices  $\alpha$  et quatre feuillets  $\beta$ . Ces feuillets  $\beta$  forment une surface concave où vient se loger l'ubiquitine représentée en vert. Cette interaction est favorisée par la structure en épingle à cheveux adoptée par les feuillets β1 et β2. Le peptide PTAP en jaune est, lui, reconnu par les feuillets \beta2 et \beta3 et la partie C-terminale de l'hélice  $\alpha 4$ . Le domaine UEV peut donc lier simultanément l'ubiquitine et un peptide PTAP. Issue de Sundquist et al. (2004).

L'invalidation de *tsg101* chez la souris se traduit par une mort embryonnaire (Wagner et al., 2003). L'appauvrissement en Tsg101 par ARNi dans les cellules HeLa se traduit par une diminution concomitante en Vps28 (Doyotte et al., 2005) et en Vps37 (Bache et al., 2004). La réciproque n'est pas retrouvée dans les expériences de ARNi sur Vps37 suggérant que Tsg101 a un rôle clé dans la stabilisation du complexe ESCRT-I. Dans les cellules appauvries en Tsg101, la morphologie de tous les compartiments endocytaires est modifiée mais celle des endosomes précoces plus particulièrement (Bishop et al., 2002; Doyotte et al., 2005). L'effet sur la morphologie des compartiments autres que les endosomes précoces semble dépendre du type cellulaire ou du niveau d'appauvrissement en Tsg101 car la stratégie ARNi appliquée sur Tsg101 dans les fibroblastes de souris (NIH 3T3) ne modifie pas le nombre, la distribution ou l'aspect des compartiments tardifs (Babst et al., 2000). Le laboratoire de Woodman a particulièrement détaillé la morphologie des endosomes précoces dans les cellules appauvries en Tsg101 (Doyotte et al., 2005). Ils prennent une forme allongée en sac comparable à l'appareil de Golgi. Ces compartiments ressemblent à ceux observés dans les mutants de classe E chez la Levure. Les différentes « citernes » sont reliées entre elles par une matrice. Les auteurs proposent que cette morphologie résulte de différents accrochages homotypiques entre endosomes précoces qui ne se seraient pas séparés. Ces citernes ne font pas d'invagination dans leur lumière excepté à leur extrémité où elles sont d'avantage dilatées. Certaines cellules n'ont pas de citernes mais à la place de grandes vacuoles sans vésicules internes. Pour les auteurs, ces vacuoles sont des formes précurseurs ou des intermédiaires dans la formation des citernes.



Figure 11 : Compartiments de classe E dans les cellules de mammifères. Des cellules appauvries en Tsg101 par utilisation d'ARNi contre cette protéine présentent dans leur cytoplasme une accumulation de membranes dérivées des endosomes précoces. Ces différentes saccules sont reliées entre elles par une matrice indiquée par les flèches. Ces compartiments anormaux ressemblent aux compartiments de classe E observés chez la Levure. Image issue de Doyotte et al. (2005).

Dans ces compartiments, les récepteurs qui doivent recycler (récepteurs à la transferrine) comme ceux qui doivent être dégradés (récepteurs à l'EGF) co-localisent un peu partout sur ces membranes. Ainsi, le premier tri réalisé par ESCRT-0 qui séquestre les récepteurs à dégrader au niveau de microdomaines enrichis en clathrine n'est pas maintenu en l'absence de Tsg101. Les auteurs ont également montré que le recyclage du récepteur à la transferrine est affecté. Dans une cellule parentale, le recyclage se fait à partir de deux types de compartiments : (1) les endosomes précoces et (2) des structures tubulaires situées en périphérie de la cellule. Dans le mutant appauvri en Tsg101, le recyclage à partir de l'endosome précoce est affecté (Doyotte et al., 2005).

#### • Le complexe ESCRT-II

Le complexe ESCRT-I intervient dans l'activation du complexe suivant, le complexe ESCRT-II composé également de trois protéines : Vps22, Vps25 et Vps36. Ce complexe fait environ 155 kDa et est cytosolique (Babst et al., 2002b). La structure cristalline du complexe ESCRT-II de levure a récemment été obtenue à 3,6 Å de résolution (Hierro et al., 2004 ; Teo et al., 2004). Ce complexe contient deux copies de Vps25, une copie de Vps22 et une de Vps36. Il adopte une forme en « Y » où la base consiste en une molécule de Vps25 tandis que l'autre molécule forme une des branches. Les deux molécules de Vps25 n'interagissent pas entre elles. La deuxième branche est formée par le sous-complexe Vps22 et la partie C-terminale de Vps36. La partie N-terminale de Vps22 forme une extension à l'extérieur du complexe qui pourrait être impliquée dans des interactions intermoléculaire de type « *coiled-coil »* et pourrait contribuer à l'interaction du complexe ESCRT-II avec la membrane de l'endosome (Teo et al., 2004). La partie N-terminale de Vps36 qui n'est pas présente dans le cristal porte un domaine de liaison à l'ubiquitine de type NZF qui est connecté au reste du complexe par un long lien flexible facilitant ainsi la reconnaissance de la protéine cible ubiquitinée. Ce domaine est important car une mutation dans ce domaine entraîne la formation d'un compartiment de classe E (Alam et al., 2004).



Figure 12 Structure du complexe ESCRT-II. La structure obtenue du complexe ESCRT-II révèle la présence deux protéines Vps25, une protéine Vps22 et une protéine Vps36. Seule la partie C-terminale de la protéine Vps36 a été cristallisée. Ces protéines adoptent une forme trilobée comme un Y. La partie Nterminale de Vps22 forme une extension hors de la structure qui permettre pourrait des interactions avec d'autres protéines ou avec les membranes. Image issue de Teo et al. (2004).

#### • Le complexe ESCRT-III

ESCRT-II va permettre le recrutement du complexe ESCRT-III. Il est formé de quatre protéines : Vps20, Vp32/Snf7, Vps24 et Vps2 (Babst et al., 2002a). Ces protéines sont caractérisées par la présence de un à plusieurs domaines en « coiled-coil » et une répartition hétérogène des acides aminés chargés qui se traduit par une région N-terminale basique (pI≈10) et une extrémité C-terminale plutôt acide (pI~4). Cette répartition hétérogène des acides aminés chargés permettrait une conformation fermée des protéines par interaction de leurs domaines N-terminaux avec leurs domaines C-terminaux (Lin et al., 2005; Whitley et al., 2003). Contrairement aux deux complexes précédents, celui-ci n'est pas présent en l'état dans le cytosol. Les protéines qui le composent sont recrutées depuis le cytosol à la membrane de l'endosome où elles s'oligomérisent pour former le complexe ESCRT-III. Des études in vitro montrent une interaction entre Vps25 du complexe ESCRT-II et Vps20 du complexe ESCRT-III suggérant que le complexe ESCRT-III est recruté par l'intermédiaire de Vps25 (Teo et al., 2004). Le complexe ESCRT-III est en fait composé de deux sous-complexes, le souscomplexe Vps20-Vps32 présent à proximité de la membrane de l'endosome et le sous-complexe Vps24-Vps2 plus périphérique. L'association à la membrane de ce complexe pourrait être facilitée par la capacité de ces protéines à interagir avec les lipides comme cela a été démontré pour les protéines Vps24 (Whitley et al., 2003) et Vps32 (Lin et al., 2005) et stabilisée par la myristoylation de Vps20 (Babst et al., 2002a). Ce complexe semble avoir un rôle dans la concentration et la séquestration des protéines « cargos » et être intimement lié au processus d'invagination nécessaire à la formation des vésicules internes du MVB (Babst et al., 2002a). Récemment, il a été montré que la surexpression du domaine N-terminal de la protéine humaine Snf7-1 se traduit par la formation de polymères capables de déformer les membranes (Lin et al., 2005). Il est possible que cette caractéristique puisse être étendue aux autres membres du complexe et que leur implication dans la formation des vésicules internes passe par leur capacité à polymériser et déformer ainsi la membrane. Le complexe ESCRT-III participe également au recrutement d'un certain nombre de protéines associées à la machinerie ESCRT.

#### (4) Les protéines associées

#### • Vps4 :

La protéine Vps4 est une ATPase composée d'un domaine MIT (*microtubule interacting and trafficking domain*) en N-terminal et un domaine ATPasique de type AAA (voir Fig 13A).

Des études biochimiques réalisées chez la Levure suggèrent que la protéine existe sous deux formes oligomériques : une forme dimérique liée à l'ADP et une forme décamérique liée à l'ATP. Elle est recrutée depuis le cytosol à la membrane de l'endosome par le complexe ESCRT-III et catalyse la dissociation des trois complexes ESCRT de la membrane de l'endosome (Babst et al., 1997 ; Babst et al., 1998 ). Un mutant Vps4 qui n'est plus capable de lier l'ATP reste cytosolique indiquant que la liaison de l'ATP régule l'association de la protéine à la membrane de l'endosome (Babst et al., 1998). Le site ATPasique contient un site de fixation de l'ATP et un site d'hydrolyse. Une mutation interférant avec la fixation ou l'hydrolyse de l'ATP empêche la dissociation des complexes ESCRT et entraîne la formation d'un compartiment de classe E qui séquestre toute la machinerie. Le même phénomène est obtenu dans un mutant *vps4* nul (Babst et al., 1997 ; Babst et al., 1998).

Chez les mammifères, deux homologues sont présents, Vps4A et Vps4B/SKD1. Ces deux protéines présentent 80 % d'identités entre elles et environ 60 % d'identités avec la protéine Vps4 de Levure. Les deux sont impliquées dans le trafic endocytaire (Bishop and Woodman, 2000; Scheuring et al., 2001) et pourraient former des hétéromères. La structure du domaine MIT des deux protéines humaines a récemment été déterminée (voir Fig 13B). Il consiste en trois hélices anti-parallèles et ressemble à des motifs classiques de type « ensemble » de quatre hélices ou motif TPR (tetratricopeptide) comprenant des paires d'hélices. Ainsi, il manquerait la quatrième hélice pour former un domaine défini. Les auteurs proposent que cette quatrième hélice soit apportée par un partenaire (Scott et al., 2005b ; Takasu et al., 2005). Les protéines du complexe ESCRT-III étant composées d'hélices, Vps4 interagirait avec elles par son domaine MIT. Le reste de la protéine Vps4B a également été cristallisé (voir Fig 13C) (Scott et al., 2005a). Le domaine ATPasique peut être divisé en deux domaines : un grand domaine composé de 6 feuillets  $\beta$  entourés de 5 hélices  $\alpha$  et un petit domaine composé de 4 hélices  $\alpha$  antiparallèles. Entre les hélices 3 et 4 de ce domaine ATPasique, est inséré un domaine  $\beta$  formé par trois feuillets  $\beta$  antiparallèles.



Figure 13 : Structure de l'ATPase Vps4B. A. Représentation schématique de Vps4. B. Structure du domaine MIT d'après Takasu et al. (2005). C . Structure du reste de la protéine d'après Scott et al. (2005a).

Le domaine  $\beta$  semble présent uniquement dans les protéines de la sous-famille Vps4 et pas dans les autres ATPases de la famille AAA comme la spastine ou la katinine A1. Ce domaine permettrait l'interaction de Vps4 avec un de ces partenaires, la protéine Vta1 (voir plus loin). Enfin, la partie C-terminale de la protéine Vps4 est composée d'une hélice  $\alpha$ . Le site de fixation de l'ATP est situé entre les grand et petit domaines ATPasiques. Comme les ATPases de la famille AAA s'oligomérisent en anneau, les auteurs proposent que six protéines Vps4 s'assemblent en anneau et que l'état oligomérique de Vps4 résulte de l'association de deux anneaux soit 12 unités de Vps4 et non pas 10 comme proposé initialement lors des études réalisées chez le Levure. Cette forme en anneau créerait un canal central par lequel sortiraient les protéines ESCRT-III lors de la destabilisation du complexe (Scott et al., 2005a).

#### • Doa4 :

Il s'agit d'une enzyme de déubiquitination qui clive l'étiquette ubiquitine de la protéine cible avant son entrée dans les vésicules internes du MVB (Dupre and Haguenauer-Tsapis, 2001). Bien qu'il ne s'agisse pas d'une protéine de classe E, cette enzyme est essentielle à la voie MVB puisque dans un mutant *doa4*, le tri des protéines « cargos » est bloqué (Losko et al., 2001 ; Reggiori and Pelham, 2001). Cependant, la déubiquitination du cargo ne semble pas indispensable puisque des protéines chimères portant une étiquette ubiquitine qui ne peut pas être clivée sont correctement triées dans la voie MVB (Reggiori and Pelham, 2001). L'importance de cette protéine pourrait résulter de son rôle dans le maintien du pool d'ubiquitine libre dans la cellule (Swaminathan et al., 1999). Il est également possible que la déubiquitination de la machinerie de tri elle-même soit régulée par la déubiquitinase puisque chez les mammifères, Hrs est régulée par ubiquitination (Katz et al., 2002 ; Marchese et al., 2003). Pour le moment, une telle régulation n'a pas été décrite chez la Levure. Le lien entre Doa4 et la machinerie ESCRT a été révélé par Amerik. et coll en montrant qu'un certain nombre de protéines Vps de classe E sont des suppresseurs d'une partie des phénotypes liés à l'invalidation de doa4. Ces premières études suggéraient que Vps32 et Vps24 étaient impliquées dans le recrutement de Doa4 à la membrane des endosomes (Amerik et al., 2000). Un travail réalisé plus récemment laisse envisager que cette enzyme est recrutée dans la voie du MVB par la protéine Bro1 (Luhtala and Odorizzi, 2004). Les auteurs expliquent cette différence de résultat par le rôle de Vps32 dans le recrutement de Bro1 sur les membranes de l'endosome (Odorizzi et al., 2003). Chez les mammifères, deux enzymes de déubiquitination, UBPY et AMSH, ont été impliquées dans la régulation du trafic du récepteur à l'EGF. Mais leurs rôles dans cette régulation paraient opposés. La protéine AMSH semble avoir une fonction analogue à celle de la protéine Doa4 (McCullough et al., 2004) alors que UBPY pourrait réguler négativement le taux de dégradation de l'EGFR en le déubiquitinant avant sa prise en charge par la machinerie ESCRT, permettant ainsi son recyclage à la membrane plasmique (Mizuno et al., 2005). Le rôle des enzymes de déubiquitination dans cette voie reste donc à clarifier.

#### • Bro1/Alix :

Bro1 est également une protéine de classe E. Elle est recrutée à la membrane de l'endosome par l'intermédiaire de Vps32 (Odorizzi et al., 2003). Ce résultat est retrouvé chez les mammifères (Sadoul, communication personnelle; Katoh et al., 2004a; Katoh et al., 2003) où il a également été montré qu'elle pouvait interagir avec Tsg101 (Martin-Serrano et al., 2003; Strack et al., 2003 ; von Schwedler et al., 2003 ). Son rôle précis dans la machinerie n'est pas très clair et son implication semble varier suivant la protéine cible. En effet chez la Levure, Bro1 est indispensable au tri de la protéine chimère GFP-CPS mais dans une moindre mesure à celui de CPY qui sont pourtant toutes les deux des précurseurs d'enzymes lysosomales en provenance du Golgi (Odorizzi et al., 2003). Elle intervient également dans le tri de la perméase Gap1 mais dans une souche *bro1* nulle, la perméase recycle à la membrane plasmique sous une forme déubiquitinée alors que dans les autres mutants de classe E, la perméase reste séquestrée dans le compartiment E (Nikko et al., 2003). Par contre, Bro1 est nécessaire au tri du récepteur aux phéromones Ste2 qui lie le facteur  $\alpha$ , et son absence conduit à la séquestration du récepteur dans le compartiment par rapport aux autres mutants de classe E a d'ailleurs conduit à sa classification initiale comme protéine de classe F (Bonangelino et al., 2002).

Chez les mammifères, Alix (l'homologue de Bro1) a été montré comme interagissant avec le LBPA (*lysobisphosphatidic acid*), un lipide très enrichi dans les membranes internes des endosomes tardifs (Matsuo et al., 2004). Les auteurs proposent que cette interaction soit nécessaire aux événements de fission/fusion permettant la formation des vésicules internes des compartiments

endocytaires tardifs. Les effets sur le trafic de récepteurs cibles semblent aussi un peu différents des autres mutants de classe E puisque par exemple, le trafic du récepteur à l'EGF n'est pas perturbé dans des cellules appauvries en Alix par ARNi contrairement aux cellules appauvries en Vps37 (Cabezas et al., 2005).

Alix a également été impliqué dans d'autres étapes de la voie endocytaire dans les cellules de mammifères. Cette protéine pourrait intervenir dès l'étape d'internalisation des récepteurs à la membrane plasmique. Ainsi récemment, Alix a été décrite comme régulant négativement l'internalisation du récepteur à l'EGFR médiée par Cbl, SETA et les endophilines (Schmidt et al., 2004). SETA (Chen et al., 2000) et les endophilines (Chatellard-Causse et al., 2002) sont d'ailleurs des partenaires d'Alix. Par ailleurs, différentes analyses protéomiques ont montré qu'Alix est associé à des phagosomes contenant des billes de latex (Garin et al., 2001) et aux exosomes (voir plus loin) (Thery et al., 2001).

#### • Vps60 et Vps46 :

Ces deux protéines font partie des protéines de classe E. Comme les protéines du complexe ESCRT-III, elles sont caractérisées par la présence de un ou plusieurs motifs « *coiled-coil* » et par une répartition hétérogène des acides aminés chargés. Cependant, chez la Levure, les défauts de trafic semblent moins sévères dans ces mutants que dans ceux des protéines qui composent ESCRT-III suggérant que leurs rôles sont peut-être partiellement redondants avec les autres protéines ou bien qu'il s'agit plutôt de protéines régulatrices (Babst et al., 2002a ; Kranz et al., 2001 ). Cette différence n'est pas retrouvée chez les mammifères où l'homologue de Vps46 (Chmp1) (Scott et al., 2005b) interagit avec Vps4, et les défauts de ce mutant comme celui de CHMP5 (l'homologue de Vps60) semblent être de même type que dans les autres mutants (Howard et al., 2001).

#### • Vta1/Lip5 :

Cette protéine de classe E interagit avec Vps60 aussi bien chez la Levure (Shiflett et al., 2004) que chez les mammifères (Ward et al., 2005). Chez *Saccharomyces*, son invalidation se traduit par un défaut de tri des protéines dans la voie MVB mais selon la protéine suivie, le défaut semble moins sévère que dans les mutants Vps20 ou Vps4. Les études de localisation des protéines Vta1 et Vps60 suggèrent qu'elles s'associent à la membrane de l'endosome après la formation d'ESCRT-III et avant le recrutement de Vps4 (Shiflett et al., 2004). Une étude par « double-hybride » réalisée chez la Levure suggère que Vta1 interagit avec Vps32 ce qui pourrait être son mode de recrutement sur la membrane de l'endosome (Bowers et al., 2004). Vta1 peut interagir également avec Vps4. Cette interaction a, là aussi, été montrée chez la Levure (Yeo et al., 2003) et chez les mammifères (Fujita et al., 2004). Comme l'interaction se fait au niveau C-terminal de l'ATPase, par analogie avec l'ATPase Hsp104 de la famille AAA, les auteurs suggèrent que Vta1 régule l'activité ATPasique de Vps4 (Yeo et al., 2003).

#### • Vps44 :

Il s'agit d'un échangeur sodium/proton qui transporte chez *Saccharomyces* des ions sodium dans le compartiment prévacuolaire contre des protons. Son rôle précis dans la voie MVB n'est pas clair mais suggère que la balance ionique dans la lumière de l'endosome est importante pour le fonctionnement de la machinerie (Bowers et al., 2000).

#### • Les protéines GGA et TOM:

En plus de ESCRT-0, un autre groupe de protéines a été décrit pour fonctionner en amont des complexes ESCRT-I, II et III : ce sont les protéines GGA (Golgi-associated, y-adaptin homologs, Arfbinding). Ces protéines ont été originellement impliquées dans le transport de protéines depuis l'appareil de Golgi vers les endosomes. En effet, les protéines GGA possèdent un domaine VHS qui interagit avec les motifs dileucines présents dans les récepteurs au mannose-6-phosphate (pour revue, voir Bonifacino (2004)). Ces protéines interagissent à la fois avec le « cargo » et la clathrine et participent ainsi à la séquestration des protéines cibles dans des vésicules recouvertes d'un manteau de clathrine au niveau du TGN. Cependant, des études récentes ont montré que ces protéines sont également capables de lier l'ubiquitine et qu'elles sont nécessaires au trafic des protéines membranaires issues de la voie de biosynthèse ou endocytaires destinées à la dégradation. En effet, en absence de protéines GGA et dans un milieu riche en azote, la perméase Gap1 néosynthétisée est dirigée à la membrane plasmique et non pas à la dégradation et le transport de la perméase depuis la membrane plasmique jusqu'à la vacuole est compromis. Des effets similaires sont observés sur le trafic du récepteur Ste3 (Scott et al., 2004). L'implication des protéines GGA dans la reconnaissance et le trafic de protéines membranaires a également été montrée dans les cellules de mammifères qui contiennent trois protéines GGA (GGA1, GGA2 et GGA3). Un appauvrissement des cellules HeLa en GGA3 par utilisation d'ARNi se traduit par une accumulation de récepteurs à l'EGF dans des endosomes précoces dont la morphologie est affectée (Puertollano and Bonifacino, 2004). Cette même étude montre que (1) la protéine GGA3 peut interagir avec l'ubiquitine et la protéine Tsg101 via son domaine GAT (GGA and Tom), (2) ces interactions sont nécessaires pour le tri au niveau de l'endosome de récepteur à l'EGF internalisé et (3) ces interactions sont nécessaires à l'association de la protéine GGA3 au compartiment de classe E formé par un mutant dominant-négatif de Vps4. Ces observations suggèrent que les protéines GGA pourraient fonctionner d'une façon similaire au complexe ESCRT-0 en triant et retenant les protéines cargos ubiquitinées au niveau de microdomaines de l'endosome riches en clathrine et en recrutant le complexe ESCRT-I.

Les protéines TOM1 ou TOM1L1 (*TOM1-Like1*) possèdent également un domaine VHS, mais qui ne reconnaît pas les motifs dileucines, un domaine GAT et un domaine d'interaction avec la clathrine (Yamakami et al., 2003). Le domaine GAT participe à l'interaction de ces protéines avec l'ubiquitine et avec la protéine Tollip, localisée sur les endosomes précoces, qui elle aussi peut fixer l'ubiquitine (Katoh et al., 2004b ; Yamakami et al., 2003 ). Ainsi, Tollip pourrait participer au recrutement des

protéines Tom1 et Tom1L sur les endosomes. Ce recrutement sur les endosomes pourrait aussi faire intervenir la protéine Endofin qui possède un domaine FYVE liant le PI(3)P présent sur les endosomes précoces et qui interagit avec Tom1 (Seet et al., 2004). Par ailleurs, la protéine Tom1L1 contient un motif PTAP reconnu par le domaine UEV de Tsg101. Enfin, Tom1L1 est séquestré dans un compartiment de classe E formé par la surexpression d'un dominant-négatif de l'ATPase Vps4 (Puertollano, 2005).

Ainsi, les protéines Tom1/Tom1L1, Tollip, Endofin pourraient représenter un second complexe similaire à ESCRT-0. Les liens entre les protéines GGA, les protéines Tom et la machinerie ESCRT ne sont pas encore très clairs. Si ces protéines fonctionnent en parallèle du complexe ESCRT-0 ou bien en association avec lui comme pourrait le suggérer les interactions entre les domaines VHS des protéines GGA, Tom1 et Tom1L1 et Hrs (Puertollano, 2005) est un point qui reste à déterminer.

#### *d)* Implication de certains lipides dans le tri des cargos et la formation du MVB

Le fait que les membranes internes des endosomes tardifs aient une composition lipidique différente de la membrane limitante indique que les lipides sont également triés dans les MVB (Kobayashi et al., 2002). Il est envisageable que le tri des protéines dans les endosomes puisse être en partie corrélé avec une distribution particulière des lipides.

#### • Le PI(3)P :

Formé par phosphorylation du phosphatidylinositol par une PI3-kinase, il est enrichi sur la face cytosolique des endosomes (Gillooly et al., 2000). Il permet le recrutement de protéines possédant des domaines PHOX ou FYVE (Ellson et al., 2002 ; Gillooly et al., 2001 ). C'est le cas de Hrs/Vps27 qui va être recruté sur les endosomes via son domaine FYVE (Raiborg et al., 2001). Comme Hrs recrute ensuite ESCRT-I, le PI(3)P est en quelque sorte la plate-forme où s'assemble la machinerie de tri. Chez *Saccharomyces*, la souche invalidée pour le gène *vps34* qui code pour la PI3-kinase présente un défaut de tri des protéines cibles à la vacuole (Schu et al., 1993). De plus, la micro-injection d'un anticorps dirigé contre la PI3-kinase dans les cellules humaines en culture, ou l'utilisation de la Wortmannine, un inhibiteur de cette enzyme, bloque la formation des vésicules internes du MVB, suggérant un rôle de ce lipide dans la biogenèse de ces vésicules (Fernandez-Borja et al., 1999 ; Futter et al., 2001). Une partie du PI(3)P cellulaire est retrouvée dans les vésicules internes du MVB et serait ensuite dégradée dans la vacuole (Gillooly et al., 2000 ; Wurmser and Emr, 1998).

#### • Le PI(3,5)P<sub>2</sub>:

Il est principalement présent au niveau des endosomes tardifs/MVB et de la vacuole chez la Levure. Il est synthétisé à partir du PI(3)P par une PI(3)P5-kinase. La PI(3)P5-kinase de levure, Fab1,

est essentielle au tri de CPS mais pas de Ste2. Ce phospholipide pourrait donc avoir un rôle dans le tri spécifique de certains cargos (Odorizzi et al., 1998). De plus, le  $PI(3,5)P_2$  est reconnu par le domaine ENTH des protéines Ent3 et Ent5 qui sont indispensables au tri des protéines dans le MVB (Eugster et al., 2004 ; Friant et al., 2003 ) chez la Levure.

#### • Le LBPA :

Comme indiqué précédemment, ce lipide est un constituant des endosomes tardifs, en particulier des vésicules internes (Kobayashi et al., 1999), et des lysosomes (Mobius et al., 2003). Différentes études suggèrent même que ce lipide pourraît avoir un rôle dans la formation des vésicules internes. L'injection d'anticorps dirigés contre ce lipide interfère avec le trafic endosomal et la morphologie multivésiculaire du compartiment et entraîne une accumulation de cholestérol (Kobayashi et al., 2002 ; Kobayashi et al., 1999). Sa structure particulière en forme de cône pourrait favoriser la déformation de la membrane requise pour la formation des vésicules internes. De plus, une étude réalisée *in vitro* sur des liposomes montre que l'incorporation de LBPA dans ces liposomes suffit à leur faire adopter une forme multivésiculaire quand ils sont soumis à un gradient de pH (Matsuo et al., 2004). Cependant, ce lipide n'ayant pas été identifié chez la Levure, il est possible qu'il participe à un mécanisme de formation de vésicules internes spécifique des cellules de mammifères.

#### • Le cholestérol :

Une étude ayant pour but d'analyser la distribution du cholestérol dans la voie endocytaire de lymphocytes B humains a montré que 45 % du cholestérol de la voie endocytaire est associé aux MVB et que la majorité de ce cholestérol est en fait retrouvée dans les vésicules internes (Mobius et al., 2003). De plus, des microdomaines résistants aux détergents ont été identifiés dans les endosomes tardifs (Fivaz et al., 2002). Ces résultats suggèrent que comme les protéines, les microdomaines lipidiques de type radeaux lipidiques sont triés dans les vésicules internes du MVB. De façon intéressante, l'Annexine II, une protéine potentiellement impliquée dans la dynamique des membranes endosomales interagit avec le cholestérol dans des régions particulières de l'endosome (Mayran et al., 2003). De plus, des cellules HeLa appauvries en Annexine II par ARNi présentent un défaut de biogenèse du MVB mais le processus d'invagination n'est pas affecté contrairement aux mutants de classe E. Les auteurs proposent que les plate-formes riches en cholestérol et Annexine II aient un rôle indirect dans la fusion nécessaire à la séparation du MVB de l'endosome précoce dans une conception « modèle navette » de la voie endocytaire (Mayran et al., 2003). Cependant, il ne semble pas y avoir de protéines de la famille des annexines chez la Levure.

## e) Modèle de fonctionnement de la machinerie de tri et de formation du MVB

Un modèle de fonctionnement de tous ces composants dans le tri des protéines ubiquitinées et la formation du MVB a été proposé (Voir Fig.14) : Les récepteurs et autres protéines membranaires sont transportés jusqu'à l'endosome de tri soit après leur internalisation depuis la membrane plasmique, soit depuis le TGN. Au niveau de l'endosome de tri, les protéines ubiquitinées sont reconnues par le complexe ESCRT-0 qui les retient au niveau de microdomaines particuliers enrichis en PI(3)P. Des protéines de types GGA et TOM pourraient également intervenir. Ces microdomaines semblent être stabilisés par le recrutement de la clathrine par Hrs. Les protéines membranaires nonubiquitinées sont libres de diffuser latéralement dans la membrane de l'endosome et de recycler à la membrane plasmique ou au TGN. Les protéines ubiquitinées par contre sont reconnues par la machinerie de tri proprement dit, la machinerie ESCRT. Le complexe ESCRT-I, recruté grâce à l'interaction entre Hrs et Tsg101, fixe la protéine cargo ubiquitinée par l'intermédiaire du domaine UEV de Tsg101. La formation du complexe ESCRT-I active le complexe ESCRT-II par un mécanisme qui n'est pas bien défini pour le moment. Le complexe ESCRT-II reconnaît lui l'étiquette ubiquitine du cargo grâce au domaine NZF/GLUE de Vps36. ESCRT-II va déclencher l'oligomérisation des protéines Vps20, 32, 24 et 2 pour former le complexe ESCRT-III. Ce complexe assure le recrutement d'un certain nombre de protéines additionnelles comme la protéine Brol qui à son tour recrute l'enzyme de déubiquitination Doa4 qui clive l'étiquette ubiquitine du cargo avant son entrée dans les vésicules internes du MVB. ESCRT-III recrute également l'ATPase Vps4 qui dissocie l'ensemble de la machinerie de la membrane de l'endosome qui pourra de nouveau s'assembler pour le tri d'un nouveau cargo.


Figure 14 : Tri des protéines et formation du MVB . Les protéines de type GGA et Vps27/Hse1 reconnaissent les cargos ubiquitinés et les retiennent au niveau de microdomaines particuliers de l'endosome enrichis en clathrine. Vps27 recrute le complexe ESCRT-I depuis le cytoplasme jusqu'à la membrane de l'endosome où il reconnaît à son tour le cargo ubiquitiné par l'intermédiaire de Vps23. ESCRT-I active ESCRT-II qui à son tour permet la formation du complexe ESCRT-III. ESCRT-III recrute des protéines accessoires comme Bro1 ou l'ATPase Vps4. Bro1 recrute l'enzyme de déubiquitination Doa4 qui enlève l'étiquette ubiquitine du cargo avant son entrée dans les vésicules internes du MVB. L'ATPase Vps4 catalyse la dissociation de la machinerie ESCRT et la libération des protéines de classe E pour qu'elles puissent participer de nouveau au tri d'un nouveau cargo. Image issue de Babst (2005).

Pour le moment, le mécanisme de formation des vésicules internes (invagination de la membrane et fusion pour libérer la vésicule) n'est pas connu. Les lipides pourraient jouer un rôle important dans le processus d'invagination alors que le complexe ESCRT-III et l'ATPase Vps4 pourraient être impliqués dans le processus du fusion par analogie avec les protéines de la famille des SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) qui ont une structure hélicoïdale et l'ATPase NSF (*N-ethylmalmeimide-sensitive factor*) de type AAA qui sont impliquées dans les fusions membranaires des vésicules endosomales.

#### f) Des rôles autres que dans le trafic endocytaire

La première fonction attribuée au MVB fut celle d'un compartiment pré-lysosomal permettant le tri des protéines membranaires destinées à la dégradation dans les lysosomes. Cependant, de nombreuses autres études montrent que ce compartiment endocytaire est également impliqué dans d'autres processus biologiques.

#### (1) Rôle dans la réponse immunitaire

Ce compartiment intervient notamment dans la réponse immunitaire. En effet, les vésicules internes du MVB des cellules dentritiques immatures sont enrichies en molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II où elles sont en contact avec des peptides qui dérivent des protéines endocytées. Lors de la stimulation antigénique, le complexe CMH de classe II-peptide antigénique fusionne avec la membrane limitante du MVB puis celui-ci est transporté jusqu'à la membrane plasmique avec laquelle il fusionne à son tour. Le complexe CMH de classe II-peptide antigénique se retrouve alors à la surface membranaire d'où il peut activer les cellules T naïves (Kleijmeer et al., 2001).

La stimulation antigénique des cellules dentritiques peut également entraîner la fusion du MVB avec la membrane plasmique sans qu'il y ait eu fusion préalable des vésicules internes avec la membrane limitante. Les vésicules internes sont alors sécrétées hors de la cellule et prennent le nom d'exosomes (Denzer et al., 2000). Ces exosomes enrichis en molécules de CMH pourraient activer les cellules T (pour revue, voir Fevrier and Raposo (2004)).

De façon intéressante, une analyse protéomique d'exosomes dérivés de cellules dentritiques a révélé la présence des protéines Tsg101 et Alix (Thery et al., 2001). Ces exosomes sont également enrichis en cholestérol, comme les vésicules internes du MVB (Mobius et al., 2002).



Figure 15 : Le MVB dans la réponse immunitaire. Les vésicules internes du MVB peuvent contenir des molécules de CMH de classe II où elles sont en contact avec des peptides antigéniques. Lors de la stimulation antigénique, le complexe CMH de classe Il doit activer les cellules T. Pour cela. les vésicules internes du MVB peuvent fusionner avec la membrane limitante de celui-ci puis avec la membrane plasmique afin d'exposer le complexe CMH de classe II à la surface cellulaire. Une autre possibilité est que la membrane limitante du MVB fusionne avec la membrane plasmique libérant ainsi les vésicules internes dans le milieu extracellulaIre. Les vésicules internes prennent alors le nom d'exosomes. Schéma adapté de Katzmann et al. (2002).

#### (2) Rôle dans le bourgeonnement viral

Par ailleurs, des travaux récents ont montré l'implication de la machinerie ESCRT dans un processus topologiquement équivalent à la formation de vésicules dans la lumière de l'endosome, le bourgeonnement de particules virales (VIH, Ebola...), (pour revue, (Morita and Sundquist, 2004 ; Pornillos et al., 2002 )).

Le recrutement des composants de la machinerie de tri et de formation du MVB à la membrane plasmique se fait notamment grâce à la présence d'un certain nombre de motifs, en

combinaison entre eux ou non, retrouvés dans les L-domaines des rétrovirus (L-domaine pour « *late domain* » car des mutations dans ces domaines conduisent à un arrêt tardif dans l'assemblage des retrovirus). Le premier motif est PPXY qui permet le recrutement d'une ubiquitine ligase de type HECT qui va ainsi ubiquitiner les protéines viirales Gag (Martin-Serrano et al., 2005). Un motif P(T/S)AP est également retrouvé dans de nombreux L-domaines et permet le recrutement de la protéine Tsg101. L'ubiquitination de la protéine virale semble augmenter l'affinité de Tsg101 pour la protéine Gag (Garrus et al., 2001). Un troisième motif est également présent, de type  $YP(X)_nL$ , qui permet le recrutement d'Alix (Martin-Serrano et al., 2003 ; Segura-Morales et al., 2005 ; Strack et al., 2003 ; von Schwedler et al., 2003 ). Les protéines du complexe ESCRT-III ainsi que l'ATPase Vps4 sont également impliquées dans le bourgeonnement viral car des mutants dominants-négatifs de ces protéines inhibent le bourgeonnement des virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et de l'anémie infectieuse du cheval (EIAV) (Martin-Serrano et al., 2003 ; Strack et al., 2003 ; von Schwedler et al., 2003 ).

Il est également intéressant de noter que dans les macrophages en particulier, le bourgeonnement du VIH ne se fait pas seulement à la membrane plasmique mais peut aussi se faire à partir du MVB. Après fusion du MVB avec la membrane plasmique, les particules virales sont libérées à l'extérieur de la cellule comme les exosomes (Raposo et al., 2002). Enfin, comme dans le cas des exosomes, une analyse du contenu protéique des virions par Western-blot a révélé la présence des protéines Tsg101, Vps28, Alix et Vps4 (von Schwedler et al., 2003).



Figure 16 : Modèles de libération des particules virales hors de la cellules. La particule virale recrute le complexe ESCRT-I à travers son interaction avec la protéine Tsg101. Ce recrutement se fait soit à la membrane plasmique soit à la surface de l'endosome. Le reste de la machinerie est ensuite assemblé et permet la sortie des particules virales soit à la membrane plasmique par bourgeonnement soit par libération des vésicules internes du MVB après fusion avec la membrane plasmique comme pour les exosomes. Schéma adapté de Demirov and Freed (2004).

# II. L'AMIBE DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM

#### 1. Un organisme modèle

Dictyostelium discoideum est un organisme eucaryote, de génome haploïde, utilisé dès 1937 par K.B. Raper comme modèle expérimental. Depuis 1999, cet organisme est reconnu par le NIH (*National Institutes of Health*, USA) comme modèle pour la recherche biomédicale. Son génome d'environ 34 Mégabases organisé en 6 chromosomes est maintenant complètement séquencé (Eichinger et al., 2005). Il contient environ 12500 gènes, ce qui est plus proche des organismes eucaryotes multicellulaires (*Drosophila melanogaster* en a environ 14000) que des organismes eucaryotes unicellulaires (*Saccharomyces cerevisiae* en a environ 5500). Cependant, en utilisant 5279 clusters de protéines orthologues issus de 17 protéomes d'eucaryotes différents, les auteurs ont pu construire un arbre phylogénétique montrant que *Dictyostelium* a divergé après la séparation plante/animal mais avant la divergence des champignons (Fig.17).



Figure 17 : Arbre phylogénétique. Figure issue de l'article de Eichinger et al. (2005).

# 2. Le cycle de différenciation

#### a) La vie végétative

En conditions nutritives, *Dictyostelium* se présente sous la forme d'une petite cellule d'environ 10  $\mu$ m de diamètre se nourissant par phagocytose de bactéries ou de levures (Kessin, 2001). Les souches utilisées en laboratoire portent deux mutations ponctuelles, *axeA* et *axeB*, leur permettant de se nourrir également par macropinocytose de milieu axénique (Williams et al., 1974). Cette capacité

importante de pinocytose et de phagocytose (supérieure à celles des macrophages et neutrophiles) en fait un organisme très utilisé en laboratoire pour étudier ces processus.

La phagocytose chez *Dictyostelium* est très similaire à celle décrite dans les cellules de mammifères (pour revue (Rupper and Cardelli, 2001)). Cependant, les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des particules ne sont pas encore identifiés avec certitude (Vogel et al., 1980). Des études récentes réalisées dans le laboratoire de Pierre Cosson (Université de Genève, Suisse) par mutagenèse insertionnelle ont permis d'isoler une protéine à 9 domaines transmembranaires nécessaire à la phagocytose, la protéine Phg1 (Cornillon et al., 2000). Cette protéine pourrait être un récepteur permettant la phagocytose sélective de certains substrats.

L'endocytose de phase fluide se fait au taux de 9 fl/cellule/minute soit l'équivalent de son propre volume par heure (Klein and Satre, 1986) et la cellule pourrait renouveler la totalité de sa membrane plasmique toutes les 4 à 10 minutes (Aguado-Velasco and Bretscher, 1999), (pour revue (Maniak, 2001)).

La phagocytose et la macropinocytose sont deux processus extrêmement proches, tant au niveau de la formation de la coupe endocytique que dans le transit intracellulaire. La phase d'internalisation fait intervenir l'actine et des protéines de liaison à l'actine comme la coronine (de Hostos et al., 1991; Hacker et al., 1997), ainsi que des protéines contribuant au remodellage du réseau d'actine et à la formation des vésicules. C'est le cas des protéines ABP 120 (Cox et al., 1996) et de la fimbrine (Prassler et al., 1997) qui sont enrichies au niveau des structures macropinocytaires ou de la coupe phagocytaire et de la taline (Kreitmeier et al., 1995) ou de la ponticuline (Hitt et al., 1994) qui assurent l'ancrage du cytosquelette à la membrane plasmique. De plus, les protéines motrices comme les myosines de classe I (pour revue, voir Soldati (2003)) et les protéines qui participent au cycle de polymérisation /dépolymérisation de l'actine comme la profiline (Temesvari et al., 2000) et la protéine CAP (*cyclase-associated protein*) (Noegel et al., 1999) sont également nécessaires.

Les activités phagocytaires ou macropinocytaires nécessitent un apport important de membranes. Des travaux récents réalisés sur le complexe AP-1 qui participe au bourgeonnement de vésicules recouvertes de clathrine à partir du TGN suggèrent que des vésicules en provenance du Golgi fusionnent avec la membrane plasmique au niveau du site de formation des vésicules et apportent ainsi de la membrane (Lefkir et al., 2004).

Moins d'une minute après la formation de la vésicule, celle-ci perd son manteau d'actine (Hacker et al., 1997) et un apport d'enzyme permet son acidification. L'enzyme majeure responsable de l'acidification est l'ATPase vacuolaire (Clarke et al., 2002) et le maintien à un faible pH dépend de transporteurs membranaires de type ABC (Brazill et al., 2001). Au même moment la protéine Rab7 s'associe à la membrane des endosomes (Rupper et al., 2001b). A ce stade, les endosomes se déplacent le long des microtubules et deviennent compétents pour la fusion homotypique (c'est-à-dire endosome-endosome). Cette fusion dépend de la petite protéine G, Rab7 (Laurent et al., 1998) et met en jeu la machinerie des SNAREs (Bogdanovic et al., 2002), SNAP (Weidenhaupt et al., 2000) et l'ATPase NSF (Weidenhaupt et al., 1998). Ces compartiments vont ensuite acquérir des enzymes lysosomales qui vont arriver par vagues. Les premières enzymes portent une modification de type

Man-6-SO<sub>4</sub> comme la Cathepsine D (Journet et al., 1999) puis arrivent celles modifiées par GlcNac-1-P et enfin celles portant les modifications Man-6-P (Souza et al., 1997). Il faut noter qu'en dépit de la capacité des enzymes lysosomales de *Dictyostelium* à lier les récepteurs au Man-6-P des cellules de mammifères, jusqu'à maintenant, aucun homologue de ce récepteur n'a été identifié chez *Dictyostelium* (Freeze et al., 1980). Cependant, le séquençage récent de la totalité du génome a permis d'identifier 10 gènes avec des domaines Man-6-PR (Eichinger et al., 2005). Leur rôle dans la voie endocytaire reste à déterminer. Il est également intéressant de noter qu'il n'y a pas de mélange des différentes populations d'enzymes ce qui indique l'existence de phases de recyclage de matériels et une absence de fusion homotypique entre ces lysosomes (Souza et al., 1997).

Trente minutes après l'internalisation, le pH du compartiment redevient neutre avec notamment le départ de l'ATPase vacuolaire qui pourrait recycler vers les endosomes précoces (Nolta et al., 1994). La présence d'un compartiment post-lysosomal au pH plus basique que le lysosome est une caractéristique la voie endocytaire de *Dictyostelium* (Aubry et al., 1993 ; Padh et al., 1993). Ce compartiment neutre se couvre alors d'un manteau d'actine et de protéines associées comme la coronine (Rauchenberger et al., 1997), le complexe ARP2/3 (Insall et al., 2001) et la protéine Scar (Seastone et al., 2001) qui régulent la formation du manteau d'actine. Plus tardivement, ces vésicules vont également s'enrichir d'un autre marqueur, la vacuoline (Rauchenberger et al., 1997). Ce manteau de F-actine empêche l'agrégation des post-lysosomes et facilite leur association au cortex cellulaire nécessaire à l'étape d'exocytose. Cette exocytose qui a lieu environ 60 minutes après l'internalisation, permet la libération de particules non digérées et d'enzymes lysosomales comme l' $\alpha$ -mannosidase ou la  $\beta$ -glucosidase (Dimond et al., 1981).

En plus de la macropinocytose, le fluide peut également entrer par une voie clathrinedépendante (micropinocytose). Un mutant nul pour la chaîne lourde de la clathrine présente un défaut d'internalisation du fluide ainsi qu'un défaut dans la sécrétion des enzymes lysosomales (O'Halloran and Anderson, 1992 ; Ruscetti et al., 1994). La contribution de la micropinocytose pour l'entrée du fluide étant minime par rapport à l'activité macropinocytaire, le défaut important observé dans le mutant *clathrine*-nul pourrait être une conséquence indirecte d'autres fonctions assurées par cette protéine.

Par ailleurs, si des cages de clathrine ont été observées chez *Dictyostelium* (Damer and O'Halloran, 2000 ; O'Halloran and Anderson, 1992 ), l'endocytose à récepteurs est encore très peu documentée.

Enfin, bien que la membrane plasmique de *Dictyostelium* contienne des domaines lipidiques de types radeaux lipidiques (Harris et al., 2001), leur rôle dans l'endocytose reste à démontrer.

#### b) Le développement multicellulaire

En cas de carence nutritive, les cellules s'engagent dans un processus de différenciation et de morphogenèse conduisant à la formation d'une structure pluricellulaire (voir Fig.18). Ce processus est contrôlé par un signal pulsatile d'AMPc émis par une cellule entrant en jeûne (pour revue voir Aubry and Firtel (1999)). Les cellules situées à proximité vont répondre à ce signal en se dirigeant vers la source d'AMPc par chimiotactisme et vont elles-même propager le signal en sécrétant à leur tour de l'AMPc. Ce processus permet la formation d'agrégats composés d'environ 10<sup>5</sup> cellules. La multicellularité de Dictyostelium n'est donc pas le résultat de divisions cellulaires mais d'une réunion d'individus isolés. La signalisation basée sur l'émission d'AMPc va durer pendant tout le développement. L'AMPc extracellulaire est détecté grâce à 4 récepteurs à l'AMPc différents appelés cAR1-4 appartenant à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les récepteurs diffèrent entre eux par leur profil d'expression spatio-temporelle et leur affinité pour l'AMPc. Après quelques heures, la structure évolue pour devenir un limaçon capable de migrer et composé de deux types cellulaires : les cellules prétiges (20 à 30% des cellules) et les cellules préspores (70 à 80% des cellules). Les cellules s'organisent selon un axe antéro-postérieur bien défini. Une phase de culmination conduit à la fructification terminale constituée d'une tige formée de cellules vacuolisées entourées de cellulose capable de maintenir au-dessus du sol une masse de spores, le tout reposant sur un disque basal. Le développement s'achève 24 h après l'émission du premier signal d'AMPc. Les spores, qui sont résistantes à la chaleur, à la déshydratation et à l'absence de nutriments, vont pouvoir regermer et donner de nouvelles cellules indépendantes après dissémination dans un milieu fertile.



Figure 18 : Cycle de différenciation de *Dictyostelium discoideum*. En situation de carence nutritive, cet eucaryote normalement unicellulaire, est capable d'agréger pour donner une structure multicellulaire appelée fructification. Elle est constituée principalement de deux types cellulaires : les cellules tiges qui sont mortes et vacuolisées et une masse de spores en dormance capables de regermer lorsque les conditions redeviennent favorables pour redonner des cellules individuelles. D'après Aubry and Firtel (1999).

# 3. Les différents types cellulaires

La différenciation en cellules prétiges et préspores débute dès le stade agrégat. Chacune de ces populations cellulaires va alors exprimer un certain nombre de gènes qui leur sont spécifiques et qui sont utilisés comme marqueurs de ces types cellulaires (Fig.19) (pour revue voir Aubry and Firtel (1999)). Ainsi, la base de l'agrégat est composée d'une sous-population de cellules prétiges appelées PstB qui expriment essentiellement le gène *ecmB*. Ces cellules sont également retrouvées à la base du limaçon et dans le disque basal de la fructification. Une autre sous-population de cellules prétiges est

présente dans l'agrégat et forme la partie supérieure de celui-ci, ce sont les cellules PstA. Elles expriment essentiellement le gène *ecmA*. Elles donneront la partie antérieure du limaçon. D'autres sous-populations de cellules prétiges sont également visibles au stade limaçon : les cellules PstO, exprimant le gène *ecmO*, qui deviendront les cellules de la coupe supérieure qui entoure la masse de spore et enfin les cellules PstAB (exprimant *ecmA* et *ecmB*) formant un cône au sein de la population PstA au stade limaçon et qui donneront ensuite les cellules de la tige et de la coupe inférieure. Le corps de l'agrégat et par la suite l'essentiel du corps du limaçon sont formés par les cellules préspores Psp exprimant le gène *SP60*.



**Figure 19 : Position des différents types cellulaires au cours du développement.** Psp :préspores, Pst : prétiges de type A, O, B et AB. Schéma d'après la revue (Aubry and Firtel, 1999).

# 4. La mort des cellules tiges

Le programme de développement multicellulaire de *D. discoideum* conduit à la formation de fructifications comportant une masse de spores capables de regermer lorsque l'environnement redevient favorable, soutenue par une tige composée de cellules mortes vacuolisées (Whittingham et al., 1960). Les cellules prétiges font donc l'objet d'un programme de mort cellulaire développemental. Sur cellules en monocouche, le laboratoire de Pierre Golstein (CIML, Marseille) a pu montrer que ce programme de mort conduit à une vacuolisation massive ainsi qu'à une condensation du cytoplasme et de la chromatine mais sans fragmentation de l'ADN. Ces résultats indiquent que ce programme de mort est non-apoptotique mais plutôt de type vacuolaire/autophagique (Cornillon et al., 1994; Levraud, 2003 #304). Cependant, des travaux récents ont montré que l'inactivation des gènes autophagiques inhibe la vacuolisation massive du cytoplasme mais pas la mort cellulaire chez *D. discoideum*. Ces résultats suggèrent que soit l'autophagie n'est pas nécessaire à la mort soit qu'il existe un deuxième type de mort non vacuolaire (Kosta et al., 2004).

La mort des cellules en monocouche n'est pas inhibée par l'utilisation d'inhibiteurs de caspases. Par contre, la morphogenèse est affectée par ces inhibiteurs de caspases lors du

développement multicellulaire suggérant qu'une molécule caspase-*like* est nécessaire au programme de développement (Olie et al., 1998). L'analyse du génome de *Dictyostelium* a révélé la présence d'un nombre limité de protéines homologues à des protéines décrites chez les mammifères pour avoir un rôle dans la mort cellulaire programmée : une paracaspase putative, (les paracaspases sont avec les metacaspases des protéines ayant de fortes homologies avec les caspases), la protéine AIF (*apoptosis inducing factor*), deux homologues de la protéine ALG-2 (*apoptosis-linked gene 2*) et son partenaire Alix (*ALG-2 interacting protein X*).

#### • Les paracaspases

Ces protéines sont trouvées chez les animaux et *Dictyostelium* alors que les métacaspases sont présentes chez les plantes et les champignons (Uren et al., 2000). L'invalidation de la paracaspase de *Dictyostelium* ne modifie pas le programme de mort développemental ni la morphogenèse (Roisin-Bouffay et al., 2004).

#### • La protéine AIF

La protéine AIF est située dans l'espace intermembranaire mitochondrial et est libérée dans le cytosol lorsque la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie est rompue lors de l'activation de la mort cellulaire. Cette protéine qui favorise la mort des cellules pourrait être impliquée dans des processus de mort caspase-indépendants (Susin et al., 1999). Dd-AIF est également localisé dans la mitochondrie et transloqué dans le cytosol et le noyau lors de l'induction du programme de mort suggérant que ce programme implique la mitochondrie et Dd-AIF (Arnoult et al., 2001).

#### • La protéine ALG-2

Cette protéine a été découverte dans un screen génétique comme une protéine pro-apoptotique (Vito et al., 1996). C'est une petite protéine qui fait partie de la famille des protéines à penta-EF-hand capable de lier le  $Ca^{2+}$  (pour revue sur cette protéine, (Tarabykina et al., 2004). Cette protéine semble jouer un rôle dans l'apoptose induite par Fas et les glucocorticoïdes parce qu'un appauvrissement des cellules T en ALG-2 inhibe l'apoptose alors qu'elle est au contraire favorisée par sa surexpression (Jung et al., 2001 ; Vito et al., 1996 ). Chez *Dictyostelium*, deux isoformes, ALG-2a et ALG-2b, ont été identifiées et étudiées au laboratoire. L'invalidation des deux gènes ne se traduit par aucun phénotype anormal de développement révélant que ces protéines ne sont pas indispensables au programme de mort des cellules tiges (Aubry et al., 2002). Peu de temps après cette étude chez *D. discoideum*, l'invalidation d'*alg-2* chez la souris a été publiée. Cette souris invalidée ne présente aucun défaut de développement, de réponse immunitaire et les cellules T issues de cette souris ne présentent pas de défauts majeurs dans leur réponse apoptotique confirmant que cette protéine n'est pas indispensable à la mort cellulaire proprement dite (Jang et al., 2002).

# • La protéine Alix

Elle a été identifiée comme partenaire de la protéine ALG-2 (Missotten et al., 1999; Vito et al., 1999) et de SETA (*SH3-containing protein enhanced in tumorigenic astrocytes*) trouvée dans des astrocytes tumorigéniques (Chen et al., 2000), suggérant un lien possible entre Alix et la mort cellulaire. De plus, la surexpression d'Alix est suffisante pour induire la mort neuronale caspase–dépendante alors que la surexpression de son domaine C-terminal empêche l'activation des caspases et protège ces mêmes cellules de la mort. Ces effets nécessitent l'intégrité du site d'interaction avec ALG-2 (Trioulier et al., 2004). L'effet protecteur de la surexpression du domaine C-terminal d'Alix a aussi été décrit lors de la mort induite par le retrait des facteurs trophiques (Vito et al., 1999). La surexpression d'Alix a également été montrée comme induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 de cellules HeLa confluentes (Wu et al., 2001), favorisant le détachement des cellules induit par l'apoptose (anoïkis) et inhibant le détachement des cellules viables de leur substrat. Ces résultats indiquent qu'Alix peut avoir un rôle de régulateur positif de la signalisation apoptotique et de régulateur négatif de la transformation cellulaire (Wu et al., 2002).

# **III. LES OBJECTIFS DE LA THESE :**

*Dictyostelium discoideum* est un organisme où différenciation cellulaire et mort programmée sont des composants essentiels du cycle de développement. C'est une des raisons pour lesquelles le laboratoire l'a choisi comme modèle pour mettre à jour des voies de signalisation ancestrales conduisant à la mort et communes à différents morphotypes de mort programmée. Peu d'homologues de protéines impliquées dans la mort cellulaire programmée chez les mammifères sont présents dans le génome de *Dictyostelium*. Quand j'ai entrepris mon travail de thèse, Alix venait d'être ajouté à la liste des protéines à fonction pro-apototique et semblait donc un candidat intéressant aux fonctions encore peu connues. Son étude chez *Dictyostelium* a été l'objet du travail présenté ici.

La première partie mon travail a porté sur la caractérisation de la protéine Alix et l'évaluation de son rôle dans la mort conduisant à la formation des cellules tiges. Pour ce faire, le gène *alx* a été invalidé et les conséquences de son absence sur la formation des cellules tiges ont été analysées. Pour appréhender sa fonction, sa distribution subcellulaire a été étudiée et a permis la mise en évidence de son lien avec la voie endocytaire.

La deuxième partie de mon travail a consisté à développer différents outils (souches invalidées, mutants dominants-négatifs, anticorps...) pour étudier l'association d'Alix avec la machinerie de tri et de formation du corps multivésiculaire (MVB), la machinerie ESCRT.

Enfin, la dernière partie de mon travail a eu pour but d'identifier de nouveaux partenaires d'Alix en utilisant le système double-hybride et a révélé une interaction entre Alix et des protéines de la famille des Formines et qu'Alix peut être régulé par ubiquitination.

# MATERIEL ET METHODES

# I. TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

# 1. Souches et Méthodes de culture

#### a) Dictyostelium discoideum

La souche sauvage NC4 de *D. discoideum* se nourrit par phagocytose uniquement. La souche KAx-3 dérivée de NC4 et utilisée au laboratoire porte deux mutations ponctuelles *axeA* et *axeB* permettant sa culture en milieu axénique (composition indiquée dans le Tableau 4) (Williams et al., 1974). Elle est maintenue en culture à la température de 21°C, sous agitation (175 tours/minute). Les invalidations de gènes dans cette souche sont réalisées par l'utilisation d'une cassette de résistance à la blasticidine. Dans ce cas, la blasticidine est ajoutée au milieu de culture à raison de 7,5 µg/ml.

La souche JH10 a également été utilisée: elle est dérivée de KAx-3 mais est auxotrophe pour la thymidine (Dynes and Firtel, 1989). Cette souche est maintenue en culture en présence de thymidine exogène à la concentration de  $100 \mu g/ml$ .

Dans le cas des surexpresseurs utilisant la résistance à la généticine comme mode de sélection, la généticine est rajoutée au milieu de culture à raison de 20  $\mu$ g/ml.

Dans ces conditions de culture, le temps de doublement des amibes est d'environ 8 à 10 h. Pour toutes les expériences, les cellules sont prélevées en phase exponentielle de croissance soit entre  $5.10^6$  et  $1.10^7$  cellules/ml. Le nombre de cellules et leur distribution de taille sont donnés par un compteur de cellules (Beckman Coulter Z2). Les cellules peuvent également être cultivées sans agitation, en boîtes de Petri (Falcon 35-3003) contenant 10 ml de milieu axénique.

Composé (fournisseur)	g/l
Peptone (Oxoid)	14,30
Extrait de levure (Oxoid)	7,15
Maltose, H <sub>2</sub> O	18,00
$Na_2HPO_4$ , $12H_2O$	1,28
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,48
Dihydrostreptomycine sulfate	0,25

Tableau 4 : Composition du milieu axénique de culturede Dictyostelium discoideum. (Watts and Ashworth,1970)

Pour déclencher le cycle de différenciation multicellulaire, les cellules sont placées en situation de carence nutritive en milieu Na/K phosphate (12 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH ajusté à 6,1 avec du KOH). Le développement multicellulaire se fait sur des boîtes d'agar en tampon Na/K phosphate additionné de 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>. Les cellules, lavées 2 fois en tampon Na/K phosphate afin d'éliminer les nutriments, sont étalées à raison de  $2.10^6$  cellules /cm<sup>2</sup>. L'observation du phénotype se fait grâce à une loupe binoculaire (Nikon, SMZ-U) sur une période de 24 h qui couvre la totalité du cycle. Le développement peut aussi être induit en culture agitée. Pour cela, les cellules sont lavées et remises en suspension en tampon Na/K phosphate et de l'AMPc est ajouté par pulse. La phase d'agrégation est mimée par des pulses de 30 nM d'AMPc toutes les 6 min pendant 4 h. Les cellules sont ensuite stimulées par addition de 300  $\mu$ Md'AMPc toutes les deux heures pour induire la différenciation sans morphogenèse.

#### b) Les Bactéries

La bactérie *Escherichia coli* se cultive en aérobiose à 37°C soit en milieu liquide sous une agitation de 180 rpm, soit sur milieu solide.

La souche d'*E. coli* utilisée pour le sous-clonage est XL1-Blue qui possède une cassette de résistance à la tétracycline. Pour l'expression de protéines, les bactéries utilisées sont les BL21-DE3 (Stratagène) qui n'expriment plus les protéases OmpT et Lon afin de diminuer le taux de dégradation des protéines recombinantes. Les bactéries sont rendues compétentes, c'est-à-dire traitées pour permettre une pénétration efficace de l'ADN en utilisant le protocole d'Inoue (Inoue et al., 1990).

**Préparation de bactéries compétentes :** 5 ml de milieu Luria Broth (LB, composition indiquée dans le Tableau 5) sont ensemencés avec une colonie de bactéries. Après une nuit à 37°C sous agitation, 3 ml de cette culture sont dilués au 1/100 dans du milieu SOB (composition indiquée dans le Tableau 6). Les bactéries sont mises à agiter à 18°C jusqu'à une DO<sub>600</sub> de 0,6. La culture est ensuite refroidie 10 min dans la glace puis centrifugée 10 min à 2500 g à 4°C. Le culot est délicatement repris dans 30 ml de tampon TB froid (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, pH ajusté à 6,7 avec du KOH puis ajout de 55 mM MnCl<sub>2</sub>). La solution de TB est stérilisée par filtration à travers des filtres Millipore ayant des pores de 0,22  $\mu$ m. L'ensemble est mis en incubation 10 min dans la glace puis recentrifugé 10 min à 2 500 g à 4°C. Le culot est repris dans 24 ml de TB auquel est ajouté 1,75 ml de DMSO. La suspension est aliquotée puis congelée dans l'azote liquide.

Composé	g/l
Bacto <sup>™</sup> Tryptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	10

Tableau 5 : Composition du milieu Luria Broth (LB).

Composé	g/l
Bacto <sup>™</sup> Tryptone	20
Extrait de levure	5
NaCl	0,5
KC1	0,186
MgSO <sub>4</sub>	2,4

Tableau 6 : Composition du milieu de culture SOB.

Pour cloner *D. discoideum*, les bactéries *Klebsiella aerogenes* sont utilisées. Ces bactéries se cultivent dans du milieu SM<sup>+</sup> (14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 56 mM D-Glucose, 10 g/l de Bacto<sup>TM</sup> Peptone DIFCO, 1 g/l d'extrait de levure DIFCO).

#### c) Les Levures

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée est EGY48 qui est auxotrophe pour l'histidine, la leucine, le tryptophane et l'uracile.

# 2. Electroporation de *D. discoideum* et clonage sur tapis de *K. aerogenes*

Les différentes constructions sont introduites dans les cellules de *D. discoideum* par électroporation. Environ  $1.10^7$  cellules sont mises dans la glace pendant 15 min puis centrifugées 5 min à 1 400 g. Le culot est resuspendu dans 1 ml de tampon d'électroporation froid (10 mM Na/K phosphate, 50 mM saccharose). 800 µl de cellules sont déposés dans une cuve d'électroporation de 0,4 cm de distance inter-électrodes, en présence de 20 à 30 µg d'ADN de la construction choisie. L'ensemble est gardé dans la glace pendant 1 min puis l'électroporation est réalisée à 3 µF, 1 kV par 2 pulses. Les cellules sont ensuite déposées dans 10 ml de milieu de culture sans pression de sélection pendant 24h. Le lendemain, les cellules sont mises dans un milieu sans thymidine (pour les mutants nuls de la souche JH10) ou bien en présence de blasticidine (pour les nuls dans la souche KAx-3) ou

de généticine (pour les surexpresseurs) afin d'éliminer les cellules n'ayant pas intégré les différentes constructions. Les clones sont visibles après 3 à 4 jours de sélection.

*D. discoideum* se nourrissant de bactéries, il est possible de cloner les transformants sur un tapis de *K. aerogenes*. Les bactéries sont mises en culture à température ambiante dans 10 ml de milieu SM<sup>+</sup>. Une centaine de transformants est mélangée avec 700  $\mu$ l de la culture au plateau de *K. aerogenes*, puis étalée sur un milieu gélosé SM<sup>+</sup>/3 (14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 18,6 mM D-Glucose, 3,3 g/l de Bacto<sup>TM</sup> Peptone DIFCO, 0,3 g/l d'extrait de levure DIFCO). Des plaques apparaissent après quelques jours dans le tapis bactérien. Elles correspondent à des plages de croissance et de multiplication des cellules de *D. discoideum*. Une plage correspond à un clone amibien. Les amibes au stade végétatif se trouvent en périphérie de ces plages, en contact avec les bactéries alors qu'au centre, dépourvu de bactéries, apparaissent des fructifications. Les cellules végétatives sont ensuite transférées en milieu liquide en faisant attention de ne pas prendre les bactéries en bordure de la colonie pour éviter les problèmes de contamination.

# 3. Test du développement en monocouche

Pour induire la formation de cellules tige en monocouche, les cellules sont lavées avec du tampon KK2 (20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6) et déposées dans des boîtes de culture à une densité de  $10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>, contenant du milieu « tige » (10 mM Mes pH 6, 2 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 µg/ml d'ampicilline) supplémenté avec 5 mM d'AMPc. Après 20 h, le milieu est enlevé et les cellules sont lavées trois fois avec le milieu tige. Les cellules sont de nouveau incubées pendant 24h avec du milieu « tige » supplémenté avec 100 nM de DIF-1(Affinity Research), une cétone chlorée qui est un facteur d'induction de la différenciation soit seul soit avec 5 mM AMPc. Les cellules qui ont plus de 50% de leur surface vacuolisée sont comptées comme étant des cellules tiges.

#### 4. Immunofluorescence

Les expériences d'immunofluorescence sont réalisées sur les lames Chamber Slide, Lab Tek (Nunc).  $10^5$  cellules sont déposées par puits et laissées à adhérer 30 min. Les cellules sont ensuite fixées pendant 10 min dans 400 µl de 40 mM Mes-Na pH 6,5/ 4 % paraformaldéhyde (PFA) puis perméabilisées pendant 2 min dans 400 µl de 40 mM Mes-Na pH 6,5/ 0,2 % Triton X-100. Les cellules sont ensuite lavées et les sites non spécifiques sont bloqués pendant 1 h avec 400 µl d'une solution de PBS (*Phosphate Buffer Salin*: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaPi, 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4)/ 0,5 % BSA. L'anticorps est utilisé à la dilution indiquée dans le Tableau 7 dans 200 µl d'une solution de PBS/ 0,1 % Tween 20 pendant 1 h. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois 10 min en PBS/ 0,1 % Tween 20 puis laissées à incuber 45 min avec l'anticorps secondaire couplé au FITC

dilué au 1/200 ou couplé à la cyanine3 dilué au 1/800 (Jackson Immuno Research) dans 200  $\mu$ l d'une solution de PBS/ 0,1 % Tween 20. Les cellules sont de nouveau lavées 3 fois avec 400  $\mu$ l de PBS/ 0,1% Tween 20. Les noyaux sont marqués au DAPI (1  $\mu$ M dilué dans 400  $\mu$ l de PBS/ 0,1 % Tween 20). Ce marquage se fait à la fin du protocole, au moment des lavages finaux. Pour marquer les mitochondries, le mitotracker (Molecular Probes) est utilisé. 10<sup>5</sup> cellules sont déposées par puits laissées adhérer 30 min. 400  $\mu$ l de mitotraker sont ajoutés (500 nM dilué dans 40 mM Mes-Na pH 6,5) pendant 30 min. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois 5 min en 40 mM Mes-Na pH 6,5 puis fixées en PFA comme indiqué précédemment. La suite du protocole reste inchangée. L'actine est révélée par un marquage TRITC-phalloïdine (Sigma) réalisé en même temps que l'anticorps secondaire. Après montage, la lamelle est scellée puis observée sur un microscope inversé AXIOVERT 200M (Zeiss) à l'objectif 63X.

Anticorps	Dilutions	Origine
Anti-alix	serum non purifié 1/500	ce travail
Anti-vps32	serum non purifié 1/500	ce travail
Anti-vps4	serum non purifié 1/400	ce travail
Anti-myc	1/500	9E10 (Roche)
Anti-ubiquitine (FK2)	1/500	Tébu
Anti-vacuoline	1/4	M.Maniak (Jenne et al., 1998)
Anti-tubuline	1/2000	DM1A (Sigma)

Tableau 7 : Dilutions des différents anticorps pour les immunofluorescences.

Pour les immunofluorescences réalisées sur l'organisme multicellulaire entier, les cellules sont déposées sur un milieu gélosé Na/K phosphate de façon à déclencher le programme de développement. Au stade de développement souhaité, le milieu gélosé est découpé et plongé pendant 5 min dans un bain de méthanol qui fixe et perméabilise les cellules. Avec une pipette, les structures sont délicatement aspirées puis déposées sur une lame recouverte de poly-L-lysine. Dès que le méthanol est évaporé, les structures sont immunomarquées selon le même protocole que décrit précédemment.

# 5. Marquage $\beta$ -galactosidase et GFP

Les gènes codant pour la  $\beta$ -galactosidase, *lacZ*, ou pour la GFP sont utilisés comme rapporteurs pour suivre l'activation de gènes spécifiques au cours du développement. Les cellules contenant différents plasmides (promoteurs spécifiques/lacZ) font l'objet d'un marquage  $\beta$ galactosidase à différents temps du développement. Les transformants sont étalés sur des filtres (Millipore, filtre blanc type HAWP, de diamètre 2,5 cm et avec des pores d'une taille de 0,45  $\mu$ m) déposés sur un milieu gélosé Na/K phosphate, afin d'induire le développement multicellulaire. Au temps de développement voulu, le filtre est déposé sur une solution de fixation (0,5% glutaraldéhyde, 0,05% Triton X-100 complété à 25 ml final par du tampon Z: 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 6,9) pendant 5 min pour permettre au glutaraldéhyde de fixer les structures sur le filtre. Le filtre est ensuite recouvert par ce même tampon pendant encore 2 fois 5 min. Le filtre est ensuite rincé dans du tampon Z puis 1 ml de solution de marquage (5 mM K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>), 5 mM K<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>), 1 mM X-Gal (1% DMF) complété à 1 ml final par du tampon Z) est déposé à la surface du filtre. Le filtre est placé quelques min à 37°C puis la réaction est arrêtée dans un mélange 50% méthanol/ 50% tampon Z. Le filtre est conservé dans une solution 20% méthanol/ 80% tampon Z.

Les cellules exprimant des constructions promoteurs spécifiques/GFP sont étalées sur des boîtes d'agar Na/K phosphate puis observées directement au microscope à fluorescence Nikon SMZ équipé d'un filtre GFP après sélection d'un clone au stade végétatif pour son haut niveau de fluorescence GFP.

# **II.** TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

#### 1. Sous-clonage

Amplification de l'ADN par PCR : Les constructions d'invalidation et des surexpresseurs ont été réalisées en utilisant des fragments amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique ou complémentaire. Les oligonucléotides ont été synthétisés par Génome Express et leur séquence a été définie de façon à introduire des sites de restriction permettant ensuite le sous-clonage des constructions dans des vecteurs appropriés.

La réaction de PCR est réalisée dans un volume de 100  $\mu$ l final contenant 10  $\mu$ l de tampon 10X (fourni par le fabricant), 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 200  $\mu$ M de dNTP, 0,1  $\mu$ g d'ADN, 1  $\mu$ M d'oligonucléotides, 1  $\mu$ l d'ADN polymérase Vent (New England BioLabs). Le programme de PCR débute par une étape de dénaturation de l'ADN (2 min à 94°C), puis se poursuit par 25 cycles (dénaturation: 1 min à 94°C, hybridation des oligonucléotides pendant 1 min à une température dictée par les amorces et élongation à 72°C) et se termine par une étape d'élongation de 5 à 10 min à 72°C pour que toutes les synthèses débutées par les amorces soient complétées. Dans le cas où les amplifications sont réalisées sur de l'ADN génomique, la température d'élongation est fixée à 65°C du fait de la richesse en AT (>90%) des introns. Le temps d'élongation est ajusté en fonction de la taille des introns.

La réaction de RT-PCR permet de synthétiser et d'amplifier de l'ADNc spécifique des amorces utilisées. Le kit QIAGEN (One-step RT-PCR) est utilisé selon les instructions du fournisseur. Il repose sur l'utilisation d'un mélange d'enzymes de reverse transcriptase (Omniscript et Sensiscript issues du Moloney murine leukemia virus et de l'avian myeloblastosis virus), dans un tampon contenant 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM de dNTP, 0,6 µM d'oligonucléotides, 20 unités d'inhibiteur d'ARNase, 0,5 µg d'ARN. La réaction de transcription inverse se fait à 50°C pendant 30 min, suivie de 15 min à 95°C pour inactiver les enzymes reverse transcriptase. Cette étape est suivie d'une réaction de PCR classique.

Les produits de PCR/RT-PCR sont ensuite vérifiés sur gel d'agarose 1% en TAE 0,5X contenant 0,005 % (v/v) de bromure d'éthidium puis sont débarrassés des contaminants protéiques par un traitement au phénol-chloroforme (1/1, 100  $\mu$ l). L'ADN contenu dans la phase aqueuse est ensuite précipité en présence d'éthanol absolu (250  $\mu$ l) et de sel (10  $\mu$ l LiCl 8M).

Les produits de PCR/RT-PCR sont vérifiés par séquençage (Génome Express).

Digestion par des enzymes de restriction : Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui coupent l'ADN double-brin au niveau de séquences nucléotidiques palindromiques spécifiques. Environ 1 µg d'ADN est digéré par 3 unités d'enzyme dans un volume final de 30 µl contenant 3 µl de tampon 10X fourni par le fabricant. La réaction se fait pendant 1 h 30 à la température préconisée par le fournisseur (37°C pour la plupart des enzymes). Si le vecteur est digéré par une enzyme de

restriction unique, il doit être déphosphorylé afin d'éviter sa recircularisation. Pour cela, 1  $\mu$ l de phosphatase alcaline (CIAP, Promega) est rajouté en fin de digestion. La déphosphorylation se fait pendant 20 min à 37°C, puis l'enzyme est inactivée par une incubation de 10 min à 65°C.

**Purification de fragments d'ADN à partir de gel d'agarose** : Les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose 1%. La bande d'agarose contenant le fragment d'ADN d'intérêt est ensuite découpée et l'ADN purifié avec le kit "GeneClean II" de Q.BIOgene dont le principe repose sur la capacité de l'ADN à fixer des billes de silice.

**Ligation** : Classiquement 0,01 pmole de vecteur et 0,03 pmole d'insert sont utilisées soit un rapport insert/vecteur de 3. La ligation est réalisée dans un volume final de 25  $\mu$ l contenant la T4 DNA ligase en présence de 2,5  $\mu$ l de tampon 10X (10 mM ATP, 300 mM Tris-HCl pH 7,8, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT) à 14°C, pendant la nuit. Un contrôle sans insert est fait en parallèle afin d'estimer le pourcentage de religation du vecteur sur lui-même.

Transformation par choc thermique : Les bactéries sont transformées avec le produit de ligation. Cette étape permet l'amplification et le clonage de chaque construction. Environ 100 µl de bactéries XL1-Blue compétentes sont ajoutées à la solution de ligation. Les cellules sont laissées 20 min dans la glace avant d'être soumises à un choc thermique d'1 minute à 42°C. Après refroidissement, 1 ml de SOC (2 % Bacto<sup>™</sup> Tryptone, 0,5 % d'extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose) est ajouté. Les bactéries sont ensuite placées 1 h à 37°C sous agitation avant d'être étalées sur boîtes de Petri sur milieu solide LB contenant de l'ampicilline à 50 µg/ml. La boîte est mise dans un incubateur à 37°C toute une nuit.

Mini-préparation d'ADN plasmidique : Des colonies sont inoculées chacune dans 2 ml de LB + ampicilline (50  $\mu$ g/ml) et laissées une nuit en agitation à 37°C. L'ADN plasmidique est purifié grâce au kit « mini-prep » QIAGEN selon les instructions du fournisseur. Le principe de purification repose sur une lyse alcaline des bactéries. Le lysat est ensuite déposé sur une résine échangeuse d'anions qui retient sélectivement l'ADN. Après les lavages, l'ADN plasmidique est élué avec 50  $\mu$ l d'eau. L'ADN ainsi purifié est digéré enzymatiquement afin de vérifier les constructions obtenues.

Maxi-préparation d'ADN plasmidique : De grandes quantités d'ADN plasmidique sont préparées en utilisant le kit « maxi-prep » QIAGEN suivant les indications du fabricant. Les bactéries sont cultivées dans un grand volume ce qui permet d'obtenir suffisamment d'ADN (100 à 500 µg) pour transfecter les cellules de *D. discoideum*.

#### 2. Southern-blot

**Préparation d'ADN génomique de** *D. discoideum* : Les cellules d'une boîte de culture (environ  $2x10^7$  cellules) sont lavées en tampon 12 mM NaK/Pi, puis reprises avec 100 µl d'eau et 100 µl de tampon de lyse 2X (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM EDTA pH 7,2, 6% SDS, 2% β mercaptoéthanol). La lyse cellulaire s'effectue dans un premier temps au micro-onde (15, 10 et 5 secondes à la puissance maximale) puis dans un second temps à 75°C pendant 10 min en rajoutant 200 µl de tampon de lyse 1X. L'ADN est ensuite extrait par ajout de 400 µl de 20 mM Tris pH 9,5 et 500 µl de phénolchloroforme. Après centrifugation 5 min/20 000g/4°C, l'ADN contenu dans le surnageant est extrait une seconde fois par 400 µl de phénol-chloroforme, puis précipité par 400 µl d'isopropanol et 20 µl d'acétate de sodium 3 M pH 4,7. Après 1 h à -20°C, l'ADN est remis en suspension dans 40 µl de TE (10 mM Tris-Hcl, pH 8, 1 mM EDTA pH 7,2) additionné de 0,5 µl d'ARNase.

Migration de l'ADNg sur gel d'agarose : L'ADN génomique est préalablement digéré par des enzymes de restriction permettant une analyse simple d'une région particulière du génome. Les produits de digestion sont séparés sur un gel d'agarose à 1% de 10 ou 20 cm de long selon la taille des fragments attendus en TAE 0,5X avec 0,005% (v/v) de bromure d'éthidium. La migration électrophorétique s'effectue pendant 2 à 3 h sous une tension constante de 100 volts à température ambiante. Le gel d'agarose est ensuite traité avec un milieu de dépurination (0,25 M HCl) pendant 20 min sous agitation à température ambiante, avant d'être incubé 30 min dans un milieu de dénaturation (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) puis encore 30 min dans un tampon de neutralisation (0,5 M NaCl).

**Transfert sur membrane** : L'ADN est transféré par capillarité du gel d'agarose sur une membrane de nylon chargée positivement (Roche) pendant la nuit en tampon SSC 20X (3 M NaCl, 300 mM de citrate de sodium pH 7). Le lendemain, l'ADN est fixé de façon covalente sur la membrane par rayonnement U.V.

Préparation de la sonde ADN marquée à la Digoxygénine : La synthèse de la sonde ADN double brin se fait par PCR en intégrant un analogue nucléotidique, le dUTP, couplé à la digoxygénine (DIG). Par rapport à la technique de PCR décrite précédemment, seule la composition en nucléotides change : 200  $\mu$ M de dATP, dCTP, dGTP et un rapport de dUTP-DIG : dTTP qui varie entre 1/2 et 1/6. Ce système permet de fabriquer des sondes stables et non radioactives. Le produit de PCR est purifié comme précédemment décrit puis dénaturé par une incubation de 10 min à 100°C avant d'être dilué (5 à 25 ng d'ADN/ml) dans du tampon d'hybridation (Dig Easy Hyb, Roche).

**Révélation de la membrane** : La membrane est préhybridée 2 heures à 42°C sous agitation dans 20 ml de tampon Dig Easy Hyb (Roche), puis hybridée à 42°C toute la nuit avec du tampon Dig Easy Hybrid

(Roche) contenant la sonde dénaturée marquée par dUTP-DIG. Le lendemain, la membrane est lavée 2 fois 5 min avec 10 ml de tampon SSC 2X, SDS 0,1% à température ambiante, puis 2 fois 15 min avec 10 ml de tampon SSC 0,5X, SDS 0,1% à 68°C. La membrane est ensuite rincée dans 150 ml de tampon de lavage (100 mM acide maléique, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,3% Tween20) pendant 2 min puis saturée dans 100 ml de solution de blocage (1 volume de solution de blocking à 10% (Roche) pour 9 volumes de tampon d'acide maléique (100 mM acide maléique, 150 mM NaCl, pH 7,5)) pendant 1 heure. L'anticorps anti-Digoxigénique conjugué à la phosphatase alcaline est ajouté à la solution de blocage au 1/20 000 pendant 30 min. La membrane est ensuite lavée 3 fois 15 min avec du tampon de lavage. La révélation des fragments hybridés avec la sonde se fait après 2 min d'incubation dans le tampon de détection (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5) suivie de 5 min d'incubation avec du CDP-Star (Roche) dilué au 1/100 dans du tampon de détection. La réaction de chimioluminescence est révélée avec des films photographiques.

#### 3. Northern-blot

**Préparation des ARN de** *D. discoideum* : Environ  $5 \times 10^7$  cellules sont lavées dans des tubes Eppendorf avec du tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,5 puis reprises avec 250 μl de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2% SDS) additionné de 10 μl de DEPC. La lyse cellulaire s'effectue par agitation des tubes pendant quelques secondes. Les acides nucléiques sont extraits trois fois par ajout de 900 μl de phénol-chloroforme suivi d'une centrifugation 5 min/20 000g /4°C. Dans les deux dernières extractions, l'acétate de sodium (3 M, pH 4,7) est ajouté à un volume de 1/10 du total. L'ARN contenu dans le surnageant est précipité par 2,5 fois son volume en éthanol absolu. Après 1 h à  $-20^{\circ}$ C, l'ARN est centrifugé 15 min à 20 000 g, puis repris avec 400 μl d'eau traitée au DEPC additionnée de 400 μl de 8 M LiCl. La précipitation se poursuit durant toute la nuit à  $-20^{\circ}$ C. Le lendemain, après une centrifugation de 15 min à 20 000 g à 4°C, le culot d'ARN est repris dans 400 μl d'eau traitée au DEPC puis à nouveau précipité 1 heure à  $-20^{\circ}$ C, avec l'ajout de 40 μl de 8M LiCl et de 1 ml d'éthanol absolu. Après une centrifugation de 15 min à 20 000 g à 4°C, le culot est lavé une fois avec de l'éthanol à 70% puis séché et repris dans de l'eau traitée au DEPC (le volume dépend de la taille du culot, entre 50 μl et 100 μl).

Migration des ARN sur gel d'agarose : Les ARN (environ 5  $\mu$ g) sont déposés dans un gel 1% agarose contenant 0,005% (v/v) de bromure d'éthidium, 2% formaldéhyde, 1x tampon de migration (20 mM MOPS pH 7, 5 mM d'acétate de sodium, 1 mM EDTA). La migration électrophorétique s'effectue dans du tampon de migration 1x et sous un voltage constant de 150 V, à température ambiante. Le gel est ensuite rincé 3 fois à l'eau traitée au DEPC puis équilibré 30 min dans du tampon SSC 20X (3 M NaCl, 300 mM de citrate de sodium pH 7, traité avec du DMPC)

**Transfert sur membrane :** L'ARN est transféré par capillarité du gel d'agarose sur une membrane de nylon (Roche) pendant la nuit en tampon SSC 20X. Le lendemain, l'ARN est fixé de façon covalente sur la membrane par rayonnement U.V. La synthèse de la sonde comme la révélation de la membrane sont faits suivant le même protocole que celui utilisé pour le Southern-blot.

# **III. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE**

#### 1. Expression de protéines recombinantes

**Test de solubilité** : L'induction à petite échelle permet de tester plusieurs clones bactériens afin de choisir celui qui exprime le mieux la protéine recombinante et permet surtout de vérifier si la protéine est soluble ou en corps d'inclusion.

Les clones bactériens contenant la construction à exprimer sont mis en culture la nuit à 37°C dans 2 ml de LB + ampicilline (50  $\mu$ g/ml). Le lendemain, la culture est diluée au 1/50 dans 2 ml de Terrific Broth (composition donnée dans le Tableau 8).

Composé	g/l
Glycérol	4
Extrait de levure	24
Bacto <sup>TM</sup> -tryptone	12

Tableau 8 : Composition du Terrific Broth. Ce milieu est autoclavé. Du tampon phosphate (composition donnée dans le tableau 9), lui aussi autoclavé, est ajouté au 1/10 (v/v) ainsi que de l'ampicilline (50 µg/ml).

Composé	mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	23,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,2

Tableau 9 : Composition du tampon phosphate.

La culture est mise à agiter à 37°C pendant 2 h (DO proche de 0,8). Pour induire l'expression, 1 mM d'Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) est rajouté. L'induction protéique a lieu pendant 3 h à 37°C, sous agitation. Il faut noter que la quantité d'IPTG, le temps et la température d'incubation peuvent être adaptés suivant la solubilité de la protéine.

La culture bactérienne est centrifugée 1 min à 6 800 g. Le culot est repris dans 300 µl de PBS contenant 1 mg/ml de lysozyme et 1 mM de PMSF puis l'ensemble est incubé 20 min dans la glace. 1% Triton X-100 est rajouté et le tout est incubé 10 min supplémentaires dans la glace. Le mélange est soniqué 2 fois 20 secondes (puissance 40 W) ce qui permet de lyser les bactéries. Une centrifugation de 10 min à 20 000g permet de séparer la fraction protéique soluble retrouvée dans le surnageant, des protéines insolubles qui sont dans le culot. Les fractions totales, solubles et membranaires sont

séparées dans un gel de polyacrylamide qui est ensuite coloré au bleu de Coomassie pour visualiser les bandes protéiques.

Purification de protéines de fusion GST solubles: Le clone bactérien qui exprime le mieux la protéine est mis en culture toute la nuit à 37°C dans 15 ml de LB additionné d'ampicilline (50 µg/ml). Le lendemain, la culture est diluée au 1/50 dans 500 ml final de Terrific Broth + tampon phosphate (1/10) + ampicilline (50 µg/ml). La culture est mise à agiter à 37°C pendant 2 h (DO proche de 0,8). Pour induire l'expression, 1 mM d'IPTG est rajouté. L'induction protéique a lieu pendant 3 h à 37°C, sous agitation. La culture est centrifugée 8 min à 6500 rpm (Beckman, JA14). Le culot est repris dans 5 ml de PBS additionné de 5 mM EDTA, tout en maintenant bien le culot au froid dans la glace. Le lysozyme est rajouté (5 mg/ml), l'ensemble est mélangé et laissé dans la glace pendant 20 minutes. 15 ml de tampon de lyse n°1 (PBS, 10 mM EDTA pH 8, 1 mM EGTA pH 8, 3 mM DTT, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptine, 1  $\mu$ g/ml pepstatine, 1  $\mu$ g/ml aprotinine) sont rajoutés, ainsi que 1% Triton X-100. Le mélange est soniqué 2 fois 20 secondes (puissance 20 W) puis centrifugé 30 min à 16 000 rpm (Beckman, JA20) pour éliminer les cellules non lysées, les membranes, l'ADN et les corps d'inclusion. Au surnageant, contenant la protéine recombinante soluble, sont rajoutés les billes de glutathion-Sepharose<sup>TM</sup>4B (Amersham Biosciences) dans la proportion de 1 volume de billes pour 25 volumes de surnageant de lyse des bactéries. Les billes de glutathion-Sepharose sont préalablement lavées 3 fois en tampon PBS puis une fois en tampon de lyse n°1 par centrifugation de 2 min à 1 000 rpm. Avec ces lavages à faible vitesse, les billes vont se compacter sans pour autant être écrasées et au final, le culot de billes est repris dans un volume équivalent avec du tampon de lyse n°1. Le mélange, surnageant de lyse des bactéries et billes, est mis à agiter 1 heure à 4°C. Les billes sont ensuite récupérées par centrifugation à 1 000 g pendant 2 min à 4°C puis lavées 2 fois avec 50 ml de tampon de lyse n°2 (PBS, 10 mM EDTA pH 8, 1 mM EGTA pH 8, 3 mM DTT, 1% Triton X-100) et 2 fois avec 50 ml de PBS additionné de 1 mM DTT. Avec un peu de surnageant restant du dernier lavage, les billes sont resuspendues et passées en tubes Eppendorf puis 1ml de glutathion (10 mM glutathion, 50 mM Tris pH 8) est rajouté. L'ensemble est mis à agiter 30 min sur la roue ce qui permet d'éluer les protéines fusionnées à la GST des billes de glutathion-Sepharose. Le mélange est ensuite centrifugé 15 min à 20 000 g et le surnageant contenant la protéine éluée des billes est récupéré et analysé dans un gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie pour estimer la quantité de protéine purifiée. Afin d'éliminer le glutathion seul, le surnageant est dialysé contre du PBS/1 mM DTT toute une nuit à 4°C.

**Purification de protéines de fusion Histidine solubles**: L'induction protéique se fait dans les mêmes conditions que précédemment. La culture est centrifugée 8 min à 6500 rpm (Beckman, JA14). Le culot est mis dans de la glace pendant 15 min puis il est repris dans 10 ml de tampon de lyse (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8). Le lysozyme est rajouté (1 mg/ml), l'ensemble est mélangé et laissé dans la glace pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite soniqué 2 fois 20 secondes (puissance 20 W) puis centrifugé 30 min à 16 000 rpm (Beckman, JA20) pour éliminer les cellules non lysées, les membranes, l'ADN et les corps d'inclusion. Au surnageant,

contenant la protéine recombinante soluble, est ajouté 1 ml de billes de Ni-NTA-Agarose (Qiagen) pour 4 ml de lysat cellulaire. Comme précédemment, les billes sont d'abord lavées plusieurs fois en tampon de lyse puis le culot est repris dans un volume équivalent de tampon de lyse. Le mélange, surnageant de lyse des bactéries et billes, est mis à agiter 1 heure à 4°C sur une roue. Les billes sont ensuite transférées dans une colonne Poly-prep (BIO-RAD). La colonne contenant les billes est lavée avec du tampon de lavage (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8) puis la protéine est éluée par ajout de 4 fois 0,5 ml de tampon d'élution (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8). La protéine éluée des billes est récupérée et analysée dans un gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie pour estimer la quantité de protéine purifiée. L'imidazole contenu dans les tampons de lyse et de lavage permet de diminuer les interactions non spécifiques de protéines sans étiquette histidine.

Purification des corps d'inclusion : Les cellules sont traitées de la même façon que pour la purification de protéines solubles jusqu'à l'étape de centrifugation de 30 min à 16 000 rpm (Beckman, JA20) qui permet de séparer les protéines solubles des corps d'inclusion et cellules non lysées. Le culot est resuspendu avec 25 ml de tampon de lavage (100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 8) additionné de 0,1% de désoxycholate puis centrifugé 10 min à 10 000 rpm (Beckman, JA20). Le culot est resuspendu dans 25 ml de tampon de lavage supplémenté avec 1% NP-40 puis centrifugé 10 min à 10 000 rpm (Beckman, JA20). Le culot est repris dans 25 ml tampon de lavage puis centrifugé 10 min à 10 000 rpm (Beckman, JA20). Le culot est repris dans 10 ml de 8 M urée, centrifugé 10 min à 10 000 rpm (Beckman, JA20). Le surnageant est gardé et dialysé contre 2 litres d'eau distillée. Les protéines sont dosées par le BCA (acide Bicinchoninique) puis lyophilisées. Le principe de cette méthode de dosage est que les protéines réduisent de façon dépendant de leur concentration, le Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>+</sup>. L'acide bicinchoninique est un réactif chromogène spécifique du Cu<sup>+</sup>, formant avec lui un complexe de couleur violette dont l'absorbance maximale se situe à 562 nm. Une gamme étalon est réalisée avec de la BSA (1 mg/ml) entre 0 et 25  $\mu$ g. Les points de la gamme, ainsi que les échantillons sont mis dans une cuve de spectrophotomètre en présence de 40 µl de sulfate de cuivre, 5 H<sub>2</sub>O 4% (p/v) et 2 ml de BCA. Après 30 min d'incubation à 60°C, l'absorbance est lue à 562 nm contre un blanc sans protéine.

# 2. Pull-Down

Pour tester l'interaction entre AlixPP et le domaine FH2 de la Formine 1, les deux protéines sont exprimées sous la forme de protéine fusion avec une étiquette GST et purifiées comme indiqué précédemment. Un contrôle GST seul est aussi fait. Les protéines GST, et GST-AlixPP sont laissées fixées aux billes de glutathion Sepharose. La protéine GST-For1FH2 est débarassée de son étiquette GST par digestion à la thrombine qui possède un site de coupure entre le domaine GST et la protéine d'intêret. Pour cela, les billes sont lavées en tampon 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8 et remises en

suspension dans ce même tampon contenant 20 unités de thrombine. Après une nuit à 4°C ou 1 h 30 à  $25^{\circ}$ C, l'échantillon total et le surnageant sont analysés sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Après estimation de la quantité de chacune des protéines purifiées, une quantité équivalente de billes seules ou de billes couplées à la GST ou GST-AlixPP est prélévée et resuspendue dans un tampon 10 mM Hepes, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, ou 2 mM EDTA ainsi que 1 µg/ml leupeptine, 1 µg/ml pepstatine, 1 µg/ml aprotinine. Un excès de protéine For1FH2 (environ 5 fois plus que les protéines GST et GST-AlixPP) débarrassée de son étiquette est ajouté et l'ensemble est mis 1 h sur une roue à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec le même tampon qui a servi pour l'interaction puis reprises dans un volume équivalent en tampon de Laemmli. Si l'interaction a eu lieu, le domaine For1FH2 doit être présent dans l'échantillon après les lavages. Ceci est vérifié par Western-blot.

#### 3. Purification des anticorps

Vérification de l'association de la protéine fusion aux billes : La protéine soluble de fusion GST est exprimée et purifiée selon le protocole indiqué plus haut jusqu'à l'étape de lavage en tampon de lyse n°2. Après ces lavages, un peu de billes sont récupérées et analysées dans un gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie afin de vérifier que la protéine est bien associée aux billes de glutathion-Sepharose.

**Couplage de la protéine fusion GST aux billes**: Les billes sont lavées deux fois avec 10 volumes de 0,2 M de borate de sodium pH 9 afin d'amener le pH de l'ensemble à 9.

Le couplage de la protéine sur les billes se fait par une incubation de 30 min à température ambiante des billes dans du tampon 0,2 M de borate de sodium pH 9 additionné de 20 mM de dimethylpimelimidate qui réticule les groupement  $NH_2$ . La réaction est arrêtée par un lavage suivi d'une incubation d'une heure des billes dans une solution de 0,2 M éthanolamine qui apporte un excès de groupement  $NH_2$  afin de saturer le dimethylpimelimidate restant. Les billes sont ensuite lavées trois fois avec du tampon PBS puis stockées à 4°C.

**Purification des anticorps sur colonne d'affinité**: Les billes sont transférées dans une colonne de chromatographie Poly-prep (BIO-RAD). La colonne contenant les billes est lavée avec 10 volumes de 10 mM Tris pH 7,5, puis 10 volumes de 100 mM glycine pH 2,5, puis 10 volumes de 10 mM Tris pH 8,8 puis 10 volumes de 100 mM triethylamine pH 11,5 et enfin avec du 10 mM Tris pH 7,5 jusqu'à ce que le pH revienne à 7,5. Le sérum est dilué au 1/10 dans du 10 mM Tris pH 7,5 et centrifugé 5 min à 1400 g afin d'éliminer les impuretés. Le surnageant est ensuite passé sur la colonne et les anticorps spécifiques de la protéine fusion vont se fixer sur celle-ci et être retenus. Le filtrat est repassé deux fois sur la colonne. Une alternative est de mettre le surnageant dans la colonne fermée et de mettre l'ensemble à incuber sur la roue pendant 2 h. La colonne est ensuite lavée avec 20 volumes de 10 mM

Tris pH 7,5, puis 20 volumes de 500 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5. L'élution des anticorps se fait en condition acide avec 10 volumes de 100 mM glycine pH 2,5 et en condition basique avec 10 volumes de 100 mM triethylamine pH 11,5. Aux éluats est rajouté un volume de 1 M Tris pH 8 afin de neutraliser le milieu. Entre les deux élutions, la colonne est lavée avec du 10 mM Tris pH 8,8 jusqu'à ce que le pH soit ramené à 8,8. Après les élutions, la colonne est lavée avec du 10 mM Tris pH 7,5 jusqu'à ce que le pH soit à 7,5. La colonne peut être conservée à 4°C avec 10 ml de 10 mM Tris pH 7,5 additionnés de 0,02% d'azoture de sodium.

#### 4. Analyse des protéines par immunodétection

**Electrophorèse des protéines en gel d'acrylamide** : La migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Laemmli, 1970) permet la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire qui est déterminée par comparaison avec des protéines standards de masse moléculaire connue. Le système est composé d'un gel de concentration contenant 5% d'acrylamide et d'un gel de séparation de 6% à 15% d'acrylamide selon les besoins. Les échantillons protéiques sont solubilisés dans le tampon de dépolymérisation (tampon de Laemmli) puis chauffés à 96°C pendant trois min de façon à dénaturer les protéines. La migration est réalisée sous un voltage constant de 200 V (appareil BIORAD) dans un tampon de migration comprenant: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS à un pH de 8,5.

**Electrotransfert et immunodétection des protéines** : Les protéines séparées par électrophorèse sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Immobilon, Millipore) en présence de tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, 20% éthanol) pendant 1 h à 4°C et sous une tension de 100 V (appareil BIORAD). Pour saturer les sites non spécifiques, la membrane est mise en incubation 1 h en solution de blocage: TBS (<u>T</u>ris <u>B</u>uffer <u>S</u>aline: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl)/ 0,05% Tween 20 (p/v)/ 5% lait écrémé (p/v). La protéine d'intérêt est détectée grâce à un anticorps spécifique (cf Tableau 10 pour les dilutions). Après 3 lavages en tampon TBS/ 0,05% Tween 20 (p/v), l'anticorps secondaire (chèvre anti-IgG de lapin soit anti-IgG de souris, couplé à la peroxydase, BIORAD) dilué au 1/3000 dans 10 ml de TBS/ 0,05% Tween 20 (p/v)/ 5% lait écrémé (p/v) est ajouté et laissé pendant 45 min. La membrane est ensuite lavée 3 fois comme précédemment puis la détection est faite par chimioluminescence avec le système ECL (Amersham Biochem).

Anticorps	Dilutions	Origine
Anti-alix	serum non purifié au 1/1000	Ce travail
Anti-vps32	serum non purifié au 1/1000	Ce travail
Anti-vps4	serum non purifié au 1/000	Ce travail
Anti-tsg	Sérum purifié au 1/000	Ce travail
Anti-myc	1/000	(9E10) Roche
Anti-For1	1/500	Ce travail
Anti-lexA	1/100	Santa-Cruz
Anti-Vamp7	1/500	Bogdanovic et al. 2002
Anti-Ub (P4D1)	1/100	Santa Cruz

Tableau 10 : Dilutions des différents anticorps pour l'immunodétection.

#### 5. Fractionnement

#### a) Fractionnement subcellulaire sur gradient de Percoll

Les gradients de Percoll autoformants permettent de séparer les différents compartiments endocytaires de *Dictyostelium*. Le positionnement des endosomes, lysosomes et de la membrane plasmique sur le gradient se fait par dosage d'activités enzymatiques spécifiques et par le suivi d'un marqueur de phase fluide. La phosphatase acide est majoritairement présente dans les endosomes et les lysosomes /post-lysosomes alors que la phosphatase alcaline est un marqueur de la membrane plasmique et de la vacuole contractile. Le fluorescéine-isothiocyanate dextran (FITC-dextran) est une sonde fluorescente non dégradée par la cellule qui sert de marqueur de phase fluide (Klein and Satre, 1986).

Le gradient Mes-Percoll : Les cellules (1, 5.10<sup>9</sup> cellules par gradient) sont incubées en présence de FITC-dextran à 1 mg/ml pendant 2 h. Les cellules sont récupérées par centrifugation et lavées deux fois avec du tampon phosphate afin d'éliminer le marqueur fluorescent. Le culot est repris dans 2,5 ml de 20 mM Mes-Na, pH 6,5, 1 mM EDTA, 0,25 M saccharose (MESES). Les cellules sont cassées par 10 passages dans un casseur de cellules fabriqué à l'EMBL (Heidelberg) qui maintient l'intégrité des organites intracellulaires. Le broyat cellulaire est ensuite centrifugé 5 min à 1 000 rpm (centrifugeuse Beckman GPKR) afin d'éliminer les cellules non cassées. Le surnageant récupéré est ajusté à 4 ml avec du MESES si besoin, puis déposé sur 21 ml d'une solution de Percoll à 24% (cf composition dans le Tableau 11) :

Réactifs	Volume (ml)
Percoll stérile	5,54
Saccharose 0,5 M	11,55
Mes 0,4 M	1,15
EDTA 0,2 M	0,115
eau	4,73

Tableau 11 : Composition d'une solution de Percoll à 24%.

Le gradient est obtenu par centrifugation d'une heure à 18 000 rpm en rotor TFT70 (ultracentrifugeuse Beckman L7-80). Il s'agit d'un gradient autoformant dont les caractéristiques dépendent de la vitesse, de la durée de rotation et de l'angle du rotor par rapport à la verticale. Le gradient est ensuite élué par fractions de 1,5 ml ou 0,5 ml suivant la précision recherchée.

Les échantillons protéiques : 200  $\mu$ l de chaque fraction sont prélevés et additionnés de 200  $\mu$ l de tampon de Laemmli 2x puis chauffés à 96°C pendant 3 min. Les échantillons protéiques sont ensuite centrifugés 10 min à 20 000 g afin d'éliminer le Percoll en culot pour qu'il ne gêne pas la migration des protéines. 10  $\mu$ l de surnageant de chaque échantillon sont déposés dans le gel de polyacrylamide et analysés par Western-blot.

**Dosages des activités des phophatases acide et alcaline** : La technique repose sur un dosage colorimétrique utilisant comme substrat le p-nitrophénylphosphate (Wiener and Ashworth, 1970). Ce composé incolore peut être hydrolysé par les deux types de phosphatases pour donner du phosphate inorganique (Pi) et du p-nitrophénol de couleur jaune en milieu basique.

Les échantillons (40 µl de chaque fraction) sont mis dans un milieu réactionnel d'un volume final de 500 µl contenant 6 mM de p-nitrophénylphosphate et 0,15 M de tampon glycine. Le pH du tampon glycine est modifié selon l'activité enzymatique à doser : 8,5 pour la phosphatase alcaline (glycine-NaOH) et 3,0 pour la phosphatase acide (glycine-HCl). Les échantillons sont mis à incuber à température ambiante pendant environ 20 min pour la phosphatase acide et à 37°C pendant 45 min pour la phosphatase alcaline. Afin d'arrêter la réaction enzymatique et d'assurer l'alcalinisation nécessaire à la révélation de la couleur, 2 ml de 0,1 M NaOH sont ajoutés à la réaction. L'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à la longueur d'onde de 400 nm.

A pH alcalin, le coefficient d'absorption molaire du p-nitrophénol est de 18,8.10<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup> à 400 nm.

Mesure de la fluorescence du marqueur de phase fluide : Les échantillons (70  $\mu$ l de chaque fraction) sont vortexés afin de bien les homogénéiser avant d'en préléver 25  $\mu$ l pour compter les cellules, puis lysés par l'ajout de 2 ml de tampon de lyse (100 mM NaPi, 0,25% Triton X-100, pH 10,5). La fluorescence du lysat est mesurée avec un fluorimètre (Hitachi F-200) avec pour longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{ex}$ =470nm et d'émission  $\lambda_{em}$ =520nm.

#### b) Fractionnement subcellulaire par centrifugations differentielles

Environ  $2.10^7$  cellules sont centrifugées 5 min à 1 400 g. Le culot est repris dans 400 µl de tampon de lyse (20 mM Hepes, 110 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 µg/ml leupeptine, 1 µg/ml pepstatine, 1

µg/ml aprotinine) additionné de 0,3 g de billes de verre de 0,17 mm de diamètre. L'ensemble est vortexé 1 minute puis 300 µl de tampon de lyse sont ajoutés. Une centrifugation de 5 min à 1 000 g permet d'éliminer les noyaux ainsi que les cellules non cassées. Ce surnageant post-nucléaire représente un extrait total. Une centrifugation à haute vitesse (100 000 g, 30 min à 4°C) de ce surnageant post-nucléaire permet de séparer les extraits solubles et membranaires. Un fractionnement plus fin peut être réalisé avec une première centrifugation à 13 000 g pendant 30 min. Ce culot contient les membranes lourdes comme les mitochondries, le réticulum endoplasmique, les endosomes et les lysosomes. Si la fraction soluble est soumise à une nouvelle centrifugation de 100 000 g, les membranes plus légères comme les petites vésicules de transport ou l'appareil de Golgi se retrouvent dans le culot. Du Triton X-100 peut être rajouté dans le tampon de lyse lors de la resuspension du culot avant de procéder à une nouvelle centrifugation pour vérifier si la fraction membranaire testée est soluble ou non en Triton X-100. Une insolubilité dans ce détergent peut signifier une association de la protéine d'intérêt à des domaines lipidiques particuliers comme les radeaux lipidiques par exemple. Ceci peut être testé en soumettant cette fraction insoluble à un gradient de flottaison. La fraction insoluble en Triton X-100 est remise en suspension avec 1 ml de tampon MESES contenant 60% de saccharose puis est recouverte par 1 ml de tampon MESES-55% saccharose et 1 ml de tampon MESES-35% saccharose. L'ensemble est centrifugé 18 h à 55 000 rpm (rotor SW65). Ce gradient est élué par des fractions de 850 µl et la présence de la protéine d'intérêt est révélée par Western-blot. Si celle-ci est retrouvée dans les fractions hautes du gradient, c'est qu'elle est associée à des radeaux lipidiques qui ont permis la « remontée » de gradient.

# 6. Immunoprécipitation

Environ 2.10<sup>7</sup> cellules sont centrifugées 5 min à 1 400 g. Les cellules sont lysées à 4°C (10 min pour des cellules au stade végétatif, au moins 30 min pour des cellules développées) dans 1 ml de tampon de lyse NP-40 (PBS, 1% NP40, 2 mM EDTA,1  $\mu$ g/ml leupeptine, 1  $\mu$ g/ml pepstatine, 1  $\mu$ g/ml aprotinine). Les cellules sont ensuite centrifugées 10 min à 20 000 g à 4°C. Le surnageant représente l'extrait total. L'anticorps est rajouté au surnageant à la dilution adequate (cf tableau 12) ainsi que 50  $\mu$ l de protéine A-agarose si l'anticorps est issu d'un lapin ou 50  $\mu$ l de protéine G-agarose si l'anticorps est un anti-souris. Les protéines A/G-agarose sont préalablement lavées 3 fois avec le tampon de lyse NP-40. Ce mélange est mis à agiter 1 h à 4°C sur une roue. Les billes d'agarose sont ensuite lavées 4 fois avec 500  $\mu$ l de tampon de lyse NP-40 puis resuspendues dans 25  $\mu$ l de tampon Laemmli 2x. Les échantillons sont chauffés 3 min à 96°C puis centrifugés quelques secondes à 20 000 g ce qui permet d'éliminer les billes d'agarose en culot. 10  $\mu$ l de surnageant sont utilisés pour être analysés par Western-blot.

Anticorps	Dilutions
Anti-alix	2,5 μl de serum non purifié
Anti-vps32	5 μl de serum non purifié
Anti-formine 1	5 μl de serum non purifié
Anti-myc	5 μg

Tableau 12 : Quantité d'anticorps utilisée pour les immunoprécipitations.

Lorsque les immunoprécipitations sont suivies d'une analyse protéomique,  $2.10^9$  cellules sont utilisées.

# 7. Inhibition du protéasome

 $1.10^8$  cellules par condition testée sont prélevées et centrifugées 5 min à 1 400 g. Les cellules sont remises en suspension dans 20 ml de milieu axénique ou de différenciation (5.10<sup>6</sup> cellules/ml) et 200 µl d'inhibiteur du protéasome à 10 mM dans du DMSO (MG132, SIGMA) ou 200 µl de DMSO sont ajoutés. 1 ml de suspension cellulaire est immédiatement prélevé et centrifugé 5 min à 1 400 g. Le culot est repris dans un volume équivalent avec du tampon de Laemmli. Cet extrait protéique représente l'extrait total au temps 0. 4 autres ml sont prélévés et centrifugés 5 min à 1 400 g. Le culot est repris dans 1 ml de tampon de lyse NP-40 et l'immunoprécipitation est réalisée selon le protocole indiqué précédemment. Le profil d'ubiquitination et de dégradation des protéines est suivi toutes les 4 h en répétant ce même protocole.

## 8. Biotinylation

Avant la biotinylation, les cellules végétatives sont lavées et remises en suspension en tampon Na/K phosphate et de l'AMPc est ajouté par pulse. La phase d'agrégation est mimée par des pulses de 30 nM d'AMPc toutes les 6 min pendant 4 h. Les cellules sont ensuite stimulées par addition de 300  $\mu$ M d'AMPc toutes les deux heures pour induire la différenciation sans morphogenèse. Pour chaque temps, 10<sup>7</sup> cellules sont prélevées, lavées une fois en tampon 17 mM Na/K phosphate pH 8 additionné de 120 mM sorbitol puis resuspendues dans 2 ml de ce même tampon contenant ou non 1 mg/ml d'un analogue de la biotine (sulfo-NHS-LC-biotin). Les cellules sont ensuite incubées pendant 15 min dans de la glace en les mélangeant occasionnellement. La réaction de biotinylation est stoppée avec des lavages en utilisant un tampon 100 mM glycine pH 8. Les cellules sont ensuite lysées avec du tampon de Laemmli et le profil de biotinylation est analysé par Western-blot en utilisant de la streptavidine-HRP (0,5 µg/ml) pour détecter la biotine.

# **IV. LE SYSTEME DOUBLE-HYBRIDE**

# 1. Principe

Le système double-hybride est une méthode permettant d'étudier des interactions protéine-protéine *in vivo*, dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Fields and Song, 1989). Il repose sur le fait que l'activité de nombreux facteurs de transcription eucaryotes nécessite la présence de deux domaines : un domaine servant à la fixation sur l'ADN et un domaine responsable de l'activité transcriptionelle. Lorsque ces domaines sont éloignés l'un de l'autre, ils ne sont plus capables d'induire une activité transcriptionelle. Dans le système double-hybride, le domaine de fixation sur l'ADN est fusionné à une protéine X et le domaine d'activation à une protéine Y. Si X et Y interagissent, les deux domaines vont se retrouver suffisamment proches l'un de l'autre pour que l'activité transcriptionelle soit restaurée. La restauration de cette activité est révélée par l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de la séquence reconnue par le domaine de liaison à l'ADN.

Cette méthode est utilisée pour mettre en évidence l'interaction entre deux protéines, mais également pour rechercher de nouveaux partenaires d'une protéine donnée.

# 2. Description du système utilisé

Le domaine de liaison à l'ADN est fourni par le répresseur LexA de *E. coli*, qui fonctionne normalement comme un répresseur des gènes SOS lorsqu'il est lié aux opérateurs LexA (Ebina et al., 1983). Cependant, avec les promoteurs utilisés dans ce système, la protéine LexA n'agit plus comme répresseur. Le domaine d'activation est un peptide (B42) composé de 88 résidus acides qui active la transcription dans la levure (Ma and Ptashne, 1987). Les vecteurs de clonage utilisés permettent de fusionner ces domaines avec l'ADNc de la protéine d'intérêt ou avec une banque d'ADNc. Le système LexA utilise deux gènes rapporteurs différents : *Leu2* et *LacZ* placés sous le contrôle de multiples opérateurs LexA (6 pour *Leu2* et 8 pour *LacZ*). L'interaction entre deux protéines sera donc révélée par une activité β-galactosidase et une sélection directe sur milieu de culture sans leucine.

#### 3. Les vecteurs

La souche de levure utilisée est EGY48 qui est his<sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>, trp<sup>-</sup> et ura<sup>-</sup>. Elle contient dans son génome le gène *leu2* en aval des séquences opératrices LexA. Il n'est donc transcrit que lorsqu'il y a interaction entre les deux proteines. Le gène rapporteur *lacZ* est cloné dans le vecteur p80p de façon a

être fusionné aux séquences opératrices LexA. Il s'agit d'un vecteur réplicatif, à grand nombre de copies. La sélection de la présence de ce vecteur se fait grâce au gène *ura3* qui complémente le phénotype *ura*<sup>-</sup> de la levure.

Les différents domaines d'Alix ont été clonés dans le vecteur pLexA qui permet leur expression en fusion avec le site de fixation sur l'ADN. La protéine fusion qui en résulte est exprimée à un fort taux grâce au promoteur fort, constitutif *ADH1*. La sélection de la présence du vecteur pLexA dans la levure se fait grâce au gène *his3* qui complémente le phénotype *his*<sup>-</sup> de la souche de levure utilisée.

La banque d'ADNc testée correspond à des messagers présents entre 8 h et 16 h de développement. Ces ADNc ont été clonés dans le vecteur pB42AD et sont ainsi en fusion avec le domaine d'activation. L'expression des protéines fusion est induite à un fort niveau, en présence de galactose, grâce au promoteur inductible *GAL1*. La présence du vecteur vecteur pB42AD se fait grâce au gène trp1 qui complémente le phénotype  $trp^{-}$  de la levure.

Le vecteur pLexA est équivalent au vecteur pEG202 et le vecteur pB42AD est équivalent au vecteur pJG4-5 qui ont été publiés par Gyuris en 1993.

# 4. Les milieux de culture

Le milieu complet YPD (composition donnée dans le Tableau 13) permet la culture des levures sans pression de sélection.

Composé	g/l
Peptone	20
Extrait de levure	10
Glucose	20
Bacto™ agar	20

Tableau 13 : Composition du YPD.

Le milieu de sélection des plasmides (composition donnée dans le Tableau 15) est un milieu comportant un mélange de nutriments formé essentiellement d'acides aminés. Le mélange DO-AA qui intervient dans ce milieu de sélection correspond à un mélange d'acides aminés appelé DO (composition donnée dans le Tableau 14) moins le ou les acides aminés (AA) correspondant à la sélection requise.

Acide aminé	g
Adénine	2
Histidine	7
Leucine	3
Lysine	3
Tryptophane	2
Tyrosine	3
Uracile	2

Tableau 14 : Composition du mélange DO.

Composé	g/l
Nitrogen base sans acides aminés	6,7
Bacto™ agar	20
Glucose	20
DO-UH	0,4
DO-UHT	0,35
DO-UHTL	0,25

Tableau 15 : Composition des milieux de sélection des plasmides.

Pour induire l'expression des protéines fusionnées au domaine d'activation (vecteur pB42AD), le glucose est remplacé par du galactose 20% (100 ml/l).

Pour tester l'interaction entre deux protéines, les clones peuvent être repiqués soit sur des boîtes de Galactose-UHTL, soit de Galactose-UHT Xgal. Dans ce cas, il faut rajouter 100 ml/l de 10x BU (260 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 220 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7), et 4 ml de X-Gal (20 mg/ml) par litre de milieu.

# 5. Les grandes étapes du criblage

Transformation des levures EGY48 avec le vecteur p80p apportant le gène rapporteur lacZ


Test de l'expression de plusieurs colonies pour choisir celle qui exprime le mieux l'appât

Transformation de la colonie choisie avec la vecteur pB42AD seul, pour s'assurer que le vecteur seul ne transactive pas.

Sélection sur milieu galactose-UHT

Repiquage des clones sur Gal-UHTL, Gal-UHT Xgal, et Glu-UHT

Si pas de transactivation de l'appât avec le vecteur seul, transformation de la colonie choisie avec le vecteur pB42AD-banqueADNc

Sélection sur milieu galactose-UHTL

Repiquage des clones sur Gal-UHTL, Gal-UHT Xgal, et Glu-UHT

Les clones positifs sur Gal-UHTL et Xgal sont étalés de nouveau sur Glu-UHT

A partir d'une colonie isolée sur Glu-UHT, nouveau test sur Gal-UHTL et Xgal

Repiquage des clones positifs du deuxième passage sur Gal-UHTL et Xgal, sur Glu-T afin de perdre les plasmides p80p-lacZ et pLexA-appât (plusieurs passages sur Glu-T sont nécessaires)

Miniprep des levures afin d'isoler les plasmides pB42AD-ADNc

Transformation des plasmides pB42AD-ADNc dans des bactéries XL1-blue par choc thermique

Miniprep des bactéries et séquençage des ADNc sous clonés dans pB42AD

Contrôle de la spécificité par transformation des ADNc positifs dans des levures contenant le vecteur pLexA seul sans appât pour s'assurer là aussi que le vecteur seul ne peut pas interagir avec les ADNc et donner de faux positifs.

### 6. Protocoles des différentes étapes

**Transformation de levures avec une construction** : Une colonie est inoculée dans 10 ml de milieu approprié et laissée toute la nuit, sous agitation, à 30°C. Le lendemain, la culture de la nuit est diluée au 1/5 dans 50 ml de YPD et laissée sous agitation jusqu'à une  $D.O_{600}=0.6-0.8$ . Les cellules sont ensuite centrifugées 5 min à 1 500 g à 4°C et le culot est repris dans 10 ml de LITE (100 mM d'acétate de lithium, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 7,5). Les cellules sont à nouveau centrifugées 5 min à 1 500 g à 4°C, le culot est repris dans 1 ml de LISORB (1 M sorbitol, 100 mM d'acétate de lithium, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 7,5) puis transféré dans des tubes Eppendorf. Les cellules sont mises à incuber à 30°C, sous agitation, pendant 15 à 30 min puis centrifugées 3 min à

5 000 rpm. Le culot est resuspendu dans 125  $\mu$ l de LISORB puis 200  $\mu$ g d'ADN carrier (solution d'ADN de sperme de saumon à 10 mg/ml, Gibco) et 1  $\mu$ g d'ADN plasmidique sont ajoutés. L'ensemble est laissé 10 min à 30°C sans agitation puis 900  $\mu$ l de LIPEG (40% PEG4000, 100 mM d'acétate de lithium, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 7,5) et 100  $\mu$ l de DMSO sont ajoutés. Un choc thermique de 12 min est réalisé à 42°C suivie d'une centrifugation de 3 min à 5000 rpm. Les cellules sont ensuite reprises dans 100  $\mu$ l d'eau et étalées sur des boîtes sélectives, mises à incuber 3 jours à 30°C.

Test de l'expression des vecteurs dans les levures : Une colonie est inoculée dans 5 ml de milieu sélectif approprié et laissée toute la nuit, sous agitation, à 30°C. Le lendemain, la culture est diluée au 1/5 dans 10 ml de milieu sélectif et laissée sous agitation jusqu'à une  $D.O_{600}=0.8-1.5$  ml de culture sont centrifugés à 1 500 g pendant 5 min puis le culot est repris dans 500 µl de PBS et transféré en tubes Eppendorf. Les cellules sont centrifugées 3 min à 5000 rpm et le culot est repris dans du tampon d'extraction ((5% SDS, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, 20% glycérol, 120 mM Tris pH 6,8), (le volume dépend de la D.O : il faut 312 µl de tampon pour 5 ml de culture à une D.O=0.8 donc le volume de tampon d'extraction=D.Ox 312/0.8)). L'ensemble est vortexé, bouilli 4 min puis soniqué 20 secondes. Après l'ajout du tampon de Laemmli, les échantillons protéiques sont analysés par Western-blot.

Transformation de levures avec une banque : Une colonie est inoculée dans 5 ml de milieu sélectif (Glu-UH) et laissée toute la nuit, sous agitation, à 30°C. Le lendemain, la culture est diluée dans 100 ml de Glu-UH et laissée sous agitation à 30°C jusqu'au lendemain matin. Les cellules sont alors centrifugées 5 min à 1 500 g puis le culot est repris avec 600 ml de YPD. Les cellules sont laissées sous agitation jusqu'à une D.O<sub>600</sub>=0.6-0.8 puis sont centrifugées 5 min à 1 500 g à 4°C et le culot est repris dans 20 ml de LISORB. Les cellules sont incubées à 30°C pendant 10 min sous agitation puis centrifugées 5 min à 1 500 g à 4°C. Le culot est repris avec 2.5 ml de LISORB et 5 mg d'ADN carrier et 50  $\mu$ g d'ADN plasmidique de la banque sont ajoutés. Laisser 10 min à 30°C sans

agitation et ajouter 22.5 ml de LIPEG et 2.5 ml de DMSO. Procéder au choc thermique de 12 min à 42°C et ajouter 300 ml de milieu Glu-UHT. Mettre les levures à pousser 4 h à 30°C, sous agitation. Les cellules sont centrifugées 10 min à 1 500 g à 4°C et le culot est repris dans 4 ml de Gal-UHTL. Pour estimer l'efficacité de transformation, 50  $\mu$ l d'une dilution au 1/10, au 1/100 et au 1/1000 sont étalés sur des boîtes de Glu-UHT. Le reste des cellules est étalé sur des boîtes de Gal-UHTL (200  $\mu$ l/boîte de 14 cm de diamètre) puis incubé à 30°C pendant 5 jours. Les clones qui ont poussé sont repiqués sur des boîtes de Gal-UHT-Xgal, Gal-UHTL, Glu-UHT. Ce repiquage est fait deux fois pour s'assurer d'être clonal. Les clones sont ensuite sélectionnés sur des boîtes de Glu-T pour ne garder que le plasmide pB42AD-ADNc.

Minipréparation de plasmides à partir de levures : Le matin, une colonie est inoculée dans 5 ml de milieu sélectif (Glu-T). Le lendemain après-midi, centrifuger 5 min à 1 500 g. Le culot est repris avec 200 µl de tampon de lyse (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 2% Triton X-100, 1% SDS) puis transféré en tube Eppendorf, homogénéisé, et congelé. 150 µl de billes de verre sont ajoutés et l'ensemble est vortexé 5 min à température ambiante. L'ADN est précipité en ajoutant 200 µl de phénol et centrifugé 3 min à 20 000 g. Le surnageant est gardé et 1/10 d'acétate de sodium 3 M, pH 5 (soit 20 µl) est ajouté. 2 volumes d'éthanol pur pour 1 volume de surnageant (soit 440 µl) sont ajoutés. L'ensemble est laissé 10 min à température ambiante puis centrifugé 5 min à 20 000 g. Le culot est lavé à l'éthanol 70%, séché sous la hotte puis resuspendu dans 20 µl d'eau ultra pure. 10 µl de cette minipréparation sont utilisés pour la transformation des bactéries.

Minipréparation de plasmides à partir de bactéries : Le soir, une colonie est inoculée dans 2 ml de LB+ ampicilline (6 colonies /clone levure). Le lendemain matin, la culture est centrifugée 1 minute à 20 000 g. Le culot est repris avec 400  $\mu$ l de STET (8% Saccharose, 0,5% Triton X-100, 50 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris pH 8) et 50  $\mu$ l de lysozyme (10 mg/ml) sont ajoutés. L'ensemble est mélangé et mis à chauffer à 94°C durant 90 sec-2 min puis centrifugé 10 min à 20 000 g. Le culot est enlevé avec un cure-dent et 0.5  $\mu$ l d'ARNase sont ajoutés. L'ensemble est incubé 10 min à 37°C puis 400  $\mu$ l de phénol sont ajoutés. L'ensemble est congelé à -20°C pendant 30 min. Une centrifugation de 10 min à 20 000 g est réalisée puis le surnageant est enlevé à la pipette. Le culot est lavé avec 250  $\mu$ l d'éthanol 70% et est recentrifugé 5 min à 20 000 g. Après avoir enlevé tout l'éthanol, le culot est resuspendu avec 40  $\mu$ l d'eau. La présence du vecteur pB42AD + insert est vérifiée par digestion de 5  $\mu$ l de minipréparation d'ADN. Le reste de bactérie qui a servi à la minipréparation d'ADN est étalé sur une boîte d'ampicilline. L'ADN est envoyé à séquencer.

# RESULTATS

# Chapitre I

Caractérisation de la protéine Alix chez *Dictyostelium* 

## I. LA PROTEINE ALIX DE DICTYOSTELIUM

### 1. Description du gène et de la protéine

Le génome de *Dictyostelium* contient un homologue unique du gène *alx*. Grâce à l'algorithme BLAST 2.0 appliqué à la banque d'ADN génomique de *D. discoideum*, nous avons pu obtenir une séquence génomique qui a été complétée par PCR et RACE et déposée dans GenBank sous le numéro d'accession AF360741 (L. Aubry, G. Klein et M. Satre en 2001).

Le gène *Dd-alx* est situé sur le chromosome 2 (Glockner et al., 2002). Il présente 3 introns de 95, 109 et 205 nucléotides en position 247, 783 et 1365 de l'ADN génomique (voir Annexe). Ces introns, de petite taille, sont très riches en bases A et T (près de 88%) comme la plupart des introns de *Dictyostelium* (Eichinger et al., 2005). *Dd-alx* code pour une protéine de 794 acides aminés, de masse moléculaire calculée de 90,5 kDa et de pI théorique de 6,3. Le logiciel de recherche de motifs SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) a mis en évidence dans l'extrémité N-terminale de la protéine, un domaine Bro1 (domaine PfamA n°03097, aa 1 à 154), signature de la famille Alix et un domaine médian de structure hélicoïdale qui pourrait participer à un agencement en torsade d'hélices (aa 597 à 652).



**Figure 20 : Représentation schématique de la protéine Alix chez Dictyostelium.** La protéine Alix est constituée d'une région N-terminale contenant le domaine Bro1, une région centrale susceptible de former une structure en torsade d'hélices avec des partenaires (CC) et un domaine C-terminal riche en prolines (Pro) qui contient des sites de liaison à des motifs SH3 et WW. Trois sites consensus de phosphorylation potentiels ont été identifiés. Concernant le site potentiel de phosphorylation par la kinase GSK-3, le triangle noir indique la sérine de priming de la kinase et les deux triangles blancs indiquent les deux sérines potentiellement phosphorylées par la kinase GSK-3.

Par ailleurs, le domaine C-terminal d'Alix est riche en résidus prolines qui s'organisent en sites de liaison à des motifs SH3 (PxxP où P=proline et x=acide aminé quelconque) et WW (PPXP/Y où P=proline, Y=tyrosine et x= acide aminé quelconque) (Sudol, 1996). Dd-Alix contient également plusieurs sites potentiels de phosphorylation prédits notamment par le logiciel ELM (http://elm.eu.org): un site potentiel de phosphorylation par la kinase PKA (<sub>7</sub>KRTEK<sub>11</sub>), un site potentiel de phosphorylation par une tyrosine kinase de type src (<sub>307</sub>AKKDNDTIYHD<sub>317</sub>) et un site

potentiel de phosphorylation par GSK-3 dans la région riche en résidus prolines ( $_{695}$ GVNPHSPLTSPSPSLQSPV $_{713}$ ). De façon générale, au niveau de ce dernier type de site, une sérine est d'abord phosphorylée par une kinase de « priming » qui est alors reconnue par la kinase GSK-3 qui à son tour peut successivement phosphoryler les 2 sérines situées en amont (voir Fig.20). Cette séquence s'est révélée être un excellent substrat pour la kinase GSK-3 *in vitro* (K<sub>m</sub>≈ 2,3-2,7 µM; Travail réalisé en collaboration avec A.J. Harwood, Cardiff University).

L'alignement des séquences des protéines Alix de *Saccharomyces* (Bro1), de *Dictyostelium* et humaine (Hs-Alix) montre que Dd-Alix partage 20% d'identités et 43% d'homologies avec Bro1 et 27% d'identités et 51% d'homologies avec la protéine humaine. La conservation des acides aminés est répartie de façon homogène sur toute la séquence (voir Fig21).



Figure 21 : Alignement des séquences protéiques des homologues de la protéine Alix de Saccharomyces (Bro1) noté Sc-Alix, de Dictyostelium noté Dd-Alix et l'humaine, noté Hs-Alix. Les alignements de séquences ont été faits en utilisant le logiciel ClustalW.

L'alignement de séquences révèle également la conservation des sites de phosphorylation par PKA et une kinase de type Src, ainsi qu'un fort degré d'identité de certains motifs comme par exemple une séquence AQAQE de fonction inconnue (aa 180 à 184). En revanche, le site potentiel de phosphorylation par la kinase GSK-3 n'est présent que chez *Dictyostelium*. Le domaine Bro1 qui est

présent chez tous les membres de la famille Alix, est également retrouvé dans des protéines plus distantes comme les adhésines, les rhophilines ou encore dans une famille de phosphotyrosine phosphatases (HD-PTP).

### 2. Production d'anticorps anti-Alix

Afin d'aborder la fonction d'Alix, nous avons développé des anticorps spécifiques contre la protéine. Dans un premier temps, deux peptides, l'un situé à l'extrémité N-terminale ( $_{1}MLSIERKRTEKVDFS_{15}$ ) et l'autre à l'extrémité C-terminale ( $_{781}FTAPPPYNSNNKHY_{794}$ ) de Dd-Alix ont servi d'immunogène. Afin de valider sa spécificité, le sérum obtenu a été testé par Westernblot en comparant un extrait protéique fait sur une souche parentale à un extrait protéique fait sur la souche *alx* nulle (voir paragraphe invalidation d'*alx*). Comme le montre la Fig.22A, le sérum brut reconnaît la protéine endogène à la taille attendue (91 kDa), absente dans la souche *alx* nulle, ainsi qu'une bande contaminante vers 35 kDa présente dans les deux souches. Les anticorps ont ensuite été purifiés successivement sur deux colonnes de billes d'agarose (*sulfolink coupling gel*, Pierce) couplées respectivement à chacun des deux peptides. La purification sur colonne nous montre que les anticorps du sérum ( $\alpha$ -Alix1) sont dirigés contre le peptide C-terminal (Fig.22A).

Une deuxième approche a consisté à développer un anticorps polyclonal ( $\alpha$ -Alix2) dirigé contre le domaine C-terminal de la protéine (aa 460 à 794). Ce domaine a été exprimé sous la forme d'une protéine de fusion avec une étiquette His<sub>6</sub>. L'expression est réalisée en bactéries BL21-DE3 à 37°C (3 heures) en présence d'1 mM d'IPTG. Dans ces conditions, la protéine recombinante est retrouvée dans les corps d'inclusion. Ces corps d'inclusion ont été purifiés et utilisés comme immunogène pour générer des anticorps polyclonaux. Le sérum obtenu a été testé par Western-blot comme précédemment. Dans la souche sauvage, une seule protéine est reconnue par l'anticorps à environ 91 kDa comme attendu pour la protéine Alix et qui est absente dans la souche mutante (Fig.22B). Comme le sérum ne donne aucun bruit de fond, il n'a pas été nécessaire de le purifier. Contrairement à l'anti-peptide C-terminal, cet anticorps est capable de reconnaître toutes nos constructions de délétions (voir paragraphe complémentation). Il a donc été utilisé de façon préférentielle dans les expériences qui vont suivre.



22 : Test des Figure anticorps anti-Alix. Des extraits protéiques végétatifs totaux, réalisés sur la souche sauvage KAx-3 et la souche alx nulle, ont été séparés sur un gel d'acrylamide 12% et transférés sur membrane Immobilon puis analysés par immunodétection à l'aide des sérums anti-peptides (anti-Alix1) (A) ou anti-protéine non purifié (anti-Alix2) (B) dilués au 1/1000.

### 3. Expression spatio-temporelle de Dd-Alix

Le profil d'expression temporelle de Dd-Alix a été déterminé par Northern-blot et par Westernblot. Les ARN totaux ont été préparés, à partir de la souche parentale KAx-3, à différents temps de développement (toutes les 4 heures sur une période de 24 heures). L'ARN messager correspondant à Dd-Alix a été révélé grâce à une sonde ADN réalisée par PCR (fragment amplifié à partir des oligonucléotides alix8 et alix9, voir annexes) et marquée à la digoxygénine. L'ARNm de Dd-Alix est présent durant tout le développement, avec un niveau légèrement plus élevé pendant le stade végétatif et les premières heures du développement (Fig.23A).



Figure 23 : Expression temporelle d'Alix. A. Northern-blot : Les ARN totaux sont extraits de la souche KAx-3 à différents temps de développement. Après migration des ARN sur gel d'agarose puis transfert sur membrane de nylon, l'ARNm de Dd-Alix est révélé spécifiquement grâce à la sonde alix8/alix9 (cf annexe) marquée au DIG. L'intégrité des ARN totaux pendant la préparation ainsi que la normalisation des échantillons dans chaque puits sont contrôlées par le marquage des ARNr (28S et 18S) au bromure d'ethidium. B. Western-blot : Des extraits protéiques totaux, réalisés sur la souche sauvage KAx-3 en développement toutes les 4h ont été analysés par migration sur un gel d'acrvlamide 12%. transfert sur membrane Immobilon puis immunodétection à l'aide du sérum  $\alpha$ -Alix2 dilué au 1/1000.

Afin de vérifier que le Northern-blot reflète le profil d'expression de la protéine, la présence d'Alix dans des extraits protéiques totaux végétatifs et développés a été suivie par Western-blot grâce à l'anticorps  $\alpha$ -Alix2 (Fig.23B). Le Western-blot confirme que Dd-Alix est exprimé durant tout le développement à un niveau relativement constant, jusqu'à la formation de la fructification mature où la quantité d'Alix diminue.

Au cours du développement, *Dictyostelium* différencie deux sous-populations, les cellules préspores et les cellules prétiges elles-même organisées en plusieurs sous-types (voir Introduction). Pour déterminer si l'expression de Dd-Alix est spécifique d'un type cellulaire, nous avons cloné le promoteur du gène *alx*. Environ 400 paires de bases séparent le gène *alx* du gène en amont codant pour la protéine SRPkinase (Fig.24A). Cette séquence génomique contenant le promoteur d'Alix a été utilisée pour contrôler l'expression du gène rapporteur *gfp* dans la souche KAx-3. De façon attendue,

la GFP est détectable dès la phase végétative. Dans l'agrégat, la GFP est présente dans toutes les cellules. Cette homogénéité est conservée au stade limaçon, excepté dans la région prétige correspondant à la sous-population PstO (voir Introduction Fig.19 pour les sous-populations) où le niveau d'expression semble plus faible. Dans la fructification, la GFP est présente dans l'intégralité de la structure mais à un moindre niveau (Fig.24B).



Figure 24 : Caractérisation de l'expression spatiale de Dd-Alix. A. Schéma du promoteur et de la construction : Les 400 pb qui séparent le gène alx du gène en amont ont été clonées et introduites en amont du gène codant pour la GFP. Cette construction « rapporteur » a été électroporée dans les cellules KAx-3 afin de suivre l'expression spatiale de Dd-Alix. B. Pattern d'expression : Les cellules sont déposées sur une gélose de Na/K phosphate afin de déclencher le développement. Les cellules sont observées au microscope avec un filtre GFP à différents temps de développement (agrégat, limaçon et fructification).

La caractérisation spatio-temporelle de Dd-Alix nous indique que cette protéine est exprimée durant tout le développement et dans tous les types cellulaires.

## **II.** OBTENTION ET CARACTERISATION DE LA SOUCHE ALX NULLE

Afin de déterminer le rôle de la protéine Dd-Alix, nous avons entrepris l'invalidation du gène *alx* par recombinaison homologue avec une construction où le gène est interrompu par une cassette de sélection. L'invalidation a été réalisée dans la souche JH10 dérivée de la souche KAx-3 mais qui est auxotrophe pour la thymidine. L'interruption du gène et la sélection des mutants se font en utilisant la cassette thy1 (codant pour le gène de la thymidine synthase) qui restaure la croissance du mutant dans un milieu non supplémenté en thymidine. La construction d'invalidation a été réalisée pour répondre à des critères optimisant la recombinaison homologue chez *Dictyostelium* : (1) au moins 250 paires de bases appartenant au gène ont été ajoutées de part et d'autre de la cassette de sélection et (2) les extrémités 3' et 5' de l'ensemble régions flanquantes/cassette ont été digérées au niveau de sites de restriction rajoutés mais qui ne modifient que de 1 à 2 bases la séquence d'origine.

### 1. Obtention de la souche alx nulle

#### a) Elaboration de la construction d'invalidation alx-thy1

La construction d'invalidation *alx-thy1* a été générée en 3 étapes (Fig.25). Les régions choisies dans la partie 5' et 3' du gène *alx* pour encadrer la cassette *thy1* sont notées respectivement région A et région B. Les régions A et B ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADN génomique avec les oligonucléotides alix7/alix2 et alix3/alix28 respectivement (voir annexe). Ces fragments ont été sous-clonés dans le vecteur de sous-clonage pSP72 (Promega) en utilisant des sites de restriction rajoutés aux oligonucléotides dans cette optique: alix7/*EcoRI*, alix2/*BamHI*, alix3/*BamHI* et alix28/*XhoI*. Le site *BamHI* a ensuite été utilisé pour insérer la cassette *thy1*. Avant électroporation, le plasmide a été linéarisé grâce aux enzymes de restriction *XhoI* et *EcoRI*.



**Figure 25 : Construction d'invalidation du gène** *alx.* La cassette *thy1*, qui permet la croissance d'une souche normalement auxotrophe pour la thymidine en absence de thymidine exogène, a été insérée par sous-clonage dans le gène codant pour Alix. La construction, digérée par *EcoRI* et *Xho*I, a ensuite été introduite par électroporation dans *Dictyostelium.* L'invalidation du gène *alx* dans le génome de *Dictyostelium* résulte de la recombinaison homologue de la construction dans le locus d'alx.

#### b) Clonage et validation de la souche alx nulle

Une semaine après l'électroporation de *alx-thy1* dans la souche JH10 et la sélection dans un milieu ne contenant pas de thymidine exogène, environ 200 colonies deviennent visibles au fond de la boîte de culture. Les transformants sont alors clonés sur un tapis de *Klebsiella aerogenes* (co-culture) et au bout de 5 jours, des plages de croissance résultant de la phagocytose du tapis bactérien par les

cellules de *Dictyostelium* apparaissent (Fig.26). Chaque plage de croissance correspond à un clone. Au centre de la plage de croissance, les cellules se retrouvent en situation de jeûne et s'engagent alors dans le cycle de développement multicellulaire. A partir de la boite de *K. aerogenes*, 8 clones, présentant des phénotypes de développement variés, ont été mis en culture.



**Figure 26 : Clonage des mutants** *alx* **nuls potentiels sur** *K. aerogenes.* Les cellules sélectionnées par l'absence de thymidine exogène (mutants potentiels) sont étalées sur des boîtes de Petri en présence de *K. aerogenes.* Chaque cellule de *Dictyostelium* se multiplie en utilisant *K. aerogenes* comme source de nutriments et forme alors progressivement une colonie. En bordure de la colonie, *Dictyostelium* est en phase de croissance rapide, au centre, elle s'engage dans un programme de développement multicellulaire. Des structures développées ayant un phénotype identique ou anormal comparé à la souche parentale sont visibles au centre de la plage de croissance. Les clones sélectionnés sont ensuite transférés en milieu de culture par prélèvement des cellules en bordure de la plage de croissance.

Pour les différents clones, l'invalidation du gène *alx* a été vérifiée par Western-blot à partir d'extraits protéiques obtenus en phase végétative. L'insertion de la cassette *thy1* dans le génome de *Dictyostelium* au niveau du locus *alx* se traduit par l'absence complète de la protéine sur l'immunoblot réalisé avec l'anticorps  $\alpha$ -Alix2 (Fig.27). Sur 7 clones, 4 portent la mutation *alx* nulle. Le génotype a été confirmé ultérieurement par Southern-blot. Les clones présentant tous le même phénotype sur *K. aerogenes*, seul le clone 2 a été conservé dans la suite des expériences.

	1 2 3 4 3 6 7
α-Alix2	

**Figure 27 : Validation de l'invalidation du gène** *alx* **par Western-blot**. L'expression d'Alix dans différents clones potentiellement invalidés a été testée par Western-blot avec l'anticorps anti-Alix2 utilisé au 1/1000. Sur 7 clones testés, les clones 2, 5, 6 et 7 sont effectivement invalidés pour le gène *alx*.

### 2. Caractérisation de la souche alx nulle

### a) L'absence de Dd-Alix conduit à un phénotype de développement anormal

En phase végétative, la souche *alx* nulle ne présente aucune anomalie majeure de croissance ou d'activité de macropinocytose. Sa croissance sur *K. aerogenes* témoigne d'un maintien des capacités de phagocytose. Par contre, l'analyse rapide des plages de croissance laisse déjà envisager un développement multicellulaire anormal. Une caractérisation plus fine du phénotype de développement a donc été réalisée.

Le programme de développement multicellulaire de *Dictyostelium* est déclenché par la carence nutritive. Sur une durée d'environ 24 h, l'organisme multicellulaire formé par l'agrégation initiale des cellules individuelles, passe par des étapes de morphogenèse bien définies (Fig.28, panneau du haut pour le parent). Le phénotype de développement du mutant *alx* nul a donc été comparé à celui de la souche sauvage KAx-3. Comme le montre la Fig.28, le mutant *alx* nul réalise la phase d'agrégation avec une cinétique comparable à la souche parentale pour générer un agrégat de taille similaire à ceux formés par la souche KAx-3. L'agrégat évolue ensuite pour former un pseudo doigt primaire qui s'allonge légèrement. Parfois, plusieurs extensions sont générées à partir d'un même base (structure en multidoigts primaires). A ce stade, le développement s'arrête. Le mutant est incapable de former un limaçon ou une fructification.



Figure 28 : Comparaison des phénotypes de développement des souches KAx-3 et *alx* nulle. Les cellules sont étalées sur un milieu gélosé Na/K phosphate. L'absence de nutriments agit comme un signal d'induction du programme de développement multicellulaire. La souche sauvage (KAx-3, panneau du haut) passe par des étapes successives de morphogenèse où l'on reconnaît les étapes d'agrégation (10 h), pseudo doigt primaire (15 h), limaçon (20 h) et fructification (24 h). Les deux dernières étapes ne sont jamais atteintes par la souche *alx* nulle (panneau du bas). Les cellules qui composent les structures terminales ont été observées au microscope : des cellules spore (Sp) et des cellules tige vacuolisées (Vac) sont observées dans les structures mutantes, la plupart des cellules sont indifférenciées (Ind) ou vacuolisées (Vac).

### b) Alix n'est pas nécessaire à la mort des cellules tiges

Afin de déterminer quels types de cellules composent la structure terminale, une caractérisation de la morphologie des cellules a été réalisée au microscope. Dans une souche parentale, près de 30% des cellules sont des cellules tiges vacuolisées en partie organisées dans la tige de façon linéaire. Le reste forme les coupes qui entourent la masse de spore et le disque basal. Les 70% restant sont des cellules de forme ovoïde de petite taille, les spores. Dans la structure développée de la souche *alx* nulle, on observe essentiellement des cellules indifférenciées et des cellules présentant une large vacuole rappelant les cellules de la tige. Cependant, ces cellules vacuolisées ne sont pas alignées comme dans la souche parentale suggérant que la formation de la tige proprement dite est perturbée. Aucune spore n'est observée, alors qu'il s'agit du type cellulaire majoritaire dans la souche parentale. La voie de différenciation des spores est donc particulièrement affectée dans le mutant nul.

Pour confirmer la capacité des cellules *alx* nulles à générer des cellules tige, une étude en monocouche permettant de s'affranchir de la morphogenèse a été réalisée. Les cellules, en situation de carence nutritive, sont soumises à un traitement successif de morphogènes diffusibles appropriés (AMPc et DIF-1) pour induire la différenciation des cellules végétatives en cellules tige. Dans ces conditions, après 24 h, les cellules *alx* nulles forment des cellules vacuolisées de type tige semblables aux cellules tiges de la souche parentale.



Figure 29 : Les cellules alx nulles peuvent générer des cellules tige. La capacité des cellules alx nulles à se différencier en cellules de type été tiae а testée en monocouche. Les cellules sont séquentiellement soumises à la présence d'AMPc puis de DIF-1. Après 24 h, la présence de cellules vacuolisées est vérifiée par microscopie en utilisant le contraste d'interférence différentielle (DIC).

Dd-Alix est donc essentiel au développement multicellulaire puisque son invalidation conduit à une morphogenèse anormale et à un défaut très net de différenciation cellulaire. Par contre, Alix n'est pas nécessaire à la mort des tiges.

### c) Caractérisation des défauts développementaux du mutant alx nul

# (1) Expression des marqueurs du développement dans la souche *alx* nulle

Au cours du développement, un certain nombre de gènes sont induits ou réprimés selon la phase du développement. Plusieurs d'entre eux sont classiquement utilisés comme marqueurs du déroulement normal du programme de développement. Pour mieux caractériser les défauts de développement liés à l'invalidation d'*alx*, l'expression de certains de ces marqueurs a été suivie au fur et à mesure du développement de la souche *alx* nulle. Nous avons sélectionné quatre marqueurs exprimés après la phase d'agrégation: les gènes *ecmA* et *ecmB* qui sont des marqueurs spécifiques des cellules prétiges, le gène *SP60* qui est un marqueur spécifique des cellules préspores et le gène *SpiA* qui est un marqueur tardif spécifiquement exprimé dans les spores (voir Fig 19 de l'Introduction).

Pour suivre leur expression chez le mutant *alx* nul, nous avons exprimé des constructions provenant du Laboratoire de R. Firtel (UCSD) utilisant le promoteur de chacun de ces gènes pour

contrôler l'expression du gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase, *lacZ* ou le gène codant pour la protéine GFP. A différents temps de développement, les structures multicellulaires sont fixées et testées pour l'activité  $\beta$ -galactosidase ou observées au microscope à fluorescence avec un filtre GFP.



**Figure 30 : Etude de l'expression de marqueurs du développement.** Des constructions, portant le gène *lacZ* ou le gène *gfp* sous le contrôle de promoteurs spécifiques de types cellulaires, ont été introduites dans le mutant *alx* nul. Les cellules sont déposées sur une gélose de tampon Na/K phosphate afin de déclencher le développement. Les cellules sont fixées à différents temps et testées pour une activité ß-galactosidase ou simplement observées au microscope avec un filtre GFP, pour témoigner de l'activité des promoteurs spécifiques.

Dans la souche *alx* nulle au stade agrégat, les marqueurs *ecmA* et *SP60* sont à peine exprimés alors que le marqueur *ecmB* est très présent. Ceci révèle un défaut très précoce dans la mise en place de la voie de différenciation spore qui aurait dû représenter près de 80 % des cellules. De plus, ce marquage révèle également un défaut dans la voie de différenciation des cellules tiges qui sont surreprésentées (dans une souche parentale, les cellules prétige/tige ne représentent que 20 % du total des cellules) avec en plus un déséquilibre entre les marqueurs *ecmA* et *ecmB*. Après 24 heures de développement, la structure terminale exprime à peine le marqueur préspore SP60 et, de façon attendue de part l'absence de spores, absolument pas le marqueur spore SpiA. Concernant les marqueurs tiges, ce pseudo-doigt terminal exprime modérement la construction *ecmA/lacZ* et très fortement la construction *ecmB/GFP*.

Ces résultats confirment ceux obtenus par l'observation du phénotype avec une incapacité du mutant nul à différencier des cellules spores, un défaut déjà visible au stade préspore. Le mutant est par contre capable de différencier des cellules de type tige mais la répartition des différentes sous-population de cellule tige est affectée. Dans un organisme parental, deux sous-populations différentes de cellules tige exprimant ecmA et ecmB sont présentes : les cellules PstB qui expriment fortement le

gène *ecmB* et peu le gène *ecmA*, plutôt présentes au niveau du disque basal et les cellules de la tige même (PstAB) qui expriment fortement les gène *ecmA* et *ecmB*. L'expression de ces marqueurs est très nettement perturbée dans le mutant *alx* nul indiquant une sur-représentation de la population PstB.

Le développement multicellulaire de *Dictyostelium* repose notamment sur la sécrétion de morphogènes diffusibles dont l'AMPc et la cétone chlorée DIF-1. L'absence de l'un d'eux, du fait d'une mutation quelconque, peut entrainer un phénotype anormal de développement qu'il est possible de complémenter par l'ajout dans l'agrégat multicellulaire de cellules parentales capables de sécréter ces morphogènes (formation d'un organisme chimère). Le mutant retrouve alors sa capacité à se différencier normalement et participe à la formation de la fructification en coopération avec les cellules parentales. Afin de vérifier si le phénotype *alx* nul est lié à ce type de problème, des cellules *alx* nulles ont été mélangées dans un rapport de 1:3 à des cellules KAx-3 et placées dans des conditions appropriées de développement. Les cellules *alx* nulles sont identifiables au sein de la structure multicellulaire par l'expression du rapporteur  $\beta$ -galactosidase (gène *lacZ*) ou de la protéine GFP sous le contrôle du promoteur fort constitutif p*Act15* (constructions fournies par R.Firtel).



Figure 31 : Comportement des cellules alx nulles dans une chimère. Les cellules alx nulles possédant les constructions pact15/lacZ, pact15/gfp sont mélangées avec des cellules KAx-3 dans un rapport de 1:3 et déposées sur une gélose de Na/K phosphate. Les structures multicellulaires sont fixées et testées pour l'activité β-galactosidase ou directement observées avec un filtre GFP à différents stades de développement : Agrégat (Ag), limaçon (L) et fructification (F).

Au stade de l'agrégat, les cellules *alx* nulles se répartissent de façon homogène à l'intérieur de la chimère indiquant une participation au développement équivalente à celle des cellules sauvages au cours de la phase précoce du développement. Au fur et à mesure de la morphogenèse du limaçon, les cellules *alx* nulles ne participent presque plus à la structure : elles restent à l'arrière du limaçon et sont progressivement perdues lors de la migration du limaçon. Dans la fructification, la majorité des cellules marquées sont présentes à la base de la fructification, quelques unes sont retrouvées dans les coupes qui entourent la masse de spores mais aucune n'est retrouvée dans la tige ni dans la masse de spores.

Le défaut de développement de la souche *alx* nulle n'est donc pas corrigé par la présence de cellules parentales. Cela suggère que l'anomalie de différenciation n'est pas due à l'absence d'un morphogène diffusible mais est intrinsèque à la souche *alx* nulle. Malgré le fait que le mutant puisse différencier des cellules de type tige par lui-même *in vitro*, il est incapable de contribuer à la formation des structures tiges dans un organisme chimère.

#### (2) Effet du tampon sur le phénotype de développement

Durant ce travail de thèse, le laboratoire de M.Maki a publié l'invalidation de Dd-Alix dans la souche Ax2 de *Dictyostelium* (Ohkouchi et al., 2004). De façon surprenante, cette invalidation ne se traduit par aucun phénotype de développement anormal sauf si la concentration extracellulaire calcique est abaissée à 10 nM (contre 200  $\mu$ M dans le tampon classique). Les cellules *alx* nulles sont alors bloquées au stade agrégat contrairement aux cellules parentales. Notre milieu gélosé Na/K phosphate de différenciation contient 200  $\mu$ M de Ca<sup>2+</sup>. Le phénotype anormal que nous observons en l'absence d'Alix ne semble donc pas lié à un manque de Ca<sup>2+</sup> dans le milieu extracellulaire. Cependant, nous avons testé le développement de notre souche *alx* nulle en présence de 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Cette augmentation ne restaure pas un phénotype parental.

Ce même groupe a également testé l'effet du pH sur le développement de leur souche Ax2/alx nulle (Ohkouchi et al., 2005). Dans un tampon CHES (20 mM CHES, 1 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 9), leur mutant est à nouveau bloqué au stade agrégat. Ces résultats suggèrent une sensibilité de la souche à l'environnement alcalin. Cependant, cet effet sur le développement n'est plus observé dans un tampon Tricine au même pH (20 mM Tricine, 1 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 9) ce qui a amené les auteurs à suggérer que les cations Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> présents en plus grande quantité dans le tampon Tricine pourraient influencer la sensibilité de la souche au milieu alcalin. L'addition de 20 mM NaCl dans le tampon CHES restaure d'ailleurs la formation de fructifications. Lorsque notre souche *alx* nulle est mise à jeûner en tampon CHES à pH 9, le phénotype de développement observé est le même que celui obtenu en tampon Na/K phosphate : un arrêt du développement après la formation du pseudo doigt primaire. L'addition de 20 mM NaCl au tampon ou l'utilisation de tampon Tricine ne restaure pas un phénotype parental. Le phénotype que nous observons n'est donc pas lié à une sensibilité particulière de notre souche à la concentration en cations du milieu mais bien uniquement à l'absence d'Alix.



**Figure 32 : Phénotype de développement du mutant** *alx* **nul suivant la concentration en Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>.** Les cellules *alx* nulles sont étalées sur différents milieux gélosés : Na/K phosphate, Na/K phosphate + 2 mM Ca<sup>2+</sup>, CHES +20 mM NaCl et Tricine afin de tester les effets de différents cations sur le développement de la souche. Après 24 h, le phénotype est observé sous loupe binoculaire.

La différence entre nos résultats et ceux obtenus dans le laboratoire de Maki semble être principalement liée aux souches utilisées pour générer les invalidations géniques. La souche Ax2 nécessite une diminution de la concentration en cations pour révéler le phénotype *alx* nul ce qui n'est pas le cas pour la souche JH10 (dérivée de KAx-3 dans notre cas) et de la souche KAx-3 (B. Blot, G. Klein et L. Aubry, données non publiées). Des différences de phénotypes suivant les souches ont déjà été observées chez *Dictyostelium* pour l'invalidation des gènes *nox* (NADPH-oxydase) par exemple (B.Lardy, données non publiées) mais également dans d'autres organismes comme les cellules de mammifères, lors de l'invalidation du récepteur à l'EGF (Sibilia and Wagner, 1995; Wong, 2003).

# **III.** LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE Dd-ALIX

Afin d'appréhender la fonction d'Alix, nous avons étudié sa distribution subcellulaire en conditions végétatives et en développement.

### 1. Dd-Alix est partiellement associé à une fraction membranaire

Pour avoir une première indication de la localisation subcellulaire de la protéine, un fractionnement en cytosol et membranes a été réalisé sur la souche KAx-3. Les cellules sont cassées grâce à des billes de verre puis centrifugées à basse vitesse pour éliminer les noyaux et les cellules non cassées. Ce surnageant post-nucléaire représente l'extrait total (Fig.33A, T). Il est soumis à une ultracentrifugation de 30 minutes à 100 000 xg permettant de séparer la fraction soluble (S) de la fraction membranaire (P) qui inclut également des éléments du cytosquelette. La répartition de la protéine Dd-Alix endogène dans ces différentes fractions est suivie par Western-blot. Dd-Alix est

principalement retrouvé dans la fraction soluble avec une partie non négligeable retrouvée dans la fraction membranaire (Fig.33A). Il faut cependant noter que la quantité d'Alix retrouvée dans la fraction membranaire est plus importante en tampon Meses (20 mM Mes pH6,5, 250 mM saccharose, 1 mM EDTA ; expériences présentées dans notre article concernant Alix) qu'en tampon Hepes (20 mM Hepes pH 7,5, 110 mM NaCl, 1 mM DTT ; expériences présentées ici). Cette différence pourrait s'expliquer par des interactions de type électrostatique entre Alix et un partenaire membranaire ou associé aux membranes.

Ce type de fractionnement a également été réalisé sur des cellules en phase de développement afin de déterminer si le développement multicellulaire modifie la répartition soluble/membrane de Dd-Alix. Les cellules sont placées 12 heures en carence nutritive sur une gélose de Na/K phosphate avant le fractionnement. Les résultats obtenus (Fig.33B) sont comparables à ceux observés au stade végétatif. La carence nutritive ne modifie donc pas de façon notable la répartition soluble/membrane.



Figure 33 : Analyse de la distribution subcellulaire de la protéine Alix au stade végétatif ou en développement après un fractionnement à 100 000 xg en tampon Hepes. Environ  $2.10^7$ cellules KAx-3 au stade végétatif (A) ou après 12 heures sur une gélose de Na/K phosphate (B) sont cassées grâce à des billes de verre. Le surnageant post-nucléaire (T) est soumis à une ultracentrifgation de 30 minutes à 100 000xg qui sépare la fraction soluble (S) de la fraction membranaire (P). Les extraits protéiques issus de chacune des fractions sont analysés par immunodétection avec l'anticorps  $\alpha$ -Alix2 diué au 1/1000.

Des expériences complémentaires faites au laboratoire ont montré que l'ajout de Triton X-100 ne permet pas de solubiliser massivement la fraction membranaire de Dd-Alix. Par ailleurs, lorsque ce culot Triton X-100 insoluble est soumis à un gradient de flottaison, Dd-Alix est retrouvé dans la partie haute du gradient, des résultats compatibles avec une association de la protéine à des domaines lipidiques particuliers de type radeaux.

### 2. La protéine Alix est présente sur des structures vésiculaires

Dans l'optique de déterminer à quel type de structures correspond le pool membranaire d'Alix, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur la souche KAx-3. Les anticorps  $\alpha$ -Alix1 et  $\alpha$ -Alix2 ont été utilisés en vérifiant au préalable qu'aucun signal n'était détectable dans la souche *alx* nulle. Au stade végétatif, la protéine est présente de façon uniforme dans la cellule. Elle est retrouvée aussi bien dans le cytosol que dans le noyau avec en plus, un marquage ponctué pouvant correspondre à des vésicules de petites tailles. Le signal obtenu sur la protéine endogène étant cependant très faible et difficilement analysable de façon certaine, de nouvelles expériences ont été faites sur la souche *alx* nulle exprimant la protéine Dd-Alix, *alx*/Alix<sub>myc</sub>. Dans cette souche, Dd-Alix porte une étiquette *myc* (myc<sub>2</sub>) en C-terminal permettant l'utilisation de l'anticorps commercial  $\alpha$ -myc 9E10 et son expression est sous le contrôle du promoteur constitutif p*Act15*. Plusieurs observations nous laissent penser qu'Alix<sub>myc</sub> se comporte comme l'Alix endogène : (i) il complémente le phénotype nul (voir Fig.37) et (ii) son niveau d'expression est comparable à celui de la protéine endogène (voir Fig.37). Par ailleurs, l'utilisation du promoteur p*Act15* assure une expression dans tous les types cellulaires comme dans le cas du promoteur endogène.

Au stade végétatif, nous observons un marquage comparable à celui obtenu dans la souche KAx-3 mais plus net, avec un pool cytosolique et nucléaire ainsi qu'une association à des vésicules de petite taille. Cette distribution à la fois soluble et membranaire est en accord avec les résultats de fractionnement. Pour déterminer la localisation de la protéine dans la phase développementale, les cellules ont été placées 12 h en tampon de développement en boîtes multi-puits à une concentration cellulaire optimale pour le développement ( $2.10^6$  cellules/cm<sup>2</sup>). Ce protocole permet d'avoir les cellules en phase d'agrégation mais encore suffisamment séparées les unes des autres pour permettre facilement l'observation de l'immunomarquage. A ce stade de développement, Alix<sub>myc2</sub> est toujours associé à des structures vésiculaires mais de plus grande taille et qui se détachent de façon plus nette du marquage cytosolique. Pour les étapes plus tardives du développement, la localisation subcellulaire a été suivie par des expériences d'immunomarquage *in situ* sur organisme multicellulaire entier qui confirment une association vésiculaire tout au long du développement (Fig.34).



**Figure 34 : Etude de la localisation de la protéine Alix**<sub>myc</sub> **par immunofluorescence dans la souche** *alx* **nulle exprimant Alix**<sub>myc2</sub> **sous le contrôle du promoteur** *Act15.* Les cellules *alx* nulles exprimant la protéine Alix<sub>myc</sub> sont fixées en paraformaldéhyde 4% au stade végétatif ou après 12h en tampon phosphate et perméabilisées en présence de 0,2% Triton X-100. Pour l'organisme entier, les structures sont fixées et perméabilisées en méthanol. La protéine est détectée par l'anticorps secondaire anti-souris marqué au FITC, après une première incubation avec l'α-myc. Le noyau est marqué au DAPI et la F-actine avec du TRITC-phalloidine. Les cellules sont observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x. L'acquisition d'images se fait grâce au logiciel Axiovision (ZEISS).

Avec ce type de marquage, on peut exclure une localisation de Dd-Alix sur les mitochondries (confirmé par l'utilisation du mitotracker Red), ou sur l'appareil de Golgi, le reticulum endoplasmique ou encore la vacuole contractile (confirmé par l'utilisation de l'anticorps  $\alpha$ -RH50, (Benghezal et al., 2001)). Par contre, ce marquage pouvait être spécifique de sous-compartiments endocytaires ou de compartiments autophagiques. Du fait de l'évolution de l'immunomarquage entre le stage végétatif et le développement et les données de la littérature décrivant la mise en place de processus autophagiques avec l'entrée en développement de *Dictyostelium*, nous avons d'abord testé l'hypothèse que les vésicules Alix-positives puissent appartenir à la voie autophagique.

L'autophagie permet la dégradation de composants cellulaires non essentiels durant la carence nutritive (Otto et al., 2003 ; Otto et al., 2004). Ces processus passent par la formation de vésicules cytoplasmiques contenant une double membrane appelées autophagosomes. Elles englobent des organites entiers, puis fusionnent avec les lysosomes et libèrent une vésicule avec une simple membrane qui sera dégradée par les enzymes lysosomales. Chez *Dictyostelium*, cette macroautophagie fait intervenir plusieurs gènes appelés *atg* dont l'invalidation conduit à un défaut d'autophagie et à l'absence d'autophagosomes dans le cytosol des cellules mutées. L'invalidation de *atg1* conduit également à un changement de localisation de la protéine GFP-Atg8 qui passe d'une association à de petites vésicules (autophagosomes) dans la souche parentale à une structure vésiculaire unique de grosse taille dans la souche *atg1* nulle. Nous avons obtenu, du laboratoire de P. Golstein (CIML, Marseille), la souche HMX44 invalidée pour *atg1* dans laquelle nous avons introduit la construction  $Act15/alix_{mvc2}$ .



Figure 35 : Etude de la localisation de la protéine Alix<sub>myc</sub> par immunofluorescence dans la souche HMX44 parentale ou invalidée pour *atg1*. Les cellules HMX44 ou HMX44 *atg1* nulles exprimant la protéine Alix<sub>myc</sub> sont fixées en paraformaldéhyde 4% et perméabilisées en présence de 0,2% Triton X-100 après 12 heures en tampon Na/K phosphate. La protéine est détectée par l'anticorps secondaire antisouris marqué au FITC, après une première incubation avec l'α-myc. Les cellules sont ensuite observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x.

Dans la souche HMX44/Alix<sub>myc2</sub>, Alix<sub>myc</sub> est associé à des structures vésiculaires comparables à celles observées dans la souche KAx-3. L'invalidation de *atg1* ne modifie pas ce marquage : Alix<sub>myc</sub> demeure associé à des vésicules dont la morphologie et la distribution cytoplasmique ne sont pas altérées (Fig.35). Les vésicules Alix-positives ne sont donc pas des vésicules d'autophagie mais plutôt dérivées de la voie endocytaire.

Nous avons cherché à caractériser ces compartiments par co-marquage avec des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques de la voie endocytaire. Cependant, peu d'anticorps de bonne qualité permettant un co-marquage sont disponibles. La protéine Rab7 est un marqueur des endosomes tardifs (Buczynski et al., 1997) qui joue aussi un rôle dans la maturation des phagosomes (Rupper et al., 2001a). La coronine est enrichie dans les coupes phagocytiques (Maniak et al., 1995) et enrichie à la membrane du macropinosome en formation (Hacker et al., 1997) et également au niveau de certains compartiments post-lysosomaux (Rauchenberger et al., 1997). Nous n'avons pas observé de co-localisation entre Dd-Alix et ces protéines. Nous avons donc tenté une approche *in vivo* permettant l'utilisation de marqueurs de phase fluide comme le FITC-dextran et des indicateurs de pH comme le lysotracker. Cette approche nécessitait de générer une protéine Dd-Alix couplée à la GFP ou un de ses dérivés. Le très faible niveau d'expression de la protéine Dd-Alix-GFP n'a pas permis de poursuivre cette caractérisation *in vivo*.

# 3. Dd-Alix est associé à des compartiments endocytaires précoces

Afin de confirmer l'hypothèse endocytaire pour la nature des vésicules Alix-positives, nous avons choisi une approche par gradient de Percoll qui permet de séparer les compartiments endocytaires précoces (endosomes) des compartiments plus tardifs (lysosomes et post-lysosomes) (Thèse L. Aubry 1994). Les cellules KAx-3 sont incubées en présence d'un marqueur de phase fluide, le FITC-dextran, qui permet le marquage de la totalité des compartiments endocytaires. Après fractionnement sur le gradient Percoll, la fluorescence du FITC-dextran se distribue selon deux pics :

un pic léger (fractions 8 à 11) correspondant aux compartiments endocytaires précoces (endosomes) où l'on devine en fait différentes sous-populations et un pic plus lourd (fractions 2 à 4) correspondant aux compartiments endocytaires tardifs. Le FITC-dextran retrouvé au sommet du gradient correspond au marqueur libéré lors du cassage des cellules par éclatement de quelques vésicules endocytaires. La phosphatase acide et la protéine Vamp7 (une protéine SNARE impliquée dans la fusion vésiculaire) sont également utilisée comme marqueurs de la voie endocytaire puisqu'elles sont présentes sur les endosomes et les lysosomes.

Sur un tel gradient, la protéine Dd-Alix est retrouvée au niveau de la fraction soluble et également au niveau des fractions 8 à 11 correspondant aux endosomes où elle colocalise avec la protéine Vamp7 (Fig.36A). Ces résultats confirment ceux obtenus par fractionnement et immunofluorescence. Par ailleurs, ils montrent que Dd-Alix est associé aux compartiments endocytaires précoces et exclus des compartiments plus tardifs de la voie endocytaire (lysosomes/post-lysosomes, fractions 2 à 4). Une portion d'Alix se trouve également au niveau d'une fraction ultra-légère (fraction 12). Cette fraction ne contient ni Vamp7, ni activité phosphatase acide. Une analyse protéomique de la fraction 12 n'a pas permis d'établir la nature de ce compartiment. On ne peut exclure qu'il s'agisse de vésicules cassées.

Des résultats similaires ont été obtenus sur des cellules carencées en phase d'agrégation avec une augmentation du pool endocytaire (fractions 13 et 14) comme observé dans les expériences d'immunofluorescence (Fig.36B). Le marqueur Vamp7 n'a pas pu être utilisé dans les expériences d'immunofluorescence pour vérifier une éventuelle co-localisation car le signal obtenu avec cet anticorps n'émerge pas au dessus du bruit de fond.



Figure 36 : Distribution des protéines Alix et Vamp7 sur un gradient de Percoll 24% réalisé sur la souche KAx-3 au stade végétatif (A) ou après 12h de développement sur une gélose de Na/K posphate (B). Les cellules Kax-3 sont incubées pendant 2 h en présence de 1 mg/ml de FITC-dextran, puis sont lavées, cassées et un surnageant post-nucléaire est déposé au sommet d'une solution de Percoll 24%/Mes-Na 20 mM/saccharose 0,25 M/EDTA 1 mM. Après centrifugation de 1h à 18000 rpm en TFT70 (Kontron), le gradient est élué par fractions de 1,7 ml (A) et 1,4 ml (B). Pour chaque fraction, la distribution du FITC-dextran, l'activité phosphatase acide et la présence des protéines sont déterminées. L'activité enzymatique et la fluorescence sont exprimées en % du total des activités et fluorescence mesurées sur l'ensemble du gradient. Les extraits protéiques issus de chaque fraction sont analysés avec les anticorps anti-Alix2 et anti-Vamp7 utilisés au 1/1000.

## **IV. ETUDE FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE Dd-ALIX**

La protéine Dd-Alix est structurée en domaines distincts dont nous avons cherché à évaluer le rôle fonctionnel par une approche de délétion et mutations ponctuelles. La totalité des protéines mutantes a été exprimée sous le contrôle du promoteur constitutif p*Act15*.

# 1. Le domaine médian de Dd-Alix est essentiel à la fonction développementale de la protéine

La surexpression de la protéine entière  $Alix_{myc2}$  dans le mutant *alx* nul (souche *alx*/Alix<sub>myc</sub>) restaure le phénotype parental avec différenciation de cellules tiges/spores et formation de fructifications. Ce résultat confirme que le phénotype observé est effectivement lié à l'invalidation du gène *alx*. Dans la souche *alx*/Alix<sub>myc</sub>, le niveau d'expression d'Alix<sub>myc</sub> est comparable à celui de la protéine endogène.



Figure 37 : Etude de la complémentation du phénoype alx nul. Les cellules KAx-3, alx nulles et alx /pAct15/alixmyc sont étalées sur un milieu gélosé de Na/K phosphate. Après 24h en carence nutritive, le phénotype observé sous est loupe binoculaire. Les extraits protéiques totaux de chaque souche en conditions végétatives et développées sont analysées en Western-blot avec l'anticorps α-Alix2 pour vérifier le niveau d'expression des protéines Alix et Alix<sub>myc</sub>.

Cette stratégie de complémentation du phénotype a ensuite été étendue à d'autres constructions (voir annexe pour le détail des constructions) afin de définir les domaines essentiels à la fonction développementale de Dd-Alix. Le Tableau 16 résume l'ensemble des constructions testées.

Nom de la construction	Longueur	<b>Taille en kDa</b> (approximative)	Commentaires
Alix∆Pro	aa 1-697	77,5	Région C-terminale tronquée juste avant la région poly-proline
AlixNt	aa 1-596	66	Se limite au domaine N-terminal d'Alix
Alix∆N1∆Pro	aa 155-697	60	Le domaine Bro1 et la région poly-proline sont délétés
Alix∆N2∆Pro	aa 293-697	45	Grande délétion du domaine N-terminal en plus du domaine poly-proline
AlixCt	aa 460-794	37	Correspond au fragment d'Alix trouvé en double-hybride comme interagissant avec ALG-2 chez les mammifères (Missotten et al., 1999)
AlixCPP	aa 593-794	22,5	Comprend le domaine coiled-coil et la région riche en proline
AlixPP	aa 653-794	15,5	Comprend uniquement le domaine poly- proline

Tableau 16 : Récapitulatif des différentes constructions de délétion d'Alix.

Dans un premier temps, le niveau d'expression des différentes constructions a été vérifié par Western-blot. De façon surprenante, alors que les constructions sont sous le contrôle du promoteur constitutif p*Act15* et sont correctement exprimées au stade végétatif, les protéines délétées du domaine Bro1 (Alix $\Delta$ N1 $\Delta$ Pro<sub>myc2</sub>, Alix $\Delta$ N2 $\Delta$ Pro<sub>myc2</sub>, AlixCt<sub>myc2</sub>, AlixCPP<sub>myc2</sub> et AlixPP<sub>myc2</sub>) sont totalement absentes dans les échantillons protéiques développementaux (phénomène illustré pour certaines des constructions Fig.38). Les protéines exprimées sont massivement dégradées dès les premières heures du développement. La raison de cette instabilité n'est pas claire mais ce résultat suggère l'existence d'une régulation développementale à laquelle sont particulièrement sensibles les protéines privées du domaine Bro1. De façon attendue, ces constructions ne complémentent pas le phénotype de développement (Fig.38). Pour vérifier que cette dégradation n'est pas due à l'absence du domaine Bro1 par lui-même mais plutôt à l'absence d'un domaine structuré en N-terminal, une protéine GFP a été ajoutée à l'extrémité N-terminale de Alix $\Delta$ N1 $\Delta$ Pro<sub>myc2</sub>. La protéine GFP-Alix $\Delta$ N1 $\Delta$ Pro<sub>myc2</sub> est dégradée dès les premières heures du développement malgré cette extension N-terminale.

Les constructions exprimées en développement ont fait l'objet d'une étude de leur capacité à complémenter le défaut de développement de la souche *alx* nulle. Le domaine poly-proline étant susceptible de participer à des interactions avec des partenaires cellulaires (via ses sites de liaisons à des motifs de type SH3 et WW), une délétion de ce domaine a été réalisée afin d'estimer l'implication de ces sites dans le rôle de Dd-Alix (Alix $\Delta Pro_{myc2}$ ). La construction Alix $\Delta Pro_{myc2}$  complémente parfaitement la souche *alx* nulle, ce qui suggère que le domaine Pro n'est pas essentiel à la fonction

développementale de Dd-Alix. Les conséquences phénotypiques d'une délétion plus large de la partie C-terminale ont ensuite été étudiées avec la construction  $AlixNt_{myc2}$ . Cette construction correspond au domaine N-terminal d'Alix et est donc dépourvue, en plus de la région poly-proline, du domaine en  $\alpha$ -hélice, un autre domaine potentiel d'interaction protéine-protéine. Comme le montre la Fig.38, ce surexpresseur n'est pas capable de complémenter la souche *alx* nulle. Le développement reste arrêté à un stade précoce. Le domaine médian qui est la seule différence entre la construction AlixNt<sub>myc2</sub> et Alix $\Delta$ Pro<sub>myc2</sub> semble donc indispensable à la fonction de Dd-Alix.



Figure 38 : Etude de la complémentation du phénoype alx nul. Des souches a/x nulles portant les constructions pA ct 15/ $alix\Delta Pro_{myc}$ , pAct15/alixNt<sub>myc</sub>,, pAct15/alix $\Delta$ N1 $\Delta$ Pro<sub>myc</sub>, pAct15/alixCt<sub>myc</sub> sont étalées sur un milieu gélosé de Na/K phosphate. Après 24h de développement, le phénotype est observé sous loupe binoculaire. Les extraits protéiques totaux de chaque souche en conditions végétatives et développées sont analysés par Westernblot avec l'anticorps α-Alix2 pour vérifier l'expression des constructions.

L'analyse de la séquence protéique de Dd-Alix a permis de mettre en évidence un certain nombre de sites très conservés (à l'exception du site GSK3 spécifique de Dd-Alix) qui pourraient participer à la régulation du fonctionnement de la protéine. Ces sites sont répertoriés dans le Tableau 17 et ont été mutés en vue d'interférer avec leur fonction normale.

Site	Mutations		
PKA <sub>7</sub> KRTEK <sub>11</sub>	7KR <b>A</b> EK <sub>11</sub> mime une absence de phosphorylation		
	<sub>307</sub> AKKDNDTIFHD <sub>317</sub> mime une absence de phosphorylation		
<b>Tyrosine kinase</b> 307AKKDNDTI <b>Y</b> HD317	<sub>307</sub> AKKDNDTI <b>D</b> HD <sub>317</sub> mime une phosphorylation constitutive		
	<sub>307</sub> AKK <b>AA</b> DTIYHD <sub>317</sub> mime une absence de phosphorylation par modification du site de reconnaissance de la kinase		

180 <b>AQ</b> AQE184	<sub>180</sub> AEAEE <sub>184</sub> déstabilise une région conservée
GSK3	695GVNPHAPLTAPSPALQSPV713 mime une absence de phosphorylation
695GVNPH <b>S</b> PLT <b>S</b> PSP <b>S</b> LQSPV713	695GVNPHDPLTDPSPDLQSPV713 mime une phosphorylation constitutive

Tableau 17 : Résumé des mutations ponctuelles.

Les protéines portant les mutations ponctuelles sont correctement exprimées et complémentent toutes le phénotype développemental *alx* nul. En ce qui concerne le site de phosphorylation <sub>307</sub>AKKDNDTIYHD<sub>317</sub>, ces résultats confirment la non-détection de formes phosphorylées d'Alix avec des anticorps spécifiques des tyrosines phosphorylées PY99 (Tebu) et PY20 (Eurogentec) dans des fractions enrichies en Alix par immunoprécipitation, ni en situation végétative, ni en développement.

# 2. La surexpression d'Alix dans la souche parentale induit la régulation négative de la protéine endogène

Les constructions précédentes ont été introduites dans la souche KAx-3 afin de rechercher d'éventuels effets dominants-négatifs dus à la surexpression de certains domaines. Après 24 heures de développement, aucune des protéines n'affecte le développement multicellulaire de KAx-3. La présence des protéines a été confirmée par Western-blot avec l'anticorps  $\alpha$ -Alix2 pour toutes les constructions à l'exception de celles privées du domaine Bro1 qui, comme dans la souche *alx* nulle, disparaissent en développement. La présence de la protéine endogène ne les protége donc pas de la dégradation.

En revanche, de façon surprenante, la surexpression d'Alix<sub>myc2</sub> et d'Alix $\Delta$ Pro<sub>myc2</sub> dans la souche KAx-3 se traduit par la disparition de la protéine endogène dans l'extrait protéique et ce, quel que soit le stade de développement (Fig.39). Cette régulation négative de la protéine endogène n'est pas retrouvée lors de la surexpression des autres mutants de délétion.



Figure 39 : Vérification par Western-blot de l'expression de la protéine Alix endogène dans la souche KAx-3 portant différentes constructions. Des extraits protéiques totaux, réalisés au stade végétatif sur la souche sauvage KAx-3 et KAx-3 portant les constructions  $pAct15/alix_{myc}$ ,  $pAct15/alix\Delta Pro_{myc}$ ,  $pAct15/alixNt_{myc}$ ,  $pAct15/alixCt_{myc}$ ,  $pAct15/alixCPP_{myc}$  et  $pAct15/alixPP_{myc}$  ont été analysés par Western-blot avec  $\alpha$ -Alix2 (au 1/1000) après migration sur un gel d'acrylamide, transfert sur membrane Immobilon. Uniquement la partie de la membrane correspondant à la taille d'Alix est rmontrée ici.

Etonnamment, la régulation négative de la protéine endogène n'est pas retrouvée lors de la surexpression des mutants  $Alix\Delta Pro^{D310A/N311A}_{myc}$  et  $Alix\Delta Pro^{Q181E/Q183E}_{myc}$ . Ainsi, bien que les protéines  $Alix\Delta Pro_{myc2}$ ,  $Alix\Delta Pro^{D310A/N311A}_{myc}$  et  $Alix\Delta Pro^{Q181E/Q183E}_{myc}$  soient capables de complémenter le défaut de développement, elles ne sont pas équivalentes entre elles.



Figure 40 : Effet des mutations ponctuelles sur la régulation négative de la protéine Alix endogène. Des extraits protéiques totaux, réalisés sur la souche sauvage KAx-3 et KAx-3 portant les constructions  $pAct15/alix\Delta Pro_{myc}$ ,  $pAct15/alix\Delta Pro^{O181E/O183E}_{Myc}$  et t  $pAct15/alix\Delta Pro^{D310/311A}_{Myc}$  ont été analysés par Western-blot avec l'anticorps  $\alpha$ -Alix2 dilué au 1/1000 après séparation sur un gel d'acrylamide de 12%.

Afin de tester l'éventualité d'une régulation par dégradation protéique, un inhibiteur du protéasome, le MG132, a été utilisé. Les cellules KAx-3 surexprimant  $Alix_{myc2}$  sont maintenues en culture agitée en présence ou non de 100  $\mu$ M d'inhibiteur et des extraits protéiques sont réalisés pour des temps d'incubation croissants. La présence de la protéine Alix endogène est testée par Westernblot. Comme le montre la Fig.41, l'ajout de MG132 ne change rien au phénomène de régulation négative dans des conditions où le MG132 a été prouvé actif (Pukatzki et al., 2000). La protéine endogène n'est pas retrouvée dans les extraits protéiques, quel que soit le temps d'incubation des cellules avec l'inhibiteur.



Figure 41 : Effet de l'inhibiteur du protéasome (MG132) sur le niveau d'expression de la protéine Alix endogène dans la souche KAx-3 portant la construction pAct15/alix<sub>myc</sub>. Des extraits protéiques totaux ont été réalisés sur la souche KAx-3 portant la construction pAct15/alix<sub>myc</sub> en présence ou non de 100  $\mu$ M de MG132 après différents temps d'incubation. Ces extraits ont été analysés après migration sur un gel d'acrylamide 6% et transfert sur membrane Immobilon, par immunodétection avec l'anticoros  $\alpha$ -Alix2 dilué au 1/1000.

Ces résultats nous ont amenés à envisager une régulation au niveau transcriptionnel. Cet aspect a été abordé par une analyse par Northern-blot de la quantité d'ARNm spécifique d'Alix dans différentes souches. Dans le mutant KAx-3/Alix<sub>myc</sub>, l'utilisation d'un promoteur différent de *pAlix* pour contrôler l'expression de Alix<sub>myc</sub> et la présence d'une étiquette *myc* en C-terminal résultent en une différence de taille des ARNm codant pour la protéine endogène et codant pour Alix<sub>myc</sub>. Les ARN totaux des souches KAx-3, KAx-3/Alix<sub>myc</sub>, KAx-3/Alix $\Delta$ Pro<sub>myc</sub> et KAx-3/AlixCt<sub>myc</sub> ont été extraits et l'ARN messager correspondant spécifiquement à Alix a été révélé grâce à une sonde marquée à la digoxygénine (générée à partir des oligonucléoties alix16/alix22, voir annexes). L'ARNm d'Alix endogène est détecté dans toutes les souches à l'exception de la souche KAx-3/Alix $\Delta$ Pro<sub>myc</sub> dans laquelle l'ARNm Alix $\Delta$ Pro<sub>myc</sub> migre à la même taille que l'ARNm de la protéine endogène. Cependant, dans la souche surexprimant Alix<sub>myc</sub>, l'ARNm codant pour l'Alix endogène est à peine visible comparé à la souche KAx-3 et KAx-3/AlixCt<sub>myc</sub> (Fig.42). L'existence d'une régulation transcriptionelle est donc vraisemblable.



**Figure 42 : Vérification par Northern-blot du niveau des ARNm codant pour l'Alix endogène dans différents surexpresseurs.** Les ARN totaux extraits des souches KAx-3 et KAx-3 portant les constructions p*Act15/alix<sub>myc</sub>*, p*Act15/alixDPro<sub>myc</sub>* et p*Act15/alixCt<sub>myc</sub>* ont été analysés par migration sur un gel d'agarose, transfert sur membrane de nylon puis détection à l'aide d'une sonde marquée à la dioxygénine réalisée par PCR avec les amorces alix16/alix22 (voir annexe). PM pour poids moléculaires.

# 3. Le domaine coiled-coil est nécessaire à la localisation nucléaire et le domaine Nt à la localisation vésiculaire

Certains sous-domaines pouvant servir au ciblage de la protéine Alix dans des compartiments subcellulaires spécifiques, les mutants de délétions et mutants ponctuels ont également été testés dans des expériences d'immunofluorescence de façon à visualiser l'impact de ces mutations sur la distribution subcellulaire de la protéine. Seuls les résultats concernant les constructions s'exprimant correctement tout au long du développement sont présentés. La Fig.43 montre que la protéine AlixAPromyc présente la même localisation qu'Alixmyc avec une répartition uniforme dans le noyau et le cytosol de la cellule ainsi qu'un maintien de l'association à des petites structures vésiculaires pendant le stade végétatif et de façon plus marquée en développement. Le domaine N-terminal (construction AlixNt<sub>myc2</sub>) est présent à la fois dans le cytoplasme et associé à des structures vésiculaires comme la protéine Alix<sub>myc</sub> suggérant que ce domaine est suffisant pour le ciblage de la protéine aux vésicules. En revanche, une nette exclusion du noyau est observée, et ce, quel que soit le stade de développement. De façon intéressante, les deux constructions capables de complémenter le phénotype alx nul,  $Alix_{myc}$  et  $Alix \Delta Pro_{myc}$  présentent toutes deux une répartition cytosol-noyau alors que la construction N-terminale qui est incapable de restaurer un phénotype parental, est exclue du noyau. Le ciblage nucléaire d'Alix au noyau requiert donc le domaine médian de la protéine et pourrait être important dans sa fonction développementale. L'analyse de la séquence protéique du domaine médian ne révèle pas la présence de séquences de localisation nucléaire (NLS) permettant l'import de protéine dans le noyau mais on ne peut exclure que la translocation nucléaire repose sur une interaction avec un partenaire carrier.

Pour tester si le défaut de translocation nucléaire suffit à expliquer l'incapacité de la protéine à complémenter la souche *alx* nulle, une construction AlixNt-NLS<sub>myc</sub> portant la séquence NLS du facteur de transcription amibien StkA (Chang et al., 1996) a été introduite dans la souche *alx* nulle (voir annexe pour le détail de la construction). Avec ce signal NLS, la protéine AlixNt-NLS<sub>myc</sub> est ciblée de façon massive vers le noyau (Fig.43, deux noyaux sont présents dans cette cellule) mais son expression dans la souche *alx* nulle ne restaure pas le phénotype parental. Le développement est interrompu au même stade qu'avec la construction AlixNt<sub>myc</sub>. La localisation nucléaire n'est donc pas suffisante pour restaurer la fonction développementale.



**Figure 43 : Localisation des protéines Alix**\(\Delta\)**Pro**<sub>myc</sub>, **AlixNt**<sub>myc</sub> **et AlixNt**-NLS<sub>myc</sub> **par immunofluorescence**. Les cellules *alx* nulles exprimant les protéines Alix\(\Delta\)**Pro**<sub>myc</sub>, AlixNt<sub>myc</sub> **et AlixNt**-NLS<sub>myc</sub> sont fixées en paraformaldéhyde 4% au stade végétatif ou après 12 heures en tampon Na/K phosphate et perméabilisées en présence de 0,2% Triton X-100. Les protéines sont détectées par l'anticorps secondaire anti-souris marqué au FITC, après une première incubation avec l'anti-myc. Le noyau est marqué au DAPI et la F-actine avec du TRITC-phalloidine. Les cellules sont ensuite observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x.

Il faut noter toutefois que l'addition de la séquence NLS conduit à une perte du marquage vésiculaire. Or il est possible que le transport noyau-vésicule-cytosol soit un élément de régulation de la fonction cellulaire d'Alix.

En ce qui concerne les mutants ponctuels, la plupart d'entre eux présentent la même localisation qu'Alix<sub>myc</sub>. Cependant, l'association aux vésicules n'est pas très claire pour les mutants Alix $\Delta$ Pro<sup>D310A/N311A</sup><sub>myc</sub> et Alix<sup>Y315F</sup><sub>myc</sub> en phase végétative. Comme l'entrée en développement rend plus visible cette association, les expériences d'immunofluorescence ont été faites après 12 heures de carence nutritive. Tous les mutants présentent une association nette à des vésicules à l'exception du mutant Alix $\Delta$ Pro<sup>D310A/N311A</sup><sub>myc</sub> qui reste entièrement cytosolique.



Figure 44 : Localisation par immunofluorescence des protéines portant des mutations ponctuelles. Les cellules *alx* nulles exprimant les protéines Alix<sup>Y315F</sup><sub>myc</sub>, Alix<sup>S700D/S704D/S70</sup>

Cependant, des expériences d'immunoprécipitation avec l'anticorps  $\alpha$ -Alix2 après un fractionnement 100 000xg dans la souche  $alx/Alix\Delta Pro^{D310A/N311A}_{myc}$  montre qu'une partie de cette protéine est retrouvée dans la fraction membranaire.



**Figure 45 : Immunoprécipitation de la protéine Alix**Δ**Pro**<sup>D310A/N311A</sup> **après un fractionnement à 100 000 g.**  $2.10^7$  cellules *alx* nulles ou *alx* /AlixΔ**Pro**<sup>D310A/N311A</sup><sub>myc</sub> au stade végétatif sont cassées grâce à des billes de verre. Le surnageant post-nucléaire (T) est soumis à une ultracentrifgation de 30 minutes à 100 000xg qui sépare la fraction soluble (S1) de la fraction membranaire (P1). A la fraction S1 est rajouté 1% de détergeant NP40,  $2,5 \,\mu$ l d'anticorps α-Alix2 et 50  $\mu$ l de protéine A-agarose. Le culot membranaire P1 est repris dans du tampon de lyse 1% NP40 et vortexé afin de solubiliser les protéines associées à la membrane. Après une nouvelle centrifugation à 20 000 xg, au surnageant S2 est rajouté 1% de NP40, 2,5  $\mu$ l d'anticorps α-Alix2 et 50  $\mu$ l de protéines -Aagarose. Les échantillons sont laissés sous agitation 3 heures sur une roue à 4°C. Après lavages en tampon de lyse 1% NP40, les échantillons sont analysés par immunodétection avec l'anticorps α-Alix2 dilué au 1/1000 pour suivre la répartition de la protéine.

Ainsi, malgré une localisation entièrement cytosolique en immunofluorescence, une partie de cette protéine est associée à la fraction membranaire. Il est possible que le niveau d'expression, plus élevé de cette construction (Fig.40) augmente le pool cytosolique qui masquerait alors le marquage vésiculaire.

### V. DISCUSSION

# 1. Dd-Alix est essentiel au développement multicellulaire de Dictyostelium

Afin d'évaluer le rôle de la protéine Alix chez *Dictyostelium*, une souche *alx* nulle a été générée par recombinaison homologue. Alors que le mutant ne présente aucun défaut majeur de croissance ou de macropinocytose en phase végétative, il est incapable de réaliser complètement le cycle de développement. L'absence de Dd-Alix se traduit par un phénotype de développement anormal où morphogenèse et différenciation cellulaire sont fortement perturbées. La caractérisation du mutant nul montre que les cellules de la structure terminale sont majoritairement indifférenciées ou s'engagent dans une voie de différenciation en cellules tiges alors que dans la souche parentale, la majeure partie des cellules s'engagent dans une voie de différenciation en spores. L'analyse d'organismes chimères indique que le défaut est intrinsèque aux cellules *alx* nulles et ne peut pas être corrigé par la présence de cellules parentales. L'étude de l'expression de marqueurs spécifiques du développement confirme que la voie de différenciation préspore/spore est particulièrement affectée et indique également un défaut dans l'établissement et la localisation des sous-populations de cellules prétiges. Dd-Alix est donc indispensable au déroulement du programme de différenciation cellulaire lors du développement multicellulaire induit par la carence nutritive.

### 2. Dd-Alix n'est pas nécessaire à la mort des tiges

A mon arrivée au laboratoire, l'équipe s'intéressait à la dissection du processus de mort cellulaire programmée sur le modèle *Dictyostelium*. La mort cellulaire est manifeste à l'issue du programme de développement dans les cellules différenciées en tiges. Malgré quelques caractéristiques morphologiques comparables à celles des cellules apoptotiques, les cellules tiges meurent par un processus de mort vacuolaire, caspase-indépendant. Elles sont extrêmement vacuolisées et présentent une perméabilité membranaire très tardive (Golstein et al., 2003).

Bien qu'il s'agisse d'une mort non-apoptotique, l'analyse du génome de *Dictyostelium* a révélé la présence d'homologues de protéines connues pour leurs effets pro- ou anti-apoptotiques chez les

mammifères dont le couple ALG-2/Alix. ALG-2 a été décrite comme une protéine pro-apoptotique en réponse à divers stimuli comme Fas ligand et les glucocorticoïdes (Vito et al., 1996). Son rôle apoptotique a cependant été quelque peu controversé par des travaux montrant que, dans des cellules T dépourvues d'ALG-2 par utilisation d'ARN antisens (Lacana et al., 1997) ou issues de souris invalidées pour ce gène (Jang et al., 2002), la mort cellulaire n'est pas bloquée. Deux groupes dont l'équipe de R. Sadoul ont ensuite identifié la protéine Alix comme partenaire d'ALG-2 par approche double-hybride (Missotten et al., 1999 ; Vito et al., 1999). La surexpression d'Alix dans les cellules HeLa favorise l'apoptose induite par le détachement des cellules (anoïkis) (Wu et al., 2002) et la surexpression de son domaine C-terminal qui contient entre autres les sites d'interaction avec ALG-2, protège les cellules HeLa et COS de l'apoptose induite par privation de sérum (Vito et al., 1999), suggérant un rôle plutôt pro-apoptotique de cette protéine. Ces protéines semblaient de bons candidats pour étudier des voies de signalisation conduisant à la mort chez *Dictyostelium* et peut-être communes aux différents types de mort programmée.

Chez *Dictyostelium*, l'invalidation des deux isoformes d'ALG-2 présentes dans le génome est sans conséquence sur le développement multicellulaire (Aubry et al., 2002) et l'obtention de cellules vacuolisées de type tige dans le mutant *alx* nul indique que, si Dd-Alix est impliqué dans la mort cellulaire, il n'agit pas comme effecteur positif de la mort. Des expériences faites en collaboration avec l'équipe de Pierre Golstein (CIML, Marseille) et montrant que le mutant *alx* nul n'est pas affecté dans la succession des étapes menant à la mort des cellules tige confortent cette conclusion. Plus récemment, Alix a été décrit comme inhibant la paraptose induite par l'IGFIR (*Insulin-like growth factor I receptor*) dans des cellules HEK 293T (Sperandio et al., 2004). La paraptose représente un type de mort cellulaire non-apoptotique qui ne nécessite pas l'activation des caspases et qui se traduit notamment par une vacuolisation massive du cytoplasme. Ce rôle d'Alix plutôt dans la protection contre la mort cellulaire que dans l'induction de la mort cellulaire serait d'avantage en accord avec le phénotype du mutant *alx* nul et situerait le fonctionnement de Dd-Alix plutôt dans la population préspore. Toutefois, cette conclusion n'est pas complètement en accord avec l'expression spatiale de Dd-Alix.

### 3. Alix est une protéine multimodulaire dont le domaine coiledcoil est essentiel à la fonction développementale

Comme ses homologues eucaryotes, Dd-Alix est composé de trois domaines : un long domaine Nterminal contenant le domaine Bro1, un domaine prédit en  $\alpha$ -hélice susceptible de former des structures en *coiled-coil* et une région C-terminale riche en résidus prolines. Une approche par surexpression de mutants ponctuels ou tronqués dans la souche *alx* nulle nous a apporté un certain nombre d'éléments d'information quant à la contribution de ces domaines dans le fonctionnement de la protéine : 1) L'instabilité développementale des protéines dépourvues du domaine Bro1 rend impossible l'évaluation de sa contribution dans la fonction de Dd-Alix. Cette instabilité est indicative de l'existence d'une régulation développementale d'Alix par un processus de dégradation, contrôlée par le domaine Bro1. Chez *S. cerevisiae*, la structure des 387 premiers acides aminés (incluant le domaine Bro1) de l'homologue d'Alix, Bro1, a récemment été résolue (Kim et al., 2005).



Figure 46 : Alignement (A) et comparaison des structures in silico des sousdomaines Bro1 des protéines Alix de Saccharomyces (B) de Dictyostelium (C). A . Les alignements de séquences ont été faits grâce au logiciel Clustal W. B et C : Modélisation du domaine Bro1 : La structure a été modélisée par Gérard Klein par homologie en utilisant les coordonnées atomiques de Bro1 de Saccharomyces (PDB1ZB1) à l'aide du logiciel en ligne 3D Jigsaw (http://www.bmm.icnet.uk./~3djigsaw). Les structures sont visualisées à l'aide du logiciel PyMol (http://pymol.sourceforge.net/).

Les auteurs décrivent une structure en boomerang de dimension 30x38x100 Å. La structure totale possède 14 hélices  $\alpha$  et 3 feuillets  $\beta$ . Six de ces hélices ( $\alpha$ 5 et  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7 et  $\alpha$ 8, et  $\alpha$ 9 et  $\alpha$ 10) forment trois motifs TPR (*tetratricopeptide repeat*). Chaque motif TPR est constitué de deux hélices  $\alpha$  antiparallèles d'une douzaine de résidus chacune et dont la succession constitue un domaine TPR qui forme une sorte de superhélice. L'utilisation du logiciel 3D Jigsaw a permis de comparer la structure *in silico* du domaine Bro1 d'Alix de *Dictyostelium* avec celui de *Saccharomyces*. Comme le montre la Fig.46B et C, les deux structures sont extrêmement
proches laissant envisager des modes de fonctionnement et de régulation équivalents. Comment ce domaine intervient dans la stabilisation de Dd-Alix au cours du développement reste à établir.

2) Les essais de complémentation du phénotype développemental *alx* nul ont également montré que le domaine riche en prolines n'est pas indispensable puisque la construction Alix $\Delta$ Pro restaure parfaitement le phénotype sauvage. Ce résultat peut paraître surprenant car un grand nombre des partenaires connus d'Alix, en particulier chez les mammifères, interagissent via ce domaine. C'est le cas de la protéine adaptatrice SETA (Chen et al., 2000), des endophilines (Chatellard-Causse et al., 2002), de la calciprotéine ALG-2 (Trioulier et al., 2004) ou encore de Tsg101 (von Schwedler et al., 2003). Ce résultat pose clairement la question de la nécessité de ces interactions dans la fonction développementale de Dd-Alix. L'absence de phénotype développemental de la souche alg2a/2b nulle chez Dictyostelium suggérait déjà que l'interaction Alix-ALG2, que nous avons confirmée par résonance plasmonique de surface, n'est pas indispensable à la formation des fructifications. L'interaction avec Tsg101 quant à elle n'a été décrite que chez les mammifères et est peu probable chez la Levure et Dictyostelium du fait de l'absence du site d'interaction PSAP (Bowers et al., 2004). Enfin, la recherche d'homologues des protéines SETA et des endophilines dans les banques de Dictyostelium n'a pas permis d'identifier de candidats potentiels. Au vu de ces observations, les partenaires décrits comme interagissant avec le domaine riche en prolines d'Alix chez les mammifères ne semblent pas être des régulateurs envisageables de Dd-Alix.

3) Le fait que la construction AlixNt qui contient le domaine Bro1 ne soit pas capable de restaurer la formation de fructifications dans la souche *alx* nulle, nous indique que ce domaine n'est pas suffisant à la fonction développementale de Dd-Alix et met en évidence l'importance du domaine médian contenant l'hélice  $\alpha$  prédite pour former un « *coiled-coil* » avec des partenaires. Ce domaine « *coiled-coil* » est également important chez *Saccharomyces* puisque l'homologue d'Alix, Bro1, délété de ce domaine, n'est plus capable d'assurer sa fonction dans le trafic endocytaire (Luhtala and Odorizzi, 2004).

4) Suite à l'analyse de la séquence protéique, un certain nombre de sites ont attiré notre attention et fait l'objet de mutations. De façon fort décevante, toutes les constructions testées portant des mutations ponctuelles sont capables de restaurer le phénotype parental. Le site potentiel de phosphorylation sur tyrosine, <sub>307</sub>AKKDNDTIYHD<sub>317</sub> particulièrement conservé chez tous les membres de la famille nous paraissait être un bon candidat pour une régulation de la fonction d'Alix et ce d'autant plus que sa phosphorylation avait été décrite chez le Xénope (Che et al., 1999). Mais les mutations, mimant une phosphorylation constitutive de cette tyrosine ou au contraire une absence de phosphorylation, n'altèrent pas le fonctionnement de la

protéine. Cette tyrosine n'est donc pas impliquée dans la fonction développementale d'Alix. Ceci dit, de façon comparable, chez *S. cerevisiae*, la mutation de cette même tyrosine dans Bro1, ne perturbe pas sa fonction dans la voie du MVB (Kim et al., 2005).

#### 4. Dd-Alix est associé à la voie endocytaire

Une analyse détaillée de la localisation subcellulaire de la protéine par des approches d'immunofluorescence et de fractionnement subcellulaire a conduit à l'identification d'un pool vésiculaire de Dd-Alix vraissemblablement associé à la voie endocytaire. Les résultats de la partie II viendront confirmer cette donnée.

Les constructions Alix $\Delta$ Pro et AlixNt sont également associées à des structures vésiculaires semblables à celles observées pour Alix ce qui positionne le site de ciblage aux vésicules dans la partie N-terminale. Ce résultat a été conforté par les travaux menés par le groupe de S. Emr et qui démontrent que l'association à la voie endocytaire de la protéine Bro1 repose sur son interaction avec la protéine Vps32 (Odorizzi et al., 2003), au niveau du sous-domaine Bro1. Les auteurs qui ont cristallisé le domaine Bro1 ont identifié deux mutations dans la première région hydrophobe qui empêchent l'interaction avec Vps32 : les mutations I<sup>144</sup>D et L<sup>336</sup>D (Kim et al., 2005). La mutation des acides aminés équivalents chez *Dictyostelium* est envisagée pour tester leurs effets sur la localisation de Dd-Alix et sur la complémentation du phénotype *alx* nul.

#### 5. Dd-Alix régule son niveau d'expression

Divers mutants ponctuels et tronqués ont été générés afin de produire des effets dominantsnégatifs sur le développement de la souche KAx-3 mais sans succès. Par contre, certains de ces mutants conduisent à une régulation négative complète de la protéine endogène qui s'opère en partie au stade transcriptionnel. Chez *Saccharomyces*, le deuxième homologue d'Alix, Rim20, participe au processing du facteur de transcription Rim101 (Xu and Mitchell, 2001). Cette même fonction a été décrite pour les homologues d'Alix chez *Candida albicans* (Kullas et al., 2004) et *Aspergillus nidulans* (Vincent et al., 2003). Rim20 interagit avec le facteur de transcription Rim101 et assure grâce à son interaction avec la protéine Vps32, le recrutement de la protéase Rim13 responsable du clivage de Rim101 (Xu and Mitchell, 2001). La mutation D<sup>292</sup>A/N<sup>293</sup>A dans le site consensus de phosphorylation <sup>289</sup>AQR<u>DNEFIY</u><sup>297</sup> de Rim20 empêche le processing de Rim101 malgré la persistance de l'interaction Rim20/Rim101 (Xu and Mitchell, 2001).



Figure 47 : Modèle proposé dans l'article (Xu and Mitchell, 2001) pour le processing du facteur de transcription Rim101. Les auteurs proposent que le couple Rim20-SNF7 (Vps32) serve d'intermédiaire pour promouvoir l'interaction entre le site de clivage de Rim101 et la protéase Rim13.

Chez *Dictyostelium*, l'introduction de la mutation  $D^{310}A/N^{311}A$  (équivalente à la mutation  $D^{292}N^{293}$  chez Rim20) n'entraîne pas de régulation négative de Dd-Alix endogène, de même que la mutation  $Q^{181}E/Q^{183}E$ . D'où le modèle selon lequel Dd-Alix pourrait participer comme chez la Levure à l'activation de facteurs de transcription dont son propre facteur de transcription et réguler de façon indirecte son propre niveau d'expression. Dans ce modèle, le facteur participant au contrôle de l'expression d'Alix et régulé par un tel processing serait un répresseur puisque avec les mutants non fonctionnels pour cette activité, la protéine endogène est présente. Des expériences visant à identifier le facteur de transcription de Dd-Alix grâce à la séquence promotrice du gène *alx* sont à envisager.

Un rôle de Dd-Alix dans le processing de facteurs de transcription ne suffit pas cependant à expliquer le phénotype de développement de la souche alx nulle puisque les mutants Alix $\Delta Pro^{D310A/N311A}_{myc}$  et Alix $\Delta Pro^{Q181E/Q183E}_{myc}$ , non fonctionnels pour la régulation négative, restaurent parfaitement le phénotype sauvage. Comme l'association vésiculaire de Dd-Alix est plus nette dans la phase développementale à un stade où se manifeste le phénotype alx nul, nous avons privilégié l'hypothèse que la fonction développementale de Dd-Alix soit liée au pool vésiculaire.

## Chapitre II

Alix et la machinerie ESCRT

### I. LA MACHINERIE ESCRT CHEZ DICTYOSTELIUM

Pendant la progression de ce travail, une avancée importante a été réalisée chez *S. cerevisiae* qui montre l'implication de la protéine Brol dans le fonctionnement de la machinerie ESCRT le long de la voie endocytaire (Odorizzi et al., 2003). Ce résultat sera confirmé un peu plus tard chez les mammifères (Katoh et al., 2003). Comme nos données indiquaient une association de Dd-Alix avec la voie endocytaire, nous avons poursuivi dans ce sens et avons entamé une caractérisation de la machinerie ESCRT chez *Dictyostelium*.

# 1. Recherche des homologues des composants de la machinerie ESCRT

Une recherche utilisant l'algorithme BLAST 2.0, dans la banque génomique de *Dictyostelium* a permis d'identifier la totalité des homologues des composants de la machinerie ESCRT et des protéines associées (voir Introduction) à partir des protéines humaines ou de Levure (Tableau 18 ). Concernant l'homologue de la protéine Vta1, le gène se situe sur la partie dupliquée du chromosome 2 de *Dictyostelium*, ce qui explique les deux numéros d'accession. Mais compte-tenu du caractère récent de la duplication, les deux séquences sont identiques.

Levure	Dictyostelium
ESCRT I Vps23 Vps28 Vps37	Dd-Tsg101 <i>DDB0218848</i> Dd-Vps28 <i>DDB0186436</i> Dd-Vps37 <i>DDB0190314</i>
ESCRT II Vps22/Snf8 Vps25 Vps36	Dd-Vps22 <i>DDB0185415</i> Dd-Vps25 <i>DDB0189483</i> Dd-Vps36 <i>DDB0205116</i>
ESCRT III Vps2/Did4 Vps20 Vps24 Vps32/Snf7	Dd-Vps2 <i>DDB0188723</i> Dd-Vps20 <i>DDB0218879</i> Dd-Vps24 <i>DDB0186182</i> Dd-Vps32 <i>DDB0167295</i>
Autres : Vps4 Brol Vps27 Vps60 Vps46/Did2 Vps44 Vta1	Dd-Vps4 DDB0185960 Dd-Alix DDB0 185177 ? DdVps60/Chmp5 DDB0187725 Dd-Did2 DDB0191317 Dd-Vps44 DDB0231789 Dd-Vta1 DDB0 216853 ou DDB0 215061

Tableau 18 : Identification des homologues amibiens des composants de la machinerie ESCRT.

Par contre, nous n'avons pas réussi à identifier un homologue de la protéine Vps27/Hrs, ni de façon certaine l'enzyme de déubiquitination Doa4 car plusieurs enzymes de déubiquitination sont présentes dans le génome. Concernant Vps27, la seule protéine qui posséde un domaine VHS dans les banques de *Dictyostelium* correspond plutôt à un homologue de la famille Tom1, elle-aussi récemment impliquée dans la voie du MVB (Puertollano, 2005). Cette protéine est étudiée par le laboratoire de F. Letourneur à l'IBCP de Lyon.

#### 2. Description des protéines Dd-Tsg101, Dd-Vps4 et Dd-Vps32

Au cours d'un criblage double-hybride réalisé par l'équipe de R. Sadoul, la protéine Vps32 est identifiée comme partenaire potentiel d'Alix. Cette interaction sera confirmée peu de temps après par Katoh et coll. (Katoh et al., 2003) et montrée comme nécessaire au recrutement d'Alix dans cette machinerie ESCRT (Odorizzi et al., 2003). En plus de Vps32, les protéines Tsg101 et Vps4 sont également décrites comme des partenaires d'Alix (Gavin et al., 2002 ; Strack et al., 2003 ; von Schwedler et al., 2003 ). C'est dans ce contexte que nous avons choisi de focaliser nos efforts sur ces trois protéines chez *Dictyostelium*.

#### a) La protéine Dd-Tsg101

Le gène *Dd-Tsg101* est situé sur le chromosome 4. Il est constitué de deux exons séparés par un intron unique (contrairement aux prédictions de la banque Dictybase) de 125 nucléotides en position 209 de l'ADN génomique. Nous avons pu déterminer par RT-PCR que le deuxième intron prédit correspond en fait à une partie de la séquence codante.

*Dd-Tsg101* code pour une protéine de 495 acides aminés, de masse moléculaire calculée de 55 kDa. Comme ses homologues, la protéine présente un domaine UEV-like (aa 38-230) et un domaine susceptible de participer à une torsade d'hélices (aa 338-389) inclus dans un domaine Tsg101 (aa 41-466) (PFAM :PF05743). Une région riche en résidus prolines plus longue que chez les autres organismes est présente entre le domaine UEV-like et la région coiled-coil (Fig.48). L'extrémité C-terminale, décrite comme la S-box, est également bien. Sur la protéine entière, Dd-Tsg101 partage près de 18% d'identités et 40% d'homologies avec de Levure et près de 21% d'identités et 40% d'homologies avec la protéine humaine (Fig.49A).



**Figure 48 : Représentation schématique de la protéine Dd-Tsg101**. La protéine Tsg101 est constituée d'une région N-terminale contenant le domaine UEV, une région centrale riche en prolines (Pro) suivi d'un domaine susceptible de former une structure en torsade d'hélices (Coiled-coil, CC) et une région C-terminale contenant la S-box.

Une étude plus détaillée du domaine UEV-like a été réalisée. Chez Vps23 et h-Tsg101, il a été montré que ce domaine est capable de fixer l'ubiquitine. Par contre, l'absence de résidu cystéine dans le site catalytique du domaine UEV-like empêche la formation d'une liaison covalente avec l'ubiquitine, d'où l'incapacité de ces protéines à catalyser une réaction d'ubiquitination comme le font les enzymes E2 qui contiennent un UEV canonique. Chez *Dictyostelium*, la cystéine est également absente et remplacée par un résidu tyrosine. La structure du domaine UEV de h-Tsg101 a été utilisée pour tenter de modéliser l'extrémité N-terminale de Dd-Tsg101. Dd-Tsg101 se superpose correctement à la structure de la protéine humaine à l'exception des feuillets ß1 et ß2 qui forment une structure « en épingle à cheveux» permettant la fixation de l'ubiquitine (Fig.49B). Cette observation pourrait expliquer nos échecs dans les expériences visant à mettre en évidence une liaison de l'ubiquitine. Il faut également noter que l'affinité de ce domaine UEV pour l'ubiquitine est très faible, entre 100 et 500 µM pour la monoubiquitine (cf Tableau 2 de l'Introduction).



**Figure 49 : La protéine Tsg101 chez Dictyostelium . A.** Alignement de la séquence protéique de Dd-Tsg101 avec les protéines Tsg101 humaine et de Levure : Les alignements de séquences ont été faits grâce au logiciel Clustal W. **B.** *Comparaison des structures in silico des sous-domaines UEV des protéines Tsg101 de Dictyostelium (3) et Tsg101 humaine (1 et 2)* : La structure a été modélisée par Gérard Klein par homologie en utilisant les coordonnées atomiques du domaine UEV de la protéine Tsg101 humaine à l'aide du logiciel en ligne 3D Jigsaw (<u>http://www.bmm.icnet.uk./~3djigsaw</u>). Les structures sont visualisées à l'aide du logiciel PyMol (http://pymol.sourceforge.net/).

#### b) La protéine Dd-Vps4

Le gène *vps4*, situé sur le chromosome 4, contient deux introns de 102 et 123 nucléotides en position 138 et 625 de l'ADN génomique. *Dd-vps4* code pour une protéine de 444 acides aminés, d'une masse moléculaire calculée de 49,3 kDa et de pI théorique de 7,0. La protéine partage plus de 57% d'identités et 75% d'homologies avec la protéine de Levure (Fig.50B) et près de 60% d'identités et 77% d'homologies avec la protéine Vps4B/SKD1-B de Mammifères. Elle présente une organisation classique avec un domaine MIT (*microtubule interacting and trafficking domain*, aa 44-72) (PFAM : PF04212) dans la partie N-terminale et une région médiane très homologue au domaine catalytique des ATPases de type AAA (aa 170-354) (PFAM : PF00004) (Fig.50A).



**Figure 50 : La protéine Vps4 chez Dictyostelium. A.** Représentation schématique de la protéine : La protéine Vps4 est constituée d'un domaine MIT en N-terminal et d'un domaine ATPasique contenant un site de fixation et un site d'hydrolyse de l'ATP **B.** Alignement de la séquence protéique de Dd-Vps4 avec les protéines Vps4 humaine (Vps4B/SKD1-B) et Vps4 de levure : Les alignements de séquences ont été faits grâce au logiciel Clustal W.

#### c) La protéine Dd-Vps32

Le gène *Dd-vps32* consiste en trois exons et deux introns de 105 et 102 nucléotides en position 253 et 671 de l'ADN génomique. Il est situé sur le chromosome 2.

*Dd-vps32* code pour une protéine de 215 acides aminés, de masse moléculaire théorique de 23,8 kDa. Le logiciel de recherche de motifs SMART indique la présence d'un domaine SNF7 (aa 15 à 189, domaine PFAM : PF03357) ainsi que la présence de plusieurs domaines susceptibles de former des torsades d'hélices (aa 11-90 et aa 147-174) (Fig.51A). Comme ses homologues chez la Levure et les mammifères, la protéine est caractérisée par une répartition hétérogène de ses acides aminés chargés résultant en une extrémité N-terminale basique (aa 1 à 117, pI-10) et une extrémité C-terminale acide (aa 118 à 215, pI - 4).

Trois homologues de cette protéine sont décrits chez les mammifères : Chmp4 A, B et C (Katoh et al., 2004a). C'est la protéine Chmp4B qui est décrite pour être le partenaire privilégié d'Alix chez les mammifères (Katoh et al., 2004a). L'alignement de la séquence de Dd-Vps32 avec la protéine Snf7 de Levure révèle près de 28% d'identités et 61% d'homologies et 37% d'identités et 63% d'homologies avec CHMP4B (Fig.51B)



**Figure 51 : La protéine Vps32 chez Dictyostelium. A.** *Représentation schématique de la protéine* : Dd-Vps32 contient plusieurs domaines coiled-coil et une répartition hétérogène des acides aminés chargés. **B.** *Alignement de la séquence protéique de Dd-Vps32 avec les protéines Vps32 humaine (CHMP4B) et Vps 32 (SNF7) de levure* : Les alignements de séquences ont été faits grâce au logiciel Clustal W.

Au cours de notre recherche, deux autres protéines ont été initialement répertoriées comme des homologues de Dd-Vps32 : DDB0187725 et DDB0169062. Une étude plus approfondie de ces séquences à la lumière des caractérisations récentes des protéines de la famille Snf7 nous indique que DDB0187725 serait plutôt l'homologue de Vps60 et DDB0169062 un homologue de la protéine CHMP7 de rôle inconnu.

### 3. Développement d'anticorps spécifiques de Dd-Tsg101, Dd-Vps4 et Dd-Vps32

Pour envisager l'étude des protéines endogènes Dd-Tsg101, Dd-Vps4 et Dd-Vps32, nous avons développé des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines.

Les protéines Vps4 et Vps32 ont été exprimées sous forme de fusion avec la GST alors que la protéine Tsg101 a été exprimée avec une étiquette poly-histidine en position N-terminale (voir Annexe). Les inductions ont été réalisées en bactéries BL21-DE3 en présence de 1 mM IPTG à 37°C. Dans ces conditions, les protéines GST-Vps4 et GST-Vps32 sont essentiellement retrouvées dans les corps d'inclusion. C'est donc sous cette forme que les protéines ont été purifiées puis utilisées pour l'immunisation. La protéine His-Tsg101 a été purifiée à partir de la fraction soluble sur colonne de Ni-NTA.

En ce qui concerne le sérum  $\alpha$ -Tsg101, sa spécificité a été testée par Western-blot sur des échantillons protéiques provenant de la souche parentale KAx-3 ou de la souche *tsg101* nulle (voir paragraphe II-2c). Dilué au 1/500, le sérum brut reconnait effectivement la protéine Tsg101 endogène (indiquée par une astérisque) mais également un certain nombre d'autres protéines, en particulier une protéine de mobilité électrophorétique très proche de celle de Tsg101. Afin d'éliminer la reconnaissance non spécifique des autres protéines, le sérum brut a été purifié sur une colonne de Sepharose/GST-Tsg101. Après purification et concentration de l'anticorps, Tsg101 est la bande majoritairement reconnue par  $\alpha$ -Tsg101 (Fig.52A).

Pour les anticorps  $\alpha$ -Vps4 et  $\alpha$ -Vps32, les sérums bruts ont été testés par Western-blot sur des extraits protéiques issus de la souche parentale KAx-3 et les surexpresseurs KAx-3/Vps32<sub>myc</sub> et KAx-3/Vps4<sub>myc</sub> puisque nous ne disposons pas à ce jour des souches *vps32* et *vps4* nulles (voir Chap. II, paragraphe II-2). A une dilution de 1/1000, les deux sérums reconnaissent chacun une protéine unique à la taille attendue d'environ 50 kDa pour Vps4 (Fig.52C) et une taille d'environ 35 kDa pour Vps32 contre 24 kDa de masse théorique (Fig.52B). Une telle différence dans la mobilité électrophorétique observée de Vps32 par rapport à celle attendue a également été décrite pour les homologues de Dd-Vps32 et attribuée à sa composition en acides aminés chargés. Dans le surexpresseur KAx-3/Vps4<sub>myc</sub>, l'anticorps  $\alpha$ -Vps4 reconnait une bande supplémentaire, Vps4<sub>myc</sub>, légèrement plus haute que Vps4 endogène du fait de l'addition de l'étiquette myc. De façon remarquable, dans le surexpresseur KAx-3/Vps32 endogène est quasi absente de l'extrait, ce qui n'est pas sans rappeler la régulation négative d'Alix dans le surexpresseur KAx-3/Alix<sub>myc</sub>. Cependant, cet aspect n'a pas été étudié de façon plus approfondie.



52 : Test Figure des anticorps a-Tsg101, a-Vps32 α-Vps4. Des extraits et protéiques totaux végétatifs réalisés sur la souche parentale KAx-3, sur la souche invalidée pour *tsg101* ainsi que sur la souche KAx-3 surexprimant soit la protéine Vps4 soit la protéine Vps32 ont été analysés par gel migration sur un d'acrylamide 12%, transfert sur membrane Immobilon et immunodétection à l'aide du sérum purifié  $\alpha$ -tsg101 (A) et des sérums  $\alpha$ -Vps32 (B) et  $\alpha$ -Vps4 (C) dilués au 1/1000.

Les anticorps ont été utilisés pour suivre le profil d'expression des protéines Dd-Tsg101, Dd-Vps4 et Dd-Vps32 au cours du cycle de développement. Des extraits protéiques ont été réalisés sur la souche KAx-3 en développement toutes les 4 heures depuis le stade végétatif jusqu'à la formation de la fructification. Comme le montre la Figure 53, toutes les protéines sont présentes en phase végétative et sont maintenues à un niveau relativement constant tout au long du développement multicellulaire.



Figure 53 : Etude du pattern d'expression temporelle des protéines Tsg101, Vps32 et Vps4 par immunodétection. Des extraits protéiques totaux réalisés sur la souche KAx-3 toutes les 4 heures depuis le stade végétatif jusqu'à la formation de la fructification ont été analysés par migration sur un gel d'acrylamide12%, transfert sur membrane Immobilon puis immunodétection à l'aide des anticorps  $\alpha$  -Tsg101,  $\alpha\text{-Vps32}$  et  $\alpha$  -Vps4 dilués au 1/1000.

### **II.** ALIX FONCTIONNE DANS LA VOIE ENDOCYTAIRE EN ASSOCIATION AVEC CERTAINS DES COMPOSANTS DE LA MACHINERIE ESCRT

#### 1. Analyse des vésicules Alix-positives

#### a) Vps32 et Vps4 sont associés à la voie endocytaire

Les protéines Tsg101, Vps32 et Vps4 ayant été décrites comme fonctionnant au sein de la machinerie ESCRT pour réguler le trafic de protéines membranaires, nous avons tout d'abord cherché à caractériser plus précisément la localisation de ces composants chez *Dictyostelium*. L'anticorps  $\alpha$ -Tsg101 a été obtenu très tardivement au cours de ce travail et n'a donc pas permis une étude approfondie de la protéine.

#### • Vps32 :

Dans les cellules KAx-3 en phase végétative, l'anticorps  $\alpha$ -Vps32 donne un fort immunomarquage cytoplasmique suggérant une fraction cytosolique importante. Il révèle également une association de Vps32 à de nombreuses vésicules de petite taille disséminées dans le cytoplasme (Fig.54). Cette association vésiculaire est maintenue en développement. Vps32 co-localise alors très nettement avec Alix dans la souche *alx*<sup>-</sup>/Alix<sub>myc</sub>. Cependant, il faut noter que certaines des vésicules ne sont positives que pour Alix ou pour Vps32. D'un point de vue technique, il faut noter que l'anticorps  $\alpha$ -Vps32 donne un marquage plus net avec une fixation des cellules en méthanol plutôt qu'en PFA. Par contre, pour les études de co-localisation, les cellules sont fixées en PFA car les autres anticorps donnent un meilleur marquage ainsi.



Figure 54 : Etude de la localisation subcellulaire de la protéine Dd-Vps32. par immunofluorescence. Les cellules KAx-3 au stade végétatif sont fixées et perméabilisées en méthanol. La protéine est révélée par l'anticorps secondaire anti-lapin couplé au FITC, après une première incubation avec l'anticorps  $\alpha$ -Vps32 utilisé au 1/500. Les cellules *alx* nulles surexprimant Alix<sub>myc</sub> sont fixées et perméabilisées en présence de PFA 4% après 12 heures en tampon Na/K phosphate. La protéine Vps32 est révélée par l'anticorps secondaire anti-lapin couplé au Cy3 (1/800), après une première incubation avec l'anticorps  $\alpha$ -Vps32 utilisé au 1/500. Les secondaire anti-lapin couplé au FITC (1/200) après une première incubation avec l'anticorps  $\alpha$ -myc utilisé au 1/500. Les noyaux sont marqués au DAPI. Les cellules sont observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x. Les flèches indiquent les vésicules positives uniquement pour Alix ou Vps32.

Cette co-localisation est retrouvée sur gradient de Percoll (Fig.55A, conditions végétatives). La protéine Vps32 suit une distribution bimodale similaire à celle des marqueurs endocytaires Vamp7 et phosphatase acide, suggérant que Vps32 est présent sur des compartiments endosomaux (fractions 8-11) où elle co-localise avec Alix (environ 80% de la fraction associée aux membranes) mais également, dans une moindre mesure néanmoins, sur des compartiments plus tardifs (fractions 2-4) (environ 20%). Malgré l'absence de Vps32 dans les fractions solubles du gradient, nous avons pu montrer, par des expériences de fractionnement subcellulaire, que la majeure partie de la protéine (plus de 95%) est présente dans le cytosol (Fig.56). La protéine Vps32 soluble est extrêmement sensible à la protéolyse, notamment dans les conditions du gradient. Sur un gradient réalisé à partir de cellules développées, Vps32 est retrouvée exclusivement au niveau des fractions endosomales 13-14 dans lesquelles Alix est également enrichie (Fig.55B).

#### Vps4 :

Dans les expériences d'immunofluorescence, l'anticorps donne un signal très faible qui ne permet pas de définir avec certitude la localisation subcellulaire de Vps4. Sur gradient de Percoll en revanche, il est clair que, à coté d'un pool majoritairement soluble, une partie de Vps4 est associée à des compartiments intracellulaires : dans les cellules en phase végétative, Vps4 est présent dans les fractions 8-11 et dans les cellules développées, dans les fractions 13-14 qui contiennent également Vps32 et Alix.



Figure 55 : Distribution des protéines Vps32 et Vps4 sur un gradient de Percoll 24% réalisé sur la souche KAx-3 au stade végétatif (A) ou après 6h de développement sur une gélose de Na/K posphate (B). Un surnageant post-nucléaire de cellules KAx-3 est déposé sur une solution de Percoll à 24%. Après formation du gradient par centrifugation, celui-ci est élué par des fractions de 1,7 ml (A) et 1,4 ml (B). Pour chaque fraction, les activités phosphatase acide et alcaline sont testées ainsi que la fluorescence du FITC-dextran. Les extraits protéiques issus de chaque fraction sont analysés avec les anticorps anti-Vps32 et anti-Vps4 utilisés au 1/1000, (pour rappel, les distributions d'Alix et de Vamp7 sont indiquées).

Des expériences de fractionnement subcellulaire montrent que l'invalidation d'Alix n'affecte pas la répartition soluble/membrane des protéines Vps32 et Vps4, suggérant que l'absence d'Alix n'altère pas la dynamique d'association et de dissociation de la machinerie ESCRT (Fig.56).



Figure 56 : Etude par fractionnement subcellulaire des effets de la mutation *alx* nulle sur la localisation des protéines Vps32 et Vps4. Les cellules KAx-3 et *alx* nulles au stade végétatif sont cassées à l'aide de billes de verre. Le surnageant post-nucléaire (T) est soumis à une ultracentrifgation de 30 minutes à 100 000xg pour séparer la fraction soluble (S100) de la fraction membranaire (P100). Les extraits protéiques issus de chacune des fractions sont analysés par Western-Blot avec les anticorps  $\alpha$ -Vps4 et  $\alpha$ -Vps32 dilués au 1/1000.



A l'heure actuelle, le signal décrit comme permettant le ciblage des protéines vers la voie MVB-dépendante est l'ubiquitine. Les protéines cibles sont dé-ubiquitinées au niveau du MVB juste avant leur internalisation dans les vésicules intraluminales sous l'action de l'hydrolase Doa4 (Dupre and Haguenauer-Tsapis, 2001). Nous avons donc cherché à savoir si des protéines ubiquitinées étaient concentrées au niveau des compartiments Alix-positifs.

Les protéines ubiquitinées peuvent être suivies par immunomarquage avec l'anticorps FK2 (Tébu) qui reconnaît les formes mono- et polyubiquitinées mais pas l'ubiquitine libre. Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur les cellules  $alx^{-}/Alix_{myc}$  en situation développée. Dans ces conditions, le FK2 marque des vésicules dispersées dans le cytoplasme dont la majorité est également Alix-positives (Fig.57).

alx ko + Alix<sub>my</sub>



**Figure 57 : Colocalisation des protéines Alix et FK2.** Les cellules *alx* '/Alix<sub>myc</sub> sont fixées et perméabilisées en présence de PFA 4% et de 0,2% Triton X-100 après 12 heures en tampon Na/K phosphate. Les protéines ubiquitinées sont révélées par l'anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC, après une première incubation avec l'anticorps FK2 utilisé au 1/500. La protéine Alix est révélée par l'anticorps secondaire anti-lapin marqué au Cy3 après une première incubation avec l'anticorps  $\alpha$ -alix. Les noyaux sont marqués au DAPI. Les cellules sont observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x. Les flèches indiquent les vésicules uniquement FK2 positives.

Cette première caractérisation des protéines endogènes a permis de montrer que les compartiments endocytaires Alix-positifs contiennent des protéines ubiquitinées et des composants de la machinerie ESCRT, Vps32 et sans doute l'ATPase Vps4. La nature des protéines ubiquitinées reste à déterminer. Il est tentant néanmoins de penser qu'il s'agit de protéines membranaires ciblées vers la voie de dégradation MVB-dépendante. Ces résultats montrent qu'Alix est associé à la machinerie ESCRT chez *Dictyostelium*.

# 2. L'invalidation d'Alix conduit à une modification du profil protéique de la membrane plasmique

Si Alix est impliqué, en association avec la machinerie ESCRT, dans le trafic des protéines de la membrane plasmique, on pouvait s'attendre à ce que son invalidation se traduise par une modification du profil protéique de la surface cellulaire. Une approche générale qui nous permettait de visualiser un tel effet a été de marquer les protéines de la surface cellulaire avec un analogue de la biotine et de comparer les profil de biotinylation de la souche parentale et de la souche *alx* nulle à différents temps de développement. Afin optimiser le marquage des protéines membranaires, nous nous sommes affranchis de la morphogenèse qui nous aurait obligé à désaggréger les cellules avant le marquage en réalisant l'expérience en suspension liquide. Dans ce cas, les différentes étapes du développement peuvent être mimées par ajout exogène d'AMPc. Pendant 4 heures, 30 nM d'AMPc sont ajoutés sous forme de pulses toutes les 6 minutes ce qui permet de mimer l'étape d'agrégation puis les cellules sont stimulées avec une forte concentration d'AMPc (300 µM) toutes les deux heures afin d'induire la différenciation cellulaire.



Figure 58 : Comparaison des profils protéiques de la surface cellulaire entre la souche parentale JH10 et la souche alx nulle à différents temps de développement. Les cellules sont resuspendues dans un tampon de carence puis pulsées pendant 4 heures avec 30 nM d'AMPc (T4). Après cette période, les cellules sont maintenues dans ce milieu puis sont stimulées par addition de 300 µM d'AMPc toutes les deux heures. A chaque temps (T4, T4+2 et T4+4), 10<sup>7</sup> cellules sont prélevées et incubées avec un analogue de la biotine (sulfo-NHS-LC-biotin) pendant 15 minutes dans de la glace. La réaction de biotinylation est stoppée avec des lavages en utilisant un tampon 100 mM glycine. Les cellules sont ensuite lysées avec du tampon de Laemmli et le profil de biotinylation est analysé par Western-blot en utilisant de la streptavidine-HRP pour détecter la biotine. L'équivalent de 3.10<sup>4</sup> cellules sont testées par puit. Le puit contrôle (CTL) révèle la présence d'une protéine de 80 kDa (eb) biotinylée de façon endogène (Gotthardt et al., 2002). Cette protéine a été utilisée comme contrôle de la quantité de protéines déposée par puit. Les signaux correspondants aux bandes a, b et c sont intégrés par rapport à la totalité du puit en utilisant le programme ImageJ. Les résultats sont présentés sous la forme d'histogrammes (blancs pour la souche parentale et noirs pour la souche alx nulle) pour les différents temps de développement.

Les profils protéiques observés sont assez comparables entre les deux souches. Cependant, des différences existent, notamment au niveau de trois protéines (bandes a, b et c) qui sont maintenues à un niveau constant voir augmenté dans le mutant *alx* nul alors que dans la souche parentale, ces protéines tendent à diminuer. Cette différence montre bien que l'absence d'Alix se traduit par une modification du profil protéique de la surface cellulaire compatible avec un rôle d'Alix dans le trafic de protéines membranaires.

#### 3. Apport des mutants ESCRT

Nous avons cherché à générer des mutants (par invalidation, tronquation, mutants ponctuels...) de ces différents composants. Dans un souci de clarté, les différentes contructions utilisées ont été mises en Annexe. Il faut noter que concernant les surexpresseurs Vps32 et Vps4, malgré l'utilisation du promoteur p*Act15*, les protéines sont maintenues à un niveau très proche du niveau endogène.

#### a) Le compartiment E235Q : un compartiment E-like

La protéine Vps4 est l'ATPase (type AAA) qui assure la dissociation de la machinerie ESCRT de la membrane du MVB. Chez la Levure, l'invalidation de Vps4 conduit à la formation d'un compartiment E. Ce compartiment présente une morphologie anormale multilamellaire et le trafic des protéines ciblées vers la voie MVB-dépendante est fortement altéré (voir Introduction). Plusieurs mutations ponctuelles ont également été décrites chez la Levure et confirmées chez les Mammifères comme étant capables de générer un compartiment E par effet dominant-négatif : la mutation K/A dans le site de fixation de l'ATP (séquence de Walker A) et E/Q dans le site d'hydrolyse de l'ATP (séquence de Walker B). Un même effet dominant-négatif a également été obtenu chez la Levure par surexpression massive de la protéine sauvage.

#### (1) Invalidation de Vps4 :

Plusieurs tentatives d'obtention d'un mutant *vps4* nul ont été entreprises sans succès. Face à ces échecs, la contruction va être modifiée de façon à introduire des zones d'ADN génomique plus propices pour la recombinaison homologue au cas où la partie utilisée n'aurait pas été optimale pour l'intégration dans le génome. Néanmoins, nous favorisons l'hypothèse d'une létalité liée à l'invalidation de la protéine. Une approche par ARNi ou shARN (*short hairpin RNA*) en conditions inductibles devrait permettre de confirmer cette létalité.

#### (2) Surexpression de Vps4 :

Dans un premier temps, nous avons généré trois constructions de surexpression chez *Dictyostelium* : Vps4<sub>myc</sub>, Vps4<sup>E235Q</sup><sub>myc</sub> et Vps4<sup>K181A</sup><sub>myc</sub>, qui portent les mutations équivalentes aux mutations ponctuelles K<sup>179</sup>A et E<sup>233</sup>Q chez *S. cerevisiae*. Ces constructions ont été placées sous le contrôle du promoteur constitutif de p*Act15* (Vecteur Exp4+, G418<sup>R</sup>). Après sélection en présence de généticine, seule la souche KAx-3/Vps4<sub>myc</sub> a pu être obtenue. La toxicité apparente des constructions Vps4<sup>E235Q</sup><sub>myc</sub> et Vps4<sup>K181A</sup><sub>myc</sub> est à mettre en parallèle avec notre incapacité à générer des mutants invalidés dans le gène *vps4*. La formation d'un compartiment E-like soit par surexpression des mutants Vps4<sup>E235Q</sup><sub>myc</sub> et Vps4<sup>K181A</sup><sub>myc</sub> soit par invalidation génique pourrait être létale.

La souche KAx-3/Vps4<sub>myc</sub> est viable. La surexpression de Vps4<sub>myc</sub> se traduit donc par un effet différent des formes mutées. Le niveau d'expression de la protéine étiquetée est comparable à celui de la protéine endogène, et il est vraisemblable que la protéine se comporte comme la protéine endogène contrairement à l'effet dominant-négatif décrit chez la Levure où le niveau d'expression est près de 10 fois supérieur au niveau endogène. Il faut noter néanmoins, que dans cette souche KAx-3/Vps4<sub>myc</sub>, la fraction membranaire de Vps4<sub>myc</sub> et de Vps4 endogène est plus importante que dans la souche parentale puisqu'elle représente presque la moitié du pool total Vps4/Vps4<sub>myc</sub>. Malgré l'augmentation

du pool membranaire, le suivi de la répartition de  $Vps4_{myc}$  par immunofluorescence ne révèle qu'un très fort marquage cytosolique qui pourrait cependant masquer une association vésiculaire.



Figure 59 : Comparaison de la répartition des protéines Alix, Vps32 et Vps4 dans la souche KAx-3/Vps4<sub>m y c</sub>, après un fractionnement à 100 000xg. Les cellules sont cassées, au stade végétatif ou après 12 heures sur une gélose de Na/K phosphate, grâce à des billes de verre puis le surnageant post-nucléaire (T) est soumis à une ultracentrifgation de 30 minutes à 100 000g qui sépare la fraction soluble (S100) de la fraction membranaire (P100). Les extraits protéiques de chaque fraction sont analysés grâce aux anticorps  $\alpha$ -Alix,  $\alpha$ -Vps32 et  $\alpha$ -Vps4 utilisés au 1/1000.

Afin de contourner le problème de la létalité des constructions Vps4<sup>E235Q</sup><sub>myc</sub> et Vps4<sup>K181A</sup><sub>myc</sub>, nous avons opté pour un promoteur non plus constitutif mais développemental. La construction Vps4<sup>E235Q</sup> a été transférée dans le vecteur d'expression p*CsA*-GFP (p*CsA*:GFP-Vps4<sup>E235Q</sup>) qui permet (1) l'expression de la protéine sous le contrôle du promoteur du gène *contact site A (csa)* activé pendant la phase d'agrégation et (2) l'addition d'une étiquette GFP permettant le suivi de l'expression protéique *in vivo*. La même construction a été réalisée avec la protéine parentale : p*CsA*:GFP-Vps4.

La cinétique d'induction des protéines p*CsA*:GFP-Vps4 et p*CsA*:GFP-Vps4<sup>E235Q</sup> a été suivie par Western-blot au cours du développement (Fig.60, panel A). Dès 6h de développement (agrégation), les deux protéines sont décelables dans les extraits protéiques avec l'anticorps  $\alpha$ -VPS4 ou  $\alpha$ -GFP (Roche) avec un niveau d'expression maximal vers 12h. Malgré l'arrêt de l'induction du promoteur p*CsA* après la phase d'agrégation (8-10h), les protéines restent présentes pendant la quasitotalité du développement. Grâce au promoteur p*CsA*, il a donc été possible d'obtenir des mutants surexprimant la construction Vps4<sup>E235Q</sup>, un résultat qui conforte notre hypothèse d'une létalité végétative.



**Figure 60 : Etude de l'induction de l'expression des protéines GFP-Vps4 et GFP-Vps4**<sup>E233Q</sup> *in vivo.* **A.** *Expression des protéines de fusion* : Les cellules sont déposées sur une gélose de Na/Kphosphate et des extraits protéiques sont faits à différents temps de développement et testés par Western blot avec l'anticorps anti-Vps4 dilué au 1/1000. **B.** *Etude de la localisation subcellulaire in vivo* : Les cellules KAx-3 surexprimant la construction GFP-Vps4 ou GFP-Vps4<sup>E233Q</sup> sont étalées sur une gélose de Na/K phosphate. Après une nuit, les cellules sont déposées dans des puits contenant du tampon Na/K phosphate et observées au microscope à l'aide d'un filtre GFP. **C.** *Colocalisation des protéines GFP-Vps4/Vps4<sup>E233Q</sup>, Alix, Vps32 et de protéines ubiquitinées* : Après 12 heures de développement sur une gélose de tampon Na/K phosphate, les cellules KAx-3 + GFP-Vps4/Vps4<sup>E233Q</sup> sont fixées en PFA4% et perméabilisées en 0,2% Triton X-100. Les protéines Alix et Vps32 sont révélées par l'ajout des anticorps au 1/500 anti-Alix et anti-Vps32 puis de l'anticorps FK2 utilisé au 1/500 puis l'anticorps secondaire antisouris marqué au Cy3. La fluorescence intrinsèque des protéines GFP est maintenue par ce protocole de fixation, les protéines de fusion sont donc observées directement avec un filtre GFP.

L'analyse de la localisation subcellulaire des protéines a donc été réalisée sur des cellules en phase d'agrégation. D'après l'observation des cellules au microscope (filtre GFP), la protéine pCsA:GFP-Vps4 est exclusivement cytosolique, une localisation identique à la protéine pAct15:Vps4<sub>myc</sub>. La protéine pCsA:GFP-Vps4<sup>E235Q</sup>, en revanche, est associée à des structures vésiculaires très nettes de taille et en nombre variables souvent regroupées au centre de la cellule (Fig. 60, panel B). Ces vésicules accumulent également les protéines Alix et Vps32 ainsi que des protéines ubiquitinées révélées par l'anticorps FK2 (Fig.60, panel C). L'introduction de la mutation E<sup>235</sup>Q dans la protéine Vps4 conduit donc à une modification de la répartition de la protéine avec un enrichissement au niveau de vésicules cytoplasmiques. Ces vésicules E<sup>235</sup>Q sont très différentes en taille et en nombre des compartiments Alix/Vps32 positifs décrits dans la souche KAx-3/Alix<sub>myc</sub>. La mutation E235Q a été décrite pour inactiver l'activité d'hydrolyse de l'ATP de Vps4 (Babst et al., 1997) et il est attendu qu'une telle mutation chez Dd-Vps4, comme chez la Levure, induise la formation d'un compartiment de type E. A l'heure actuelle, le manque de données morphologiques et de marqueurs spécifiques ne nous permet pas d'affirmer que le compartiment E<sup>235</sup>Q observé chez *Dictyostelium* correspond vraiment à un compartiment E. De ce fait, nous avons appelé ce compartiment  $E^{235}Q$ , un compartiment E-like.

Nous avons cherché à suivre l'évolution de la morphologie du compartiment  $E^{235}Q$  au fur et à mesure de l'induction de Vps4<sup>E235Q</sup>. Au début de l'induction, les structures Vps4<sup>E235Q</sup> positives sont de petite taille. Avec le temps, les vésicules acquièrent une taille plus importante qui permet la visualisation de la lumière vésiculaire. La protéine reste confinée sur le pourtour de la vésicule. Le marquage devient ensuite moins net alors que les cellules s'engagent dans la morphogenèse, sans doute une conséquence de la différentiation progressive des cellules et l'acquisition d'un morphotype spécifique dès la phase post-agrégation. Il faut noter que l'induction de p*CsA*:GFP-Vps4 et p*CsA*:GFP-Vps4<sup>E235Q</sup> ne s'accompagne d'aucun phénotype développemental anormal de l'organisme multicellulaire. L'absence de phénotype mutant pourrait s'expliquer par le fait que la protéine Vps4<sup>E235Q</sup> n'est exprimée qu'à partir de l'agrégation.

#### b) Le compartiment Vps32

Comme pour Vps4 et tous les membres de la machinerie ESCRT, l'invalidation de *vps32* a été décrite comme conduisant à un compartiment E chez la Levure. Chez *Dictyostelium*, il a été impossible d'obtenir un mutant *vps32* nul malgré de multiples essais. D'autres constructions d'invalidation sont en cours mais, comme pour Vps4, il est possible que Vps32 soit indispensable à la vie végétative. Nous avons donc opté pour une stratégie de surexpression.

#### (1) Le compartiment Vps32 : caractérisation

La construction de surexpression de Vps32 a été placée sous le contrôle du promoteur p*Act15* (vecteur Exp4<sup>+</sup>, G418<sup>R</sup>) et étiquetée avec un épitope *myc*. Les transformants sont viables avec une vitesse de croissance comparable à la souche parentale. Comme mentionné précédemment, la surexpression de Vps32<sub>myc</sub> dans la souche parentale KAx-3 se traduit par une diminution très nette de la quantité de protéine endogène Vps32 (voir Fig.52A). La souche contient environ deux fois le niveau parental en protéine Vps32 (Vps32 endogène+Vps32<sub>myc</sub>).

Dans cette souche KAx-3/Vps32<sub>myc</sub>, les anticorps  $\alpha$ -myc ou  $\alpha$ -Vps32 révèlent une localisation subcellulaire de Vps32<sub>myc</sub> très différente de la distribution observée dans la souche parentale. En effet, le marquage est nettement plus accentué avec une distribution très clairement vésiculaire de la protéine Vps32<sub>myc</sub>. Au début de la sélection en généticine, la souche présentait une certaine hétérogénéité dans la taille et le nombre de vésicules marquées avec certaines cellules ayant une trentaine de petite vésicules (diamètre inférieur à 0,5 µm) et certaines cellules arborant, en plus de petites vésicules, une ou deux vacuoles d'un diamètre supérieur à 1-2 microns (Fig.61). Après une

sélection prolongée en généticine, le phénotype est devenu plus uniforme : la quasi-totalité des cellules présente maintenant une vacuole unique de 1-2 microns. La carence nutritive ne modifie pas l'immunomarquage.



**Figure 61: Effets de la surexpression de Vps32 sur la localisation subcellulaire de Vps32.** Les cellules KAx-3 ou Kax-3 surexprimant Vps32<sub>myc</sub> au stade végétatif sont fixées et perméabilisées en méthanol. La protéine est révélée par l'anticorps secondaire anti-lapin couplé au FITC (1/200), après une première incubation avec l'anticorps anti-Vps32 utilisé au 1/500 ou bien par l'anticorps secondaire anti-souris marqué au FITC (1/200) après une première incubation avec l'anticorps anti-Vps32 utilisé l'anticorps anti-vps32 utilisé au 1/500. Les noyaux sont marqués au DAPI. Les cellules sont observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x.

Sur la vacuole, seule la membrane est décorée par les anticorps  $\alpha$ -myc ou  $\alpha$ -Vps32 suggérant que Vps32<sub>myc</sub> est associé à la membrane et exclu de l'espace intraluminal. Pour faciliter la discussion, ce compartiment a été appelé « *compartiment Vps32* » dans la suite du manuscrit.

Pour s'assurer que l'effet observé n'était pas lié à la présence de l'étiquette myc à l'extrémité de Vps32, la même construction a été réalisée sans étiquette. Dans la souche KAx3/Vps32, le même immunomarquage est obtenu confirmant que le compartiment Vps32 résulte de la surexpression et non un artefact du à l'étiquette.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la relocalisation observée de Vps32: (1) le compartiment Vps32 est présent dans la souche parentale mais porte trop peu de Vps32 pour être détecté. La surexpression de Vps32 augmente la quantité de Vps32 associée au compartiment et de ce fait sa détection, (2) la formation du compartiment Vps32 est un événement cinétiquement très rapide et la surexpression de la protéine modifie la cinétique, autorisant maintenant la visualisation de cette structure ou (3) la surexpression de Vps32 entraîne la formation d'un nouveau compartiment qui n'existe pas dans la souche sauvage.

En contraste de phase, *Dictyostelium* présente un grand nombre de vésicules de grande taille (de l'ordre du micron) dérivées de la voie endocytaire ou de la vacuole contractile. Le compartiment Vps32 ne présente pas de caractéristiques qui le distinguent de façon évidente des autres vésicules. Afin de caractériser ce compartiment par des approches *in vivo*, notamment l'utilisation de marqueurs de phase fluide, nous avons réalisé une construction avec une étiquette GFP en N-terminal ou en C-terminal de la protéine Vps32, toujours exprimée sous le contrôle du promoteur actine 15. Aucun transformant n'a été obtenu quelle que soit la position de l'étiquette. Nous avons alors cherché à colocaliser des marqueurs de la voie endocytaire par immunofluorescence sur ce compartiment.

Nous disposions au laboratoire des anticorps  $\alpha$ -Rab7,  $\alpha$ -coronine et  $\alpha$ -vacuoline (voir Introduction). Aucune colocalisation n'a pu être révélée entre les protéines Rab7, coronine et le compartiment Vps32. Par contre, la vacuoline est retrouvée associée au compartiment Vps32, confirmant que celui-ci dérive de la voie endocytaire. L'anticorps utilisé (211-1-1) reconnait les deux isoformes de vacuolines, A et B mais c'est l'isoforme A qui est la mieux révélée en immunofluorescence (Jenne et al., 1998). Le marquage suggère même que la vacuoline est, de façon surprenante, à l'interieur du compartiment Vps32. La vacuoline comme la coronine s'associent aux compartiments post-lysosomaux mais la vacuoline s'y associe plus tardivement que la coronine, juste avant la fusion des compartiments postlysosomaux à la membrane plasmique (Rauchenberger et al., 1997).





**Figure 62 : Colocalisation des protéines Vps32**<sub>myc</sub> **et Vacuoline sur le compartiment Vps32.** Les cellules KAx-3 surexprimant Vps32<sub>myc</sub> au stade végétatif sont fixées en PFA 4% et perméabilisées en présence de 0,2% Triton X-100. La protéine Vps32<sub>myc</sub> est révélée par l'anticorps secondaire anti-lapin couplé au Cy3, après une première incubation avec l'anticorps anti-vps32 utilisé au 1/500. La vacuoline est révélée par l'anticorps secondaire anti-souris marqué au FITC (1/200) après une première incubation avec l'anticorps anti-vacuoline (221-1-1) utilisé au 1/4. Les cellules sont observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x.

La présence de la vacuoline sur le compartiment Vps32 ne peut pas juste s'expliquer par une perturbation du trafic endocytaire due à la surexpression de la protéine car des marqueurs tardifs de cette voie comme Rab7 ou la coronine ne sont pas associés à ce compartiment. La présence de la Vacuoline implique soit que le compartiment Vps32 est situé très tardivement dans la voie endocytaire, au moment où les post-lysosomes vont fusionner avec la membrane plasmique ce qui est difficilement compréhensible car le MVB est situé avant les lysosomes, soit que le transport de la vacuoline est perturbé.

Par ailleurs, on peut exclure que le compartiment Vps32 dérive de la vacuole contractile car aucune co-localisation avec le marqueur de celle-ci (l'anticorps RH50) n'a été observée.

## (2) Le compartiment Vps32 accumule des composants de la machinerie ESCRT

Par immunomarquage, nous avons pu montrer que le compartiment Vps32 accumule les protéines Alix et Vps4 sur sa membrane (Fig.63A). Une analyse plus précise de l'immunomarquage indique la présence d'Alix et Vps4 dans la lumière du compartiment : le marquage se répartit dans des zones préférentielles de la lumière, suggérant une inhomogénéité de la région intraluménale du compartiment.

L'accumulation vésiculaire des protéines Alix et Vps4 se retrouve dans les expériences de fractionnement subcellulaire avec une augmentation notable du pool membranaire (fraction P100) de ces deux protéines dans le surexpresseur KAx-3/Vps32<sub>myc</sub> par rapport au parent KAx-3 (Fig.63B). Le développement des cellules ne modifie pas cette répartition.

Dans la souche invalidée pour *alx*,  $alx^{-}/Vps32_{myc}$ , le compartiment Vps32 est toujours marqué et la colocalisation entre Vps32 et Vps4 maintenue. La protéine Alix n'est donc pas nécessaire à la formation de cette vacuole ni au recrutement des composants ESCRT dessus.



Figure 63 : Effets de la surexpression de Vps32 sur la localisation subcellulaire d'Alix et Vps4. A. Immunofluorescence : Les cellules KAx-3/Vps32<sub>myc</sub> sont fixées en PFA 4% et perméabilisées en présence de 0,2% Triton X-100 au stade végétatif. La protéine Vps32<sub>myc</sub> est révélée par une incubation avec l'anticorps anti-myc puis par l'anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC ou Cy3. Les protéines Vps4 et Alix sont révélées par incubation avec respectivement les anticorps anti-Vps4 et anti-Alix utilisés au 1/500 puis par l'ajout de l'anticorps secondaire anti-lapin couplé au FITC ou Cy3. Les noyaux sont marqués au DAPI. Les cellules sont observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x. B. Fractionnement subcellulaire : L e s cellules sont cassées, au stade végétatif (Veg) ou après 12 heures sur une gélose de Na/K phosphate (Dev), grâce à des billes de verre. Le surnageant postnucléaire (T) est soumis à une ultracentrifugation de 30 minutes à 100 000xg afin de séparer la fraction soluble (S100) de la fraction membranaire (P100). Les extraits protéiques de chaque fraction sont analysés grâce aux anticorps anti-Alix, anti-Vps32 et anti-Vps4 dilués au 1/1000.

#### (3) Le compartiment Vps32 séquestre des protéines ubiquitinées

Puisque le compartiment Vps32 présente plusieurs des composants de la machinerie ESCRT, nous avons voulu suivre le comportement des protéines ubiquitinées dans ce mutant. Dans la souche KAx-3/Vps32<sub>myc</sub> analysée par immunofluorescence, l'anticorps FK2 conserve un marquage vésiculaire comme dans la souche parentale mais décore également la membrane périphérique du compartiment Vps32. De façon remarquable, une vésicule intraluménale est également marquée par le FK2 avec une intensité souvent plus forte que la membrane externe. Cette vésicule interne par contre ne contient ni Alix ni Vps4 de façon notable. La diversité de marquage intraluminal suggère que la lumière du compartiment Vps32 ne contient sans doute pas que du fluide mais plutôt plusieurs couches de membranes vraisemblablement non homogènes dans leur composition. Ceci nous a poussé à entreprendre une caractérisation du compartiment par microscopie électronique.



**Figure 64 : Le compartiment Vps32 accumule des protéines ubiquitinées.** Les cellules KAx-3/Vps32<sub>myc</sub> sont fixées et perméabilisées en présence de PFA 4% et de 0,2% Triton X-100 au stade végétatif. Les protéines ubiquitinées sont révélées par l'anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC, après une première incubation avec l'anticorps FK2 utilisé au 1/500. La protéine Vps32 est révélée par l'anticorps secondaire anti-lapin marqué au Cy3 après une première incubation avec l'anticorps anti-Vps32 utilisé au 1/500. Les noyaux sont marqués au DAPI. Les cellules sont observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x.

#### (4) Morphologie du compartiment Vps32 : apport de la microscopie électronique

Des essais de caractérisation du compartiment Vps32 par microscopie électronique sont en cours en collaboration avec Artémis Kosta du laboratoire de P. Golstein (CIML, Luminy). Les cellules KAx-3/Vps32<sub>myc</sub> sont fixées en phase végétative et la morphologie des compartiments internes comparée à celle de la souche parentale KAx-3. Une observation globale des cellules suggèrent la présence reproductible de structures vésiculaires multilamellaires dans la souche mutante, absentes ou extrêmement plus petites dans la souche parentale. La Fig.65 représente un aperçu de ces compartiments multilamellaires.

Afin de s'assurer que ces structures correspondent effectivement au compartiment Vps32, des expériences d'immunomarquage sont prévues.



Figure 65 : Aperçu des compartiments multilamellaires de la souche  $KAx-3/Vps32_{myc}$  observés en microscopie électronique.

#### c) Le mutant tsg101 nul

#### (1) Obtention du mutant *tsg101* nul

Le mutant tsg101 nul a été généré dans la souche KAx-3 en utilisant la cassette de résistance à la blasticidine. La cassette a été insérée en position 523 de l'ADN génomique conduisant à l'interruption de la protéine au milieu du domaine UEV-like (voir Annexes, Fig.98). Après clonage des transformants sur un tapis bactérien de *K. aerogenes*, les mutants potentiels ont d'abord été testés par PCR (Fig.66A). Les clones sur lesquels il a été impossible d'amplifier le fragment parental (650 pb contre 1950 chez le mutant) ont été analysés par Southern-blot (Fig.66B). Dans la souche parentale, la sonde s'hybride à un fragment de ~750 nucléotides. Ce fragment disparait dans le mutant tsg101 nul pour donner un fragment plus grand (~2000bp) du fait de l'insertion de la cassette *Bsr*. L'invalidation du gène a été confirmée pour les clones 2, 10 et 12. Tous les clones ont été conservés de façon à vérifier qu'ils avaient tous le même comportement. Dans la suite du manuscrit, seul le clone 2 est utilisé.



Figure 66: Analyse de l'obtention de mutants nuls pour le gène tsg101. A. Test par PCR : Une première approche dans la recherche de clones invalidés pour le gène tsg101 a été réalisée par PCR en utilisant les amorces tsg3/tsg8 situées de part et d'autre de la cassette Bsr. Seules les souches non invalidées autorisent l'amplification du fragment. B. Confirmation par Southern-blot : Nous avons ensuite confirmer l'invalidation du gène tsg101 par Southern blot. Après coupure par EcoRI/EcoRV de l'ADN génomique des clones sélectionnés, le gène tsg101 est révélé par l'hybridation de la sonde tsg6/tsg7 marquée au DIG. L'insertion de la cassette Bsr se traduit pas la disparition de la bande à 750 pb et l'apparition d'une bande à 2000 pb (750+1300).

Contrairement aux protéines Vsp32 et Vps4, l'invalidation de *tsg101* n'est pas létale. Les cellules présentent une vitesse de croissance proche de la souche KAx-3 et l'absence de Tsg101 n'affecte pas l'activité de macropinocytose. Cette différence de comportement des mutants laisse envisager une différence dans la fonction subcellulaire de protéines. D'après les données de la littérature, Vps32 et Vps4 interviennent plus tardivement dans le fonctionnement de la machinerie ESCRT que Tsg101. Il est possible que leur invalidation comme l'introduction de mutants dominant-négatifs conduisent à une séquestration de protéines en amont dans la cascade et essentielles à la vie végétative.

## (2) Effet de la mutation *tsg101* nulle sur la localisation du couple Alix-Vps32

La protéine Tsg101/Vps23 est un composant du complexe ESCRT I. Dans la chronologie de recrutement de la machinerie à la membrane du MVB, les données actuelles suggèrent que le complexe ESCRT-I est recruté en premier et permet alors l'activation d'ESCRT-II qui recrute alors ESCRT-III (Katzmann et al., 2002). Nous avons donc voulu tester si l'absence de Tsg101 modifiait la localisation d'Alix chez *Dictyostelium*.

Dans la souche  $tsg101^{-}$ /Alix<sub>myc</sub> placée en situation de développement, les protéines Alix et Vps32 restent associées à des structures vésiculaires comparables à celles observées dans la souche parentale tant dans le nombre que dans la taille des vésicules (Fig.67A). Des expériences de fractionnement subcellulaire ont été menées de façon à évaluer plus précisément la répartition membrane/soluble des protéines endogènes Dd-Alix, Dd-Vps32 et Dd-Vps4 dans la souche tsg101nulle par rapport à la souche parentale. Les cellules KAx-3 et tsg101 nulles sont cassées puis centrifugées à haute vitesse (100 000xg) afin de séparer les fractions solubles et membranaires. Le suivi par Western-blot de la répartition des différentes protéines nous indique, pour les trois, que la fraction membranaire est augmentée en l'absence de Tsg101 (Fig.67B).



Figure 67 : Effet de la mutation *tsg101* nulle sur la localisation des protéines Alix, Vps32 et Vps4. A. *Etude de la localisation de la protéine Alix<sub>myc</sub> par immunofluorescence* : Les cellules *tsg101*/Alix<sub>myc</sub> sont placées en carence nutritive pendant 12 heures en tampon Na/K phosphate puis fixées en paraformaldéhyde 4% et perméabilisées en présence de 0,2% Triton X-100. La protéine Alix<sub>myc</sub> est détectée par l'anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC, après une première incubation avec l'anticorps a-myc (1/500). Les cellules sont ensuite observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x. **B.** *Fractionnement subcellulaire* : Les cellules KAx-3 et *tsg101* nulles au stade végétatif sont cassées à l'aide de billes de verre. Le surnageant post-nucléaire (T) est soumis à une ultracentrifgation de 30 minutes à 100 000xg pour séparer la fraction soluble (S100) de la fraction membranaire (P100). Les extraits protéiques issus de chacune des fractions sont analysés par Western-Blot avec les anticorps  $\alpha$ -Alix2,  $\alpha$ -Vps4 et  $\alpha$ -Vps32 dilués au 1/1000.

Ces résultats suggèrent que la protéine Tsg101 n'est pas essentielle au recrutement membranaire des protéines Alix, Vps32 et Vps4. En revanche, l'invalidation de *tsg101* pourrait modifier la dynamique de la machinerie ESCRT ce qui expliquerait l'augmentation du pool membranaire de ces protéines observé en fractionnement.

### **III. CARACTERISATION DU MUTANT** *tsg101* NUL

# 1. Les souches *alx* et *tsg101* nulles ont un phénotype développemental différent

Le mutant tsg101 nul a fait l'objet d'une étude plus particulière dans les phases de développement.

En situation de carence nutritive, les cellules agrègent à un rythme parental pour donner des agrégats puis des fructifications correctement proportionnées contenant des spores matures (Fig.68). Néanmois, l'ensemble des structures formées sont plus petites (de l'ordre de 20 %) dès le stade agrégat, ce qui conduit à un plus grand nombre de fructifications pour un même nombre initial de cellules. Le phénotype du mutant *tsg101* nul ne s'accompagne pas de défaut de morphogenèse et se distingue donc très nettement du phénotype de la souche *alx* nulle. Afin d'exclure un artefact lié à la souche parentale (KAx-3 pour *tsg101* contre JH10 pour *alx*), nous avons reproduit l'invalidation dans

la souche JH10. Le même phénotype est observé quelle que soit la souche d'origine, confirmant que l'absence d'Alix se traduit par des conséquences plus marquées sur le développement que l'absence de Tsg101.



**Figure 68 : Comparaison des phénotypes de développement des souches KAx-3 et** *tsg101* **nulle.** Les cellules sont étalées sur un milieu gélosé de Na/K phosphate. L'absence de nutriment induit le programme de développement multicellulaire. La souche *tsg101* nulle suit les mêmes étapes de morphogenèse que la souche parentale jusqu'à former elle aussi des fructifications mais plus petites.

La protéine Tsg101 est une protéine multimodulaire. D'après les données de la littérature, son domaine UEV-like est particulièrement important pour sa fonction dans la machinerie ESCRT puisqu'il permet la reconnaissance de l'étiquette « ubiquitine » portée par les protéines ciblées dans la voie MVB et leur prise en charge par la machinerie ESCRT. Afin d'établir un lien entre le phénotype du mutant *tsg101* nul et la fonction supposée de la protéine, différentes constructions ont été réalisées et testées pour leur capacité à complémenter le phénotype du mutant *tsg101* nul: une construction qui ne comprend que ce domaine, Tsg10-UEV (aa 1-170), une construction délétée de ce domaine, Tsg101 $\Delta$ UEV (aa 161-495), et une construction mutée dans la méthionine M<sup>117</sup> (Tsg<sup>M117A</sup>) du domaine UEV-like qui est très conservée chez tous les homologues et qui est impliquée dans la reconnaissance des motifs P(S/T)AP. Ces constructions ont été sous-clonées dans le vecteur Exp4<sup>+</sup> avec une étiquette *myc* en C-terminal pour suivre leur expression.

Comme le montre la Fig.69, la construction  $Tsg101_{myc}$  restaure le phénotype parental avec la formation de fructifications d'une taille équivalente à celle des fructifications obtenues avec les cellules parentales. Par contre, les constructions  $Tsg101^{M117A}_{myc}$ ,  $Tsg101-UEV_{myc}$ ,  $Tsg101\Delta UEV_{myc}$  ne

complémentent pas le défaut de la souche *tsg101* nulle. L'expression de ces mêmes constructions dans la souche parentale KAx-3 ne conduit à aucun effet dominant-négatif excepté la construction Tsg101 $\Delta$ UEV<sub>myc</sub> qui donnent des fructifications plus petites et très mélangées les unes aux autres.



Figure 69 : Rôle du domaine UEV de la protéine Tsg101 dans le développement multicellulaire. Des souches permettant d'évaluer l'importance du domaine UEV dans le développement multicellulaire sont étalées sur un milieu gélosé Na/K phosphate. Après 24h en carence nutritive, le phénotype est observé sous loupe binoculaire.

Le domaine UEV seul est donc incapable de restaurer le phénotype sauvage mais son absence ne permet pas non plus à la protéine d'assurer sa fonction. Il est donc nécessaire mais pas suffisant à la fonction de Tsg101 même si nous n'avons pas pu montrer sa capacité à lier l'ubiquitine. Ce domaine est peut-être impliqué dans d'autres types d'interaction ou tout simplement nécessaire à la conformation de la protéine. La surexpression de la construction Tsg101 $\Delta$ UEV<sub>myc</sub> dans la souche parentale se traduit par un effet dominant négatif avec la formation de petites fructifications. Une conformation particulière de cette protéine tronquée pourrait expliquer ce phénomène. Une étude plus approfondie de ces constructions est en cours au laboratoire.

En immunofluorescence, toutes ces constructions donnent un fort marquage cytosolique qui ne permet pas de visualiser une association éventuelle à des compartiments subcellulaires particuliers.

# 2. Tsg101 est impliqué dans le contrôle de l'expression de la protéine Alix

Dans le Chapitre I, nous avons décrit la régulation négative de la protéine Alix endogène en situation de surexpression d'Alix sous le contrôle du promoteur p*Act15* ( $Exp4^+$ :Alix<sub>myc</sub>). Chez la Levure, Rim20 participe au processing du facteur de transcription Rim101. Cette fonction met en jeu la protéine ESCRT Vps32 comme intermédiaire pour le recrutement de la protéase Rim13 nécessaire au clivage de Rim101 (voir Discussion de la Partie I). Le défaut de mutant *vps32* nul chez *Dictyostelium* ne nous a pas permis de tester directement l'implication de Vps32 dans le contrôle de

l'expression de Dd-Alix. Par contre, le mutant tsg101 nul a pu être utilisé afin de tester si l'implication de la machinerie ESCRT dans ce processus s'étendait à d'autres composants de la machinerie.

Comme illustré sur la Fig.70, dans la souche tsg101 /Alix<sub>myc</sub>, la protéine endogène est maintenue à un niveau comparable à celui de la souche KAx-3 et ne fait donc pas l'objet d'un processus de régulation négative malgré le niveau d'expression particulièrement élevé de la protéine Alix<sub>myc</sub> par rapport à la souche parentale.



Figure 70 : Tsg101 contrôle le niveau d'expression de Dd-Alix. Des extraits protéiques totaux végétatifs réalisés sur les souches KAx-3, KAx-3 surexprimant Alix<sub>myc</sub> et *tsg101* nulle surexprimant Alix<sub>myc</sub> ont été analysés par migration sur un gel d'acrylamide 6%, transfert sur membrane Immobilon puis immunodétection à l'aide de l'anticorps anti-Alix2 utilisé au 1/1000.

Ce résultat est à mettre en parallèle avec l'observation que le niveau d'expression de la protéine endogène Dd-Alix est plus fort dans la souche *tsg101* nulle que dans la souche parentale (Fig.67B) et suggère que la protéine Tsg101 participe au contrôle de l'expression de Dd-Alix. Ces effets devront être confirmés par des approches de Northern blot permettant de visualiser le niveau d'expression des ARN messagers.

Les mutants invalidés dans les autres composants de ESCRT I, II et III qui sont en cours d'élaboration, seront également testés dès obtention afin d'évaluer la contribution de la machinerie ESCRT dans sa globalité.

Un même effet de régulation négative a été observé pour la protéine Vps32 endogène dans la souche KAx-3 /Vps32<sub>myc</sub>. Nous n'avons pas réussi à obtenir une souche  $tsg101^{-}$ /Vps32<sub>myc</sub> exprimant Vps32<sub>myc</sub> de façon homogène. D'après les expériences d'immunofluorescence, un certain nombre des cellules n'exprimaient la construction qu'à un niveau très faible. Cette hétérogénéité dans le niveau d'expression de Vps32<sub>myc</sub> n'a pas permis de tester l'implication de Tsg101 dans la régulation négative de la protéine Vps32 endogène. Par contre, dans la souche  $alx^{-}/Vps32_{myc}$ , la régulation négative de la protéine Vps32 endogène est maintenue indiquant qu'Alix n'est pas indispensable à ce phénomène (voir Fig.71).



Figure 71 : Dd-Alix ne contrôle pas le niveau d'expression de Dd-Vps32. Des extraits protéiques totaux végétatifs réalisés sur les souches KAx-3, KAx-3 surexprimantVps32<sub>myc</sub> et *alx* nulle et *alx* nulle surexprimant Vps32<sub>myc</sub> ont été analysés par migration sur un gel d'acrylamide 6%, transfert sur membrane Immobilon puis immunodétection à l'aide de l'anticorps anti-Vps32 utilisé au 1/1000.

Ce résultat suggère que soit la régulation négative de Vps32 passe par un mécanisme différent de celui utilisé pour réguler négativement Alix, soit qu'Alix n'est pas un régulateur général de ce processus.

### **IV.**DISCUSSION

L'étude de la localisation de la protéine Alix chez *Dictyostelium* a permis de montrer qu'elle était associée à la voie endocytaire. Au même moment, des données publiées chez la Levure (Odorizzi et al., 2003) puis confirmées peu de temps après chez les mammifères (Katoh et al., 2003) ont révélé un lien entre Alix et la machinerie de tri et de dégradation des protéines membranaires, la machinerie ESCRT. Afin d'étudier ce lien et son implication éventuelle dans la fonction d'Alix, nous avons cherché à caractériser cette machinerie chez *D. discoideum*.

# 1. Le génome de *Dictyostelium* contient tous les homologues de la machinerie ESCRT

La machinerie ESCRT proprement dite est composée de 10 protéines organisées en trois complexes : les complexes ESCRT-I, -II et –III. Un certain nombre d'autres protéines leur sont associées comme l'ATPase Vps4, l'enzyme de dé-ubiquitination Doa4 ou la protéine Vps27 décrites pour recruter le complexe ESCRT-I sur la membrane de l'endosome. La recherche dans les banques génomiques de *Dictyostelium* a permis d'identifier les homologues des protéines impliquées dans les complexes ESCRT et de l'ATPase Vps4. Leur présence indique une conservation phylogénétique et vraisemblablement de leur fonctionnement. Il semblerait que *Dictyostelium* ne possède qu'un seul homologue de Vps32 comme la Levure et contrairement à *C. elegans* où deux homologues ont été identifiés (Roudier et al., 2005), et aux mammifères où trois homologues sont décrits : Chmp4 A, B et C (Katoh et al., 2004a)). Cette recherche dans les banques n'a pas permis d'identifier un homologue de la protéine Vps27/Hrs.

# 2. Les vésicules Alix-positives portent la protéine Vps32 et des protéines ubiquitinées

Dans la première partie de ce travail, nous avons pu montrer qu'Alix est associé à des structures vésiculaires dérivant de la voie endocytaire. De façon intéressante, nous avons pu établir dans ce chapitre que la protéine Vps32 du complexe ESCRT-III colocalise avec Alix sur ces vésicules. Cette colocalisation est très nette sur les cellules développées où les vésicules sont plus grosses. Ce

résultat a été confirmé par fractionnement subcellulaire sur gradient de Percoll. Du fait de la présence de ces protéines dans des fractions membranaires Triton X-100 insoluble, nous n'avons pas pu prouver que cette co-localisation résulte d'une interaction directe entre les deux protéines. Les vésicules portant Alix et Vps32 sont également positives pour le marquage FK2 révélant qu'elles contiennent aussi des protéines ubiquitinées. Ces résultats confortent le fait que les vésicules Alix-positives décrites dans le chapitre I dérivent de la voie endocytaire et suggèrent fortement que, chez *Dictyostelium*, Alix est associé à la machinerie ESCRT et participe ainsi au trafic de protéines membranaires et à la biogenèse du MVB comme décrit chez la Levure et les mammifères.

#### 3. Formation de compartiments de classe E chez Dictyostelium

Les gènes de classe E représentent une des 6 classes de gènes (classe A à F) identifiés comme indispensables pour le transport de protéines dans la vacuole chez Saccharomyces. La perte de fonction de ces protéines de classe E (par délétion ou mutants dominant-négatifs) se traduit par une impossibilité à former les vésicules internes du corps multivésiculaire. Ces mutants présentent alors dans leur cytoplasme une accumulation de membranes qui séquestrent les protéines transitant par ces compartiments. Ces membranes prennent le nom de compartiment de classe E (voir Introduction). La formation d'un compartiment de classe E par invalidation ou mutation dans le site actif de l'ATPase Vps4 est classiquement utilisée pour vérifier si des protéines sont séquestrées dans ce compartiment. Chez Dictyostelium, l'invalidation de Vps4 ou l'expression d'une forme mutante de l'ATPase semble létale au stade végétatif. Par contre, lorsque l'expression de la protéine mutante est induite uniquement en développement, Vps4 est alors associée à plusieurs structures vésiculaires souvent regroupées sur lesquelles colocalisent Vps32 et Alix et qui accumulent également des protéines ubiquitinées. Ces vésicules ne sont pas retrouvées avec la protéine Vps4 non mutante. Elles pourraient donc correspondre à des compartiments de classe E. Par analogie avec ce qui a été décrit chez la Levure ou les mammifères, ce compartiment a été appelé E-like. La présence d'Alix sur ces compartiments confirme que, chez Dictyostelium, Alix est associé à la machinerie ESCRT.

De façon surprenante, la surexpression de Vps32 se traduit par la formation d'une grosse vacuole le plus souvent unique qui séquestre des protéines ubiquitinées et sur laquelle colocalisent également Vps32, Vps4 et Alix. La formation de telles structures par surexpression de la protéine Vps32 a également été rapportée lors de la surexpression des homologues humains hSnf7-1 (Lin et al., 2005) et hSnf7-3 (Peck et al., 2004). Pour les auteurs, cette structure est comparable aux compartiments de classe E obtenus lors de la surexpression d'une protéine Vps4 mutée. Chez *D. discoideum*, les compartiments que nous observons dans les deux surexpresseurs ne sont pas identiques. Bien que les deux types de compartiments portent les protéines Alix, Vps32, Vps4 et des protéines ubiquitinées, le compartiment Vps32 se distingue du compartiment E-like par sa taille et son

nombre. Il est le plus souvent unique et sa formation n'est pas létale alors que les compartiments Vps4 sont plus nombreux, plus petits et l'expression d'un dominant négatif de l'ATPase est létal au stade végétatif. Cependant, la différence de nombre et de taille peut venir du fait que la souche Vps32 est stable alors que l'expression de la protéine Vps4 mutée est induite en développement et transitoire. On peut imaginer que les différentes vésicules obtenues avec la protéine Vps4<sup>E235Q</sup> finiraient par fusionner pour ne donner qu'une seule grosse vésicule semblable au compartiment Vps32 si l'expression de la protéine était constitutive.

Par définition, l'invalidation de toutes les protéines de classe E chez la Levure conduit à la formation d'un compartiment de classe E. Dans la souche *tsg101* nulle, la localisation d'Alix et de Vps32 ne semble pas modifiée. Les deux protéines co-localisent toujours sur des structures vésiculaires de morphologie tout à fait comparable à celles observées dans la souche sauvage. La protéine Tsg101 étant décrite pour être une des premières protéines ESCRT à être recrutée sur la membrane de l'endosome de tri, il est attendu qu'en son absence, les complexes suivants ne soient pas recrutés. Nos résultats suggèrent donc qu'Alix et Vps32 sont ensemble sur des structures vésiculaires situées vraisemblablement en amont du MVB dans la voie endocytaire puisque non affectées par la perturbation de celui-ci. Ils indiquent également que les vésicules que nous observons dans la souche parentale ne sont donc pas des MVB mais ces vésicules en amont. Leur nature reste à déterminer.

#### 4. Les acteurs de la machinerie ont des rôles différentiels

L'invalidation des homologues des protéines de classe E chez *Dictyostelium* conduit à une grande hétérogénéité de phénotypes : les invalidations de *vps32* et *vps4* semblent létales, l'invalidation d'*alx* donne un phénotype anormal de développement, l'invalidation de *tsg101* se traduit par la formation de petites fructifications mais aucun défaut majeur de morphogenèse, quant aux autres protéines de la machinerie, leurs invalidations sont en cours au laboratoire. Cependant, il est important de souligner que les phénotypes que nous décrivons chez *D. discoideum* sont à l'échelle macroscopique (cellule/organisme) et non pas à l'échelle microscopique comme chez *Saccharomyces*, avec la description de la formation de compartiments de classe E dans le cytosol des cellules mutantes. Toutefois, même chez la Levure, tous les mutants n'ont pas le même phénotype quant au devenir des récepteurs cibles. Par exemple, si l'interaction entre Vps27 et Vps23 est affectée par une mutation, le devenir de l'enzyme CPS est affecté mais pas celui de l'enzyme CPY ni celui du récepteur Ste3 (Bilodeau et al., 2003). Autre exemple, la perméase Gap1 reste séquestrée dans les différents compartiments E excepté dans celui formé par le mutant *bro1* où la perméase recycle à la membrane plasmique (Nikko et al., 2003).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette variabilité dans les phénotypes chez *Dictyostelium* : (1) certaines protéines ont des rôles additionnels dans d'autres processus et ce sont ces fonctions additionnelles qui sont responsables du phénotype, (2) ces protéines

ont une importance différente dans la voie MVB et la variabilité des phénotypes peut nous permettre de les hiérarchiser et de définir la machinerie minimale vitale. Dans une telle hypothèse, Tsg101 n'est pas un composant essentiel, son absence pourrait ralentir le recrutement des autres composants mais pas l'empêcher. Alix ne serait pas non plus un composant essentiel mais tout de même plus important que Tsg101 puisque le phénotype observé est plus fort. (3) La voie MVB n'est pas arrêtée au même endroit suivant les mutants et les protéines cibles vont donc avoir un devenir différent. Dans cette hypothèse, l'invalidation de protéines qui ont un rôle plus tardif dans la voie comme Vps32 et Vps4 conduirait à la formation d'un compartiment anormal séquestrant tous les composants en amont et les protéines cibles qui arrivent. Le système serait alors totalement figé et une telle situation serait létale pour la cellule. Dans une souche invalidée pour tsg101, les protéines cibles recycleraient à la membrane plasmique sous une forme inactive ou bien resteraient séquestrées dans le compartiment E ce qui n'aurait pas de conséquences majeures sur la cellule. La surexpression de Vps32 altérerait la dynamique de la machinerie sans l'arrêter totalement. Ce ralentissement permettrait de visualiser les composants sur la vésicule Vps32 ainsi que des protéines ubiquitinées mais le tri et la fusion avec les lysosomes finiraient par se faire. Il n'y aurait donc pas de conséquence majeure sur la survie de la cellule ou son développement. L'invalidation de la protéine Alix n'est pas létale car la machinerie ne serait pas bloquée. Par contre, les récepteurs pourraient ne pas être triés convenablement et recycler à la membrane plasmique sous une forme active. La persistence des voies de signalisation en aval conduit alors à un conflit de signalisation et un phénotype anormal de développement. Enfin, (4) suivant la protéine cible, l'entrée dans la machinerie ESCRT varie, Tsg101 pour certaines et une autre protéine de classe E pour d'autres cibles (par exemple Alix par analogie avec la protéine virale EIAVp9 dont le bourgeonnement hors de la cellule dépend d'Alix mais pas de Tsg101 (Strack et al., 2003). Une dérégulation de la dégradation des protéines reconnues par Tsg101 n'aurait pas de conséquences graves sur la survie de la cellule ou le développement alors qu'une dérégulation d'au moins une partie des protéines prises en charge par Alix ne permettrait plus le développement. Cette dernière hypothèse vient surtout des données concernant le bourgeonnement des retrovirus. Suivant le type de retrovirus, 3 motifs ont été identifiés sur le L-domain pour permettre le bourgeonnement hors de la cellule, ceux sont les motifs P(S/T)AP, PPXY et YPXL. Dans tous les cas, un dominant négatif de Vps4 empêche le bourgeonnement viral. Par contre, le bourgeonnement des virus à motif P(S/T)AP est spécifiquement inhibé lorsque la fonction de Tsg101 est perturbée alors que celui à motif YPXL n'est pas touché, et inversement, le bourgeonnement des virus à motif YPXL est inhibé si la fonction d'Alix est empêchée alors que le bourgeonnement des virus à motif P(S/T)AP n'est pas perturbé par une telle mutation. Les auteurs proposent que le point d'entrée dans la voie MVB va dépendre d'un partenaire spécifique, différent suivant le L-domain (Demirov and Freed, 2004). On peut ainsi proposer que le point d'entrée

Cette variété de phénotype selon la protéine mutée a aussi été décrite chez *C. elegans* où certaines mutations sont létales au stade embryonnaire ou larvaire alors que d'autres ne présentent pas de phénotype anormal majeur (Roudier et al., 2005). Mais d'après les auteurs, quel que soit le mutant,

dans le MVB varie suivant la cible, Tsg101 dans certains cas et Alix pour d'autres.

tous présentent une accumulation de larges vésicules correspondant à des compartiments de classe E. Pour expliquer la différence de phénotypes, les auteurs proposent que toutes les protéines ne participent pas de façon équivalente à la voie ou qu'elles aient des fonctions différentes dans des tissus spécifiques.

Il est maintenant nécessaire de déterminer si à l'échelle subcellulaire, ces mutants présentent tous l'équivalent d'un compartiment de classe E dans le cytosol. Une caractérisation de nos différents mutants par microscopie électronique est actuellement en cours en collaboration avec A. Kosta (laboratoire de P. Golstein, CIML). Une autre approche permettant la caractérisation du trafic MVB et de ses perturbations dans les différents mutants repose sur l'identification d'une protéine cible qui suive cette voie pour déterminer si son devenir est affecté de la même façon dans tous les mutants. Chez la Levure, deux types de protéines sont classiquement utilisés : les précurseurs de certaines enzymes lysosomales issues de la voie de biosynthèse comme la carboxypeptidase S (CPS) (Odorizzi et al., 1998) ou des perméases de la membrane plasmique ciblées à la dégradation lors d'une modification de l'environnement comme Fur4 (Blondel et al., 2004) ou Gap1 (Nikko et al., 2003). CPS présente l'avantage d'être maturée lorsque le trafic est normal. Le suivi de son processing révèle donc les perturbations de la voie MVB. De plus, nous avons identifié un homologue de cette protéine chez Dictyostelium que nous avons cloné en lui ajoutant une étiquette GFP en N-terminal. La construction GFP-CPS reste malheureusement séquestrée dans le reticulum endoplasmique. Nous avons également produit un anticorps pour travailler sur la protéine endogène mais celui-ci ne s'est pas révélé assez bon pour envisager une telle étude. A défaut de cibles physiologiques, nous avons entrepris la construction d'une cible qui nous permettrait de suivre le trafic. En collaboration avec F. Letourneur, il a été décidé que la protéine chimère : domaine transmembranaire fusionné au domaine extracellulaire de la protéine *contact site A* (CSA) contre laquelle nous disposions d'anticorps, était un bon candidat. Afin de cibler la protéine vers la voie MVB, nous sommes partis du postulat que l'étiquette ubiquitine pourrait assurer cet adressage comme cela a été réalisé pour le récepteur Ste2 (Shih et al., 2000) et le récepteur à l'EGF (Haglund et al., 2003b). Ces constructions ont été introduites dans les souches KAx-3 et les différents mutants pour comparer leur devenir. La sélection des transformants est actuellement en cours.

### 5. Tsg101 est impliqué dans le contrôle de l'expression de Dd-Alix

Dans la première partie de ce travail, nous avons vu que la surexpression d'Alix ou d'Alix dépourvu de son domaine poly-proline se traduit par la disparition complète de la protéine Alix endogène. Cette observation nous laisse envisager qu'Alix régule plus ou moins directement son niveau d'expression. Une fonction dans le contrôle de l'expression génique rappelle ce qui est décrit pour le deuxième homologue d'Alix chez la Levure, la protéine Rim20 qui est, de façon intéressante, dépourvue d'une queue poly-proline. Cette protéine, en association avec Vps32 intervient dans le

processing du facteur de transcription Rim101. Récemment, l'implication d'autres protéines ESCRT dans le processing de Rim101 a été décrite (Xu et al., 2004a). Les auteurs ont montré que les complexes ESCRT-I, -II et le sous complexe Vps20-Vps32 sont nécessaires au processing de Rim101. Par contre, les protéines additionnelles telles que Vps27, Vps4 ou Doa4 n'interviennent pas, pas plus que l'autre homologue d'Alix, Bro1. Le fait que Dd-Tsg101 soit impliqué dans la régulation négative d'Alix renforce l'analogie que l'on peut faire entre Dd-Alix et Rim20. Ce phénomène de régulation négative de l'Alix endogène suggère que d'autres facteurs de transcription que Rim101 sont régulés par cette voie, à commencer par le facteur régulant l'expression d'Alix. Il sera intéressant d'étudier ce phénomène dans les autres mutants d'invalidation de la voie MVB qui sont en cours au laboratoire pour déterminer leur implication éventuelle dans ce processus. Il sera également intéressant de tester si d'autres protéines de cette voie sont régulées ainsi comme le suggèrent les expériences faites sur le surexpresseur Vps32. Les premiers résultats obtenus sur cette souche montrent déjà qu'Alix intervient dans le contrôle de sa propre expression mais pas dans celle de Vps32 puisque le phénomène de régulation négative est maintenu dans la souche *alx* nulle. Si la régulation négative de Vps32 passe par la même voie que celle d'Alix, c'est qu'Alix n'en est pas un régulateur général.

Une implication de la machinerie ESCRT dans le contrôle de l'expression génique a également été suggérée par l'identification des protéines du complexe ESCRT-II comme étant des protéines EAP (*ELL-associated proteins*) c'est à dire associées au facteur d'élongation de l'ARN polymerase II (ELL) (Kamura et al., 2001). Cette association ne semble pas modifier l'activité stimulatrice d'élongation d'ELL mais bloque son activité inhibitrice d'initiation de la transcription.

Concernant la protéine Tsg101, elle a été décrite comme un répresseur général de la transcription, avec une importance particulière de son domaine coiled-coil pour cette fonction (Watanabe et al., 1998) et comme co-régulateur des récepteurs nucléaires aux hormones (Burgdorf et al., 2004 ; Hittelman et al., 1999 ; Sun et al., 1999 ). Il se peut donc que Dd-Tsg101 soit un répresseur de la transcription d'Alix et peut-être de Vps32 de façon indépendante de la voie proposée pour Rim101.
## Chapitre III

Recherche de partenaires de Dd-Alix par le système double-hybride

#### I. RECHERCHE DE NOUVEAUX PARTENAIRES D'ALIX

Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires de la protéine Dd-Alix, nous avons opté pour une approche double-hybride. Le système double hybride permet la détection *in vivo* de l'interaction entre deux protéines. Il repose sur l'utilisation d'un facteur de transcription dont on peut séparer les deux domaines fonctionnels: le domaine DB de fixation de l'ADN au niveau de séquences promotrices spécifiques et le domaine AD portant l'activité transcriptionelle. Les protéines dont on souhaite tester l'interaction sont fusionnées l'une avec le domaine DB, l'autre avec le domaine AD et exprimées chez la Levure. L'interaction des deux protéines dans la cellule conduit à la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel. Le promoteur du gène qu'il contrôle est alors activé. L'association des deux protéines est mise en évidence grâce à un gène rapporteur placé sous le contrôle de ce promoteur.

Cette méthode peut être utilisée pour tester l'interaction entre deux protéines connues mais également pour rechercher de nouveaux partenaires d'une protéine donnée en fusionnant une banque d'ADNc avec le domaine d'activation du facteur de transcription.

Pour notre crible double-hybride, nous avons utilisé le système *LexA* de Gyuris et al (1993). Dans ce système, le domaine de liaison à l'ADN est fourni par la protéine LexA de *E. coli* qui se fixe sur les séquences opératrices *LexA* et le domaine d'activation est un peptide de *E. coli* (B42) capable d'activer la transcription chez la Levure (voir Matériel et Méthodes). Les vecteurs de clonage pLexA (sélection *His*) et pB42AD (sélection *Trp*) permettent de fusionner ces domaines avec l'ADNc de la protéine « appât » et avec la banque d'ADNc à cribler. Au laboratoire, nous disposons d'une banque développementale d'ADNc de *Dictyostelium* réalisée par le laboratoire de R. Firtel (UCSD). Deux gènes rapporteurs différents sous le contrôle de séquences opératrices lexA. Il n'est donc transcrit que lors de l'interaction entre deux protéines. Le gène rapporteur *lacZ* est cloné dans le vecteur p80p (sélection *ura*) en aval de 8 séquences opératrices *LexA*. Il s'agit d'un vecteur réplicatif, à grand nombre de copies. L'interaction entre deux protéines est révélée par la présence d'une activité ß-galactosidase et par la croissance de la souche de levure à l'origine *leu-* sur milieu de culture sans leucine.

#### 1. Elaboration de l'appât

#### a) Choix de l'appât

Dans un premier temps, nous avons cherché à définir l'appât le plus approprié pour le crible doublehybride. La protéine Alix entière présentait l'avantage de porter tous les domaines de la protéine. Devant son niveau d'expression très faible chez la Levure, nous nous sommes orientés vers une forme plus courte : Alix CPP (aa 593-794). Cet appât s'exprime correctement chez la Levure et contient le domaine CC indispensable à la fonction développementale d'Alix (voir Chapitre I). Par ailleurs, il pouvait nous permettre de confirmer des interactions décrites dans la littérature avec la partie C- terminale riche en résidus prolines (PP). AlixCPP a été cloné dans le vecteur pLexA dans le même cadre de lecture que le domaine DB de fixation de l'ADN (pLexA-CPP).

#### b) Vérification de la faisabilité du système

La souche EGY48 a tout d'abord été transformée avec le vecteur *p8op-lacZ* qui porte le gène rapporteur *lacZ*. La sélection de la présence de ce vecteur se fait grâce au gène *ura3* porté par le vecteur qui permet de complémenter le phénotype *ura-* de la Levure (milieu Glu-U).

Les levures sont ensuite transformées par choc thermique avec le plasmide *pLexA-CPP*. L'expression de la protéine fusion est sous le contrôle du promoteur fort constitutif *adh1*. La sélection de la présence du vecteur pLexA-CPP se fait grâce au gène *his3* qui complémente le phénotype *his-* de la souche (milieu Glu-UH). Après quelques jours de sélection, une dizaine de clones est testée pour l'expression de la protéine fusion LexA-CPP grâce à l'anticorps anti-LexA (Santa Cruz). Le niveau d'expression étant assez homogène dans les différents clones, le clone 1 a été conservé de façon arbitraire pour effectuer un contrôle de non-activation de la transcription (Fig.72).

Le clone 1 est transformé avec le vecteur pB42AD vide afin de vérifier que la seule présence de pLexA-CPP et pB42AD ne suffit pas à activer les gènes rapporteurs. La présence du vecteur pB42AD est détectée par la complémentation du phénotype *trp*- de la levure (milieu Glu-UHT). Dans le vecteur pB42AD, l'expression des protéines fusion est sous le contrôle du promoteur *gal1* induit en présence de galactose (Gal). La transactivation potentielle de la construction pLexA-CPP avec le vecteur vide pB42AD est donc testée par repiquage des clones sur des boîtes d'agar/Gal-UHTL ou d'agar/Gal-UHTcontenant le substrat de la β-galactosidase, le X-Gal. Le contrôle de transactivation s'étant révélé négatif pour les phénotypes Leu et LacZ, cette construction a servi d'appât dans le criblage de la banque d'ADNc.



Figure 72 : Mise en place du système doublehybride. A. Vérification de l'expression : Le niveau d'expression de la protéine de fusion LexA-CPP dans le clone choisi a été comparé à celui de la protéine LexA seule par Western-blot avec l'anti-LexA (1/100). B. Test de la transactivation : Afin de vérifier si la simple présence dans la levure du domaine BD porté LexA-CPP et du domaine AD porté par le vecteur vide pB42AD donne un signal positif d'interaction, les levures sont repiquées sur des boîtes de Gal-UHTL et Gal-UHT X-Gal.

#### c) Transformation de la banque

Pour notre crible, nous avons utilisé une banque d'ADNc correspondant à des ARNm présents entre 8 h et 16 h de développement, phase de développement où se manifeste le phénotype *alx* nul.

Après transformation de la banque, les levures sont directement étalées sur un milieu sélectif pour l'interaction (milieu Gal-UHTL). Les clones capables de croître sur ce milieu sont ensuite repiqués sur milieu Gal-UHT/X-Gal pour tester l'induction du gène *lacZ* et confirmer l'interaction. Environ 40 clones ont été obtenus au cours de ce crible. Ces clones, positifs sur les deux milieux de sélection, sont lysés afin de récupérer le plasmide pB42AD et l'ADNc qu'il contient. Ce plasmide est ensuite séquencé grâce à une amorce qui s'hybride sur le vecteur en 3' du gène d'intérêt.

La recherche des séquences partielles des clones positifs dans la banque Dictybase (http://dictybase.org) a permis la détermination complète de la séquence et l'identification du gène grâce au logiciel BLAST 2.0.

#### 2. Analyse sommaire des clones positifs

Les différents clones obtenus peuvent être classés en 3 groupes présentés dans le tableau ci-dessous :

Groupe	Gène (nombre de fois identifié)	Commentaires
l Ubiquitine	Polyubiquitine (13)	Ces deux familles de protéines vont générer de l'ubiquitine libre dans une cellule après coupure par des enzymes de déubiquitination à l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine (Finley et al., 1989; Muller- Taubenberger et al., 1989; Weissman, 2001).
	Fusion ubiquitine- protéine ribosomale (6)	
II Présence d'un motif de reconnaissance de l'ubiquitine	Rad23 (3)	Rad23 et SonA (homologue de Dsk2) sont impliquées dans la présentation des protéines ubiquitinées au protéasome (Funakoshi et al., 2002; Hartmann-Petersen and Gordon, 2004 ; Pukatzki et al., 2000 ). Ces deux protéines sont caractérisées par la présence en N-terminal d'un domaine UBL ( <i>ubiquitin-like domain</i> , dont la structure est très
	proche de celle de l UBA ( <i>ubiquitin-assoc</i> possède même deu contenant le domain SonA (4) l'ADNc isolé des Levr	proche de celle de l'ubiquitine (Walters et al., 2002)) et d'un domaine UBA ( <i>ubiquitin-associated domain</i> ) en C-terminal (la protéine Rad23 en possède même deux). Dans les deux cas, seule la partie C-terminale contenant le domaine UBA et non le domaine UBL était présente dans l'ADNc isolé des Levures.

	CPP-IP1 (1)	Deux protéines inconnues, une possédant un domaine CUE et une autre possédant un domaine UBA ont également été identifiées. Nous les avons respectivement appelés CPP-IP1 et CPP-IP2 (pour <i>CPP-interacting</i> <i>proteins</i> 1et 2).
	CPP-IP2 (1)	
III Actin-binding proteins	Formine1/H (1)	Deux gènes codant pour des protéines appartenant à la famille des Formines ont été identifiés que nous avons appelé Formine 1 et Formine 2. Les formines sont des protéines multimodulaires qui participent à la dynamique et au remodelage du cytosquelette aussi bien d'actine que de microtubules (Wallar and Alberts, 2003). Cette famille de protéines est très conservée depuis la levure jusqu'à l'homme et comprend 10 membres chez <i>Dictyostelium</i> (Rivero et al., 2005).
	Formine 2/J (1)	

Tableau 19 : Récapitulatif des différents clones obtenus lors crible double-hybride.

#### II. ANALYSE DU LIEN ENTRE ALIX ET L'UBIQUITINE

#### 1. Dd-Alix est ubiquitiné dans la Levure

Dans un premier temps, nous avons cherché à confirmer l'interaction entre AlixCPP et l'ubiquitine. Pour cela, l'ubiquitine a été sous-clonée dans le vecteur pB42AD (voir Annexe). Cette construction a été transformée dans les levures exprimant AlixCPP ou le vecteur pLexA seul. Seule la souche contenant AlixCPP est capable de croître sur milieu Gal-UHTL et présente une activité ßgalactosidase sur milieu Gal-UHT/X-Gal (Fig.73) confirmant de ce fait l'interaction CPP/ubiquitine.



Figure 73 : Test de l'interaction entre LexA-CPP et pB42AD-Ub. Après transformation des levures portant la construction LexA seule ou LexA-CPP avec pB42AD-Ub, une dizaine de clones ayant poussé sur Glu-UHT est repiquée sur les milieux sélectifs pour l'interaction : Gal-UHT/X-Gal et Gal-UHTL. Ne sont montrés ici que deux clones pour chacun des milieux sélectifs pour l'interaction. Une analyse approfondie par des logiciels appropriés (SMART, ELM...) de la séquence protéique du domaine CPP ne permet pas d'identifier un domaine de fixation de l'ubiquitine. On ne peut exclure toutefois la présence d'un motif jusqu'alors non décrit. Toutefois, nos essais de pull-down du domaine AlixCPP à l'aide de la protéine de fusion GST-ubiquitine se sont révélés infructueux. Ces observations nous ont amenés à proposer et tester une autre hypothèse pour expliquer cette interaction, ceci au vu des autres protéines identifiées dans le screen (groupe II). Les protéines du Groupe I sont utilisées pour générer de l'ubiquitine libre dans une cellule. De part sa position dans les protéines identifiées, ce domaine ubiquitine va rester fusionné au domaine d'activation du facteur de transcription apporté par le vecteur après clivage protéolytique. Si Alix-CPP est ubiquitiné à partir de ce pool d'ubiquitine, il pourrait en résulter un signal positif d'interaction du fait du rapprochement entre le domaine d'activation lié à l'ubiquitine et le domaine de liaison à l'ADN fusionné à AlixCPP. Cette hypothèse permettrait également d'expliquer pourquoi des protéines possédant un domaine de fixation de l'ubiquitine ont pu être identifiées (groupe II). En effet, si Alix-CPP est ubiquitiné par le pool d'ubiquitine de la levure, l'appât va alors pouvoir interagir, *via* son étiquette ubiquitine, avec des protéines possédant des motifs de reconnaissance de l'ubiquitine.



Figure 74 : Modèle pour expliquer que les protéines du groupe I et II interagissent avec Alix. A. Modèle avec une protéine du groupe I: La polyubiquitine permet de générer après clivage de l'ubiquitine libre dans la cellule. L'ubiquitine la plus en N-terminale va rester fusionnée au domaine d'activation (AD) apporté par le vecteur. Si cette ubiquitine est utilisée pour ubiquitiner AlixCPP, le rapprochement entre le domaine d'activation (AD) porté par l'ubiquitiné et le domaine de liaison (DB) porté par AlixCPP peut donner un signal positif d'interaction. B. Modèle avec une protéine du groupe II: SonA contient un domaine de reconnaissance de l'ubiquitine de la levure, la protéine SonA peut venir se fixer sur cette ubiquitine grâce à son domaine UBA ce qui conduit au rapprochement entre le domaine AD et DB et donne un signal positif d'interaction.

La conjugaison de l'ubiquitine sur une protéine cible se fait par l'intermédiaire d'un lien amide (isopeptide) entre le carboxyle de la glycine  $Gly^{76}$  de l'ubiquitine et le groupement  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la

chaîne latérale d'une lysine de la protéine cible (Pickart, 2001) (voir Introduction Fig.8). Une ubiquitine délétée de ses deux glycines terminales ne peut donc plus servir à l'ubiquitination d'une protéine cible. Par contre, une telle mutation n'interfère pas avec la reconnaissance de l'ubiquitine par les motifs classiques UBA, UIM, NFZ et CUE (Bilodeau et al., 2003).

Afin de vérifier l'hypothèse d'une ubiquitination d'Alix-CPP dans la Levure, nous avons testé l'interaction en système double-hybride de la construction LexA-CPP avec une ubiquitine délétée de ses deux glycines terminales, Ub $\Delta$ GG. La construction Ub $\Delta$ GG a donc été sous-clonée dans le vecteur pB42AD (voir Annexe).



Figure 75 : Test de l'interaction entre LexA-CPP et pB42AD-Ub∆GG. Après transformation des levures portant la construction LexA-CPP avec pB42AD-Ub∆GG, une dizaine de clones ayant poussé sur Glu-UHT est repiquée sur milieux sélectifs pour l'interaction : Gal-UHT/X-Gal et Gal-UHTL. Ne sont représentés ici que deux clones pour chacun des milieux sélectifs.

Comme le montre la Fig.75, la délétion des deux glycines terminales de l'ubiquitine conduit à une perte totale de la croissance sur milieu Gal-UHTL et à une absence d'activité ß-galatosidase sur milieu Gal-UHT/X-Gal (clones blancs). Ce résultat conforte donc l'hypothèse que l'interaction entre AlixCPP et l'ubiquitine déduite du crible double-hybride résulte en fait d'une ubiquitination de l'appât AlixCPP.

#### 2. Le site d'ubiquitination est porté par le domaine PP

Afin de déterminer plus précisément où se situe le site d'ubiquitination, deux autres constructions d'Alix ont été testées en système double-hybride. Ces constructions sont présentées dans la Fig.76.



Figure 76 : Représentation schématique des constructions utilisées en double-hybride.

Les constructions AlixPP (aa 653-794) et AlixCPP $\Delta$ Pro (aa 593-697) ont été sous-clonées dans le vecteur *pLexA*. Après vérification du niveau d'expression des protéines appât, les clones ont été transformés avec les constructions pB42AD-Ub ou pB42AD-Ub $\Delta$ GG. Comme le montre la Fig.77, la construction AlixPP donne un signal positif sur les deux milieux de sélection, contrairement à la construction AlixCPP $\Delta$ Pro. Le site d'ubiquitination est donc porté par le domaine PP.



La conclusion la plus directe qui résulte de ces résultats est que le site d'ubiquitination est présent entre les acides aminés 697 et 794, région correspondant à la différence entre les deux constructions. On ne peut exclure toutefois la possibilité que la délétion du domaine Pro dans l'appât AlixCPP $\Delta$ Pro modifie la conformation de la protéine et empèche l'ubiquitination de l'appât, auquel cas, le site d'ubiquitination serait situé entre les acides aminés 653 et 697. Le domaine PP contient cinq lysines dont une seule lysine dans la région 697-794, la lysine K<sup>792</sup>. La mutation K<sup>792</sup>A a été introduite dans l'appât AlixPP pour tester la possibilité que cette lysine soit effectivement le site d'ubiquitination. Pour des raisons que nous n'avons pu identifier, cette construction n'était pas exprimée chez la Levure. Nous avons donc pourvuivi nos travaux chez *Dictyostelium*.

#### 3. Alix est ubiquitiné chez Dictyostelium

L'approche double-hybride a révélé que le domaine CPP d'Alix pouvait être ubiquitiné chez la Levure. La suite de ce travail a donc été de vérifier l'existence d'une telle régulation chez *Dictyostelium*.

L'état d'ubiquitination de la protéine Dd-Alix chez *Dictyostelium* a été abordé par des expériences d'immunoprécipitation dans la souche parentale ou sur les surexpresseurs des formes tronquées décrites dans le Chapitre I. La présence d'ubiquitine sur la protéine immunoprécipitée est décelée par l'anticorps anti-ubiquitine P4D1 (Santa Cruz).



**Figure 78 : Western-blot anti-Alix et anti-ubiquitine des immunoprécipitations faites avec l'anticorps anti-Alix.** Des immunoprécipitations faites sur les cellules *alx* nulles, KAx-3, *alx* nulles exprimant Alix<sub>myc</sub>, AlixNt<sub>myc</sub> et AlixCt<sub>myc</sub> au stade végétatif avec l'anticorps anti-Alix sont révélées avec l'anti-Alix (1/1000) pour contrôler que la protéine est bien immunoprécipitée et avec l'anti-ubiquitine (1/100, P4D1, Santa Cruz) pour vérifier si les protéines sont ubiquitinées.

Le Western-blot de la Fig.78 montre que la protéine endogène est effectivement ubiquitinée : une bande aux alentours de 100 kDa apparaît dans la souche KAx-3 qui n'est pas présente dans la souche *alx* nulle. Cette ubiquitination est retrouvée avec la construction  $Alix_{myc}$  et n'est pas modifiée par l'entrée en développement. Dans les deux cas, la mobilité électrophorétique de la protéine ubiquitinée est en faveur d'une mono-ubiquitination. Le signal est absent dans la souche *alx*/Nt<sub>myc</sub> même sur des quantités plus importantes de matériel immunoprécipité. En revanche, la construction  $AlixCt_{myc}$  est très clairement poly-ubiquitinée comme l'indique l'échelle régulière observée sur le Western blot avec l'anticorps P4D1. Ces formes poly-ubiquitinées du Ct<sub>myc</sub> sont à peine détectables avec l'anticorps  $\alpha$ -alix et ne représentent donc qu'un faible pourcentage de la protéine totale.

Au cours du développement, la construction  $Ct_{myc}$  est rapidement dégradée au fur et à mesure de son expression (Voir Chap. I, paragraphe IV-1, Fig38). Il est tentant de penser que la protéine  $Ct_{myc}$ polyubiquitinée est prise en charge par le protéasome. Des immunoprécipitations du domaine  $Ct_{myc}$  ont donc été réalisées en phase végétative et en cours de développement (4h de pulses d'AMPc qui mime l'agrégation) en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG132. Les effets du MG132 (100  $\mu$ M) ont été démontrés chez *Dictyostelium* (Pukatzki et al., 2000). Le MG132 freine la dégradation de la protéine  $Ct_{myc}$  pendant la phase de développement (Fig.79), suggérant que cette dégradation développementale met en jeu le protéasome. Par ailleurs, pendant la phase végétative, l'addition de MG132 se traduit par un renforcement du profil de poly-ubiquitination du domaine (Fig.79), un résultat compatible avec un turn-over déjà présent dans la phase végétative mais lent.



**Figure 79 : Western-blot anti-myc et anti-ubiquitine des immunoprécipitations faites avec l'anticorps anti-myc en présence ou non de MG132.** Des immunoprécipitations faites avec l'anticorps anti-myc sur les cellules *alx* nulles exprimant AlixCt<sub>myc</sub> au stade végétatif ou après 4h de pulse d'AMPc, en présence ou non de 100 μm de MG132, sont révélées avec l'anti-myc (1/1000) pour contrôler que les protéines sont bien immunoprécipitées et avec l'anti-ubiquitine (1/100, P4D1, Santa Cruz) pour vérifier si les protéines sont ubiquitinées.

La mutation  $K^{792}A$  a été introduite dans la construction AlixCt<sub>myc</sub> pour tester chez *Dictyostelium* si cette lysine était le site d'ubiquitination (voir Chap. III, paragraphe II-2 et annexe pour le détail de la construction). Comme le montre la Fig80, la poly-ubiquitination de la partie C-terminale d'Alix n'est pas affectée par cette mutation. Ce résultat implique que soit la lysine  $K^{792}$  n'est pas la lysine cible de l'ubiquitination, soit que d'autres lysines sont ubiquitinées en l'absence de la lysine  $K^{792}$ .



Comme le suggérent les résultats du double-hybride, la partie C-terminale d'Alix semble bien porter un signal d'ubiquitination qui conduit à une polyubiquitination de la protéine. La nature de la polyubiquitination du domaine C-terminal (poly- ou poly-mono-ubiquitination) reste à déterminer. La protéine endogène Alix par contre semble plutôt mono-ubiquitinée. Par rapport à Alix, la construction C-terminale est dépourvue de la partie N-terminale qui inclut notamment le domaine Bro1. Il est envisageable que ce domaine replié sur l'extrémité C-terminale régule le niveau d'ubiquitination de la protéine et son turn-over dans la phase développementale.

#### **III.** LA FORMINE, UN PARTENAIRE D'ALIX ?

#### 1. Description des deux formines identifiées

Deux formines (que nous avons appelées Formine 1 et 2) ont été identifiées comme partenaires potentiels d'Alix dans le crible double-hybride. Les formines sont des protéines multimodulaires définies par la présence d'un domaine FH2 (Formin homology 2) capable de nucléer l'actine, précédé d'un domaine FH1 (Formin homology 1) riche en prolines. Ces deux domaines sont souvent accompagnés d'un domaine moins conservé, le domaine FH3 (Formin homology 3) impliqué dans la localisation de la protéine, situé en N-terminal de celle-ci. Certaines formines, appelées Diaphanous-related formins sont capable d'interagir avec des GTPases de la famille Rho grâce à leur domaine GBD (GTPase binding domain) situé à proximité du domaine FH3. En absence de GTPase activée, la protéine a une conformation fermée due à une interaction entre son domaine GBD et son domaine DAD (Diaphanous autoregulatory domain) présent à l'extrémité C-terminale de la protéine. Ces protéines très conservées parmi tous les eucaryotes sont impliquées dans la régulation de l'organisation du cytosquelette aussi bien d'actine que de microtubules. En effet, le domaine FH2 peut modifier la dynamique de la polymérisation de l'actine en (i) accélérant la nucléation de nouveaux filaments, (ii) modifiant le taux de polymérisation/ dépolymérisation des filaments, (iii) empêchant la fixation de protéines de « capping » à l'extrémité barbée à croissance rapide du filament. Ces fonctions sont potentialisées par le domaine FH1, situé à proximité du domaine FH2, capable de recruter notamment la profiline. Cette activité permet aux formines de générer des câbles linéaires d'actine (Higgs, 2005). Les formines modulent également l'organisation des microtubules (stabilité et orientation des microtubules) mais si cette activité dépend de la nucléation de l'actine reste encore à clarifier. Ces propriétés permettent aux formines d'être impliquées dans une grande diversité de processus comme la formation des filipodes, des lamellipodes, le transport de vésicules, le positionnement des noyaux et du centre organisateur des microtubules, la formation de l'anneau contractile d'actine lors de la division cellulaire...(pour revue, (Wallar and Alberts, 2003)).

**Dd-For1/Dd-ForH** : Le gène Dd-For1/Dd-ForH (DDB0231180) situé sur le chromosome 4, présente trois introns de 355, 193 et 98 nucléotides en position 465, 1030 et 1440 de l'ADN génomique. Ce gène code pour une protéine de 1087 acides aminés, de masse moléculaire théorique de 121,5 kDa. Cette protéine comprend différents domaines que l'on retrouve dans la plupart des protéines de la famille des *Diaphanous-related formins* : un domaine de liaison aux GTPases de la famille Rho (aa 40 à 217, domaine GBD PFAM : PF06371), un domaine FH3 (aa 223 à 405, domaine PFAM : PF06367), un domaine FH1 (aa 501 à 622), un domaine FH2 (aa 623 à 1032, domaine PFAM : PF02181) et un domaine DAD (aa 1011 à 1041).

**Dd-For2/Dd-ForJ** : La formine 2 (DDB0231185) est une protéine de 1220 acides aminés, de masse moléculaire théorique de 135, 8 kDa qui est codée par le gène Dd-For2 présent sur le chromosome 5, présentant un seul intron de 115 nucléotides en position 190 de l'ADN génomique. La protéine présente les mêmes domaines GBD (aa 6 à 189), FH3 (aa 192 à 386), FH1 (aa 465 à 656), FH2 (aa 657 à 1029) et DAD (aa 1081 à 1111).



**Figure 81 : Représentation schématique des protéines Formine 1 et Formine 2 chez Dictyostelium.** Ces deux protéines possèdent les domaines classiquement présents dans cette famille à savoir une région N-terminale contenant le domaine GBD, suivie d'un domaine FH3 nécessaire à la localisation puis d'une région riche en prolines (FH1) et un domaine C-terminal qui peut polymériser l'actine (FH2) contenant ou situé à proximité d'un sous domaine DAD qui peut inetragir avec le domaine GBD.

Les ADNc isolés des Levures ont été séquencés dans leur totalité de façon à connaître avec précision les domaines fonctionnels présents dans le fragment de protéine codée par l'ADNc. Pour la Formine 1, le clone identifié se limite aux acides aminés 916 à 1087. Dans le cas de la Formine 2, il code pour un fragment incluant les acides aminés 944 à 1220. La région d'interaction avec l'appât AlixCPP se limite donc à l'extrémité C-terminale des formines contenant le domaine FH2 et le domaine régulateur DAD.

Seuls les travaux concernant la Formine 1 sont présentés dans la suite du manuscrit.

# 2. Confirmation de l'interaction entre AlixCPP et la Formine 1 chez la Levure

Un certain nombre de contrôles ont été réalisés pour confirmer l'interaction de l'appât AlixCPP avec Dd-For1. Le domaine identifié en double-hybride (Dd-For1FH2) porté par le vecteur pB42AD a été co-transformé avec le vecteur pLexA seul ou pLexA :CPP. Après quelques jours de sélection sur milieux Gal-UHTL et Gal-UHT/X-Gal, les clones sont positifs avec AlixCPP pour la double sélection et négatifs avec le vecteur pLexA seul (Fig.82).

Afin de préciser le site de reconnaissance dans le domaine CPP, la construction a été testée pour son interaction avec le domaine PP (aa 653 à 794) et le domaine CPP $\Delta$ Pro (aa 593 à 697).



**Figure 82 : Test des interactions LexA seule, LexA-CPP/FH2, LexA-PP/FH2 et LexA-CPP**Δ**Pro/FH2.** Après transformation des levures portant soit la construction LexA seule soit LexA-CPP, soit LexA-PP soit LexA-CPPΔPro avec pB42AD-FH2 (construction identifiée lors du screen avec la banque), une dizaine de clone ayant poussé sur Glu-UHT est repiquée en milieu sélectifs pour l'interaction : Gal-UHT/X-Gal et Gal-UHTL. Ne sont représentés ici que deux clones pour chaque constuction repiqués sur milieu Gal-UHT/X-Gal.

Comme le montre la Fig.82, les deux constructions sont capables d'interagir avec Dd-For1FH2. Le site d'interaction se situe donc dans la région commune à ces constructions allant des acides aminés 653 à 697 d'Alix (Fig.83). On ne peut exclure toutefois que l'interaction cellulaire avec la Formine 1 mette en jeu plusieurs zones d'interaction au niveau d'AlixCPP.



Figure 83 : Schéma récapitulatif des domaines d'interaction entre Alix et la Formine 1.

# 3. Confirmation de l'interaction entre le domaine FH2 de la Formine 1 et Dd-Alix *in vitro*

Dans un premier temps, nous avons cherché à confirmer l'interaction For1-FH2/Alix par des approches *in vitro*.

Le domaine FH2 (aa 622 à 1087) de For1 a été exprimé sous forme de protéine fusion avec la GST (GST-FH2<sub>myc</sub>) (voir Annexe) dans des conditions optimisées pour maximiser la production de la protéine sous forme soluble : 0,1 mM IPTG à 21°C. Après purification sur billes de Sepharose-glutathion, la protéine a été éluée et séparée de son étiquette GST par clivage par la thrombine. Parallèlement, les protéines GST et GST-AlixPP ont été purifiées et conservées sur la colonne de

Sepharose-glutathion. Une quantité équivalente de billes de Sepharose-glutathion seules ou couplées à la GST ou à la GST-AlixPP ont été mises en présence d'un excès de protéines  $FH2_{myc}$ . L'interaction a été testée en présence de 2 mM calcium ou 2 mM d'EDTA. L'interaction est révélée par Western-blot avec un anticorps  $\alpha$ -myc. Comme le montre la Fig.84, la protéine  $FH2_{myc}$  interagit spécifiquement avec le domaine PP d'Alix. Cette interaction n'est pas influencée par la présence d'ions calcium.



**Figure 84 : Western-blot**  $\alpha$ -myc du pull-down. Les billes de Sepharose-glutathion seules ou couplées à la GST ou à la GST-AlixPP sont incubées en présence de protéines FH2<sub>myc</sub> dans un tampon Hepes (10 mM Hepes, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, ou 2 mM EDTA ainsi que 1 µg/ml leupeptine, 1 µg/ml pepstatine, 1 µg/ml aprotinine) contenant soit du calcium soit de l'EDTA pendant une heure sur une roue à 4°C. Après lavages, un extrait protéique de chaque condition est testé par Western-blot avec l'anticorps anti-myc (1/1000) pour vérifier si la protéine FH2<sub>myc</sub> est présente.

L'interaction For1/Alix a également été confimée par Biacore par G. Klein en fixant covalement les protéines GST ou GST-AlixPP sur des chips distinctes. La protéine  $FH2_{myc}$  purifiée est amenée au contact des chips par l'intermédiaire d'un système microfluidique.



**Figure 85 : Interaction entre la Formine1 et AlixPP par Biacore.** L'analyse est effectuée en faisant passer 60  $\mu$ l d'une solution de FH2<sub>myc</sub> diluée dans du tampon HN2Ca (10 mM Hepes pH7,5, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) par l'intermédiaire du système microfluidique. Les deux tracés correspondent à la liaison de la Formine 1 sur la GST seule ou GST-AlixPP. L'interaction est bien spécifique d'AlixPP.

On observe dans les deux cas une courbe avec une phase d'association qui correspond à la période où le tampon injecté contient la protéine  $FH2_{myc}$  et une phase de dissociation où le tampon est seul, sans protéine d'intérêt. Lorsque la chip est couplée à la protéine GST-PP, le signal obtenu est beaucoup plus important que celui obtenu avec la chip liée à la GST seule. En utilisant des solutions avec différentes concentrations de  $FH2_{myc}$ , une constante de dissociation de l'ordre de 2  $\mu$ M a pu être déterminée.

#### 4. La Formine 1 est-elle un partenaire d'Alix in vivo?

Plusieurs expériences ont été réalisées visant à démontrer la réalité physiologique de l'interaction For1/Alix chez *Dictyostelium*. A ce stade du travail, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une telle interaction *in vivo*. Les trois parties suivantes présentent les approches suivies et les outils qui ont été développés dans cette optique.

## a) Essais d'immunoprécipitation de FH2<sub>myc</sub> et Alix in vivo

(1) Caractérisation de la souche KAx-3/FH2myc

Le domaine FH2 de la formine 1 a été sous-cloné dans le vecteur d'expression Exp4<sup>+</sup>, avec une étiquette *myc* en C-terminal (voir Annexe) et exprimé dans les cellules KAx-3 (Fig.86A). La construction s'exprime correctement mais de façon surprenante une seconde bande correspondant à une protéine d'une centaine de kilodaltons est révélée par l'anticorps anti-myc. Il pourrait s'agir d'un dimère SDS-insensible puisque la protéine  $FH2_{myc}$  fait environ 52 kDa. Les cellules exprimant cette construction ne présentent pas de défauts majeurs quand elles sont cultivées en boîtes de Petri mais ne se multiplient plus en culture agitée. Ce défaut pourrait être attribué à un effet sur la division cellulaire lorsque les cellules sont soumises à une agitation. Lorsque ces cellules sont placées en situation de carence nutritive, elles réalisent complètement leur cycle de développement et forment des fructifications matures (Fig.86B).





Comme les formines ont un rôle dans la régulation du cytosquelette, nous avons vérifié par immunofluorescence si les réseaux de microtubule ou d'actine étaient perturbés par la surexpression du domaine FH2, ce qui aurait pu expliquer un éventuel problème de division cellulaire. Les microtubules sont révélés par l'utilisation d'un anticorps  $\alpha$ -tubuline et l'actine est marquée par la phalloïdine-TRITC. Comme le montre la Fig.87, aucune différence majeure dans l'organisation du cytosquelette n'a pu être observée entre la souche parentale et le surexpresseur.



Figure 87 : Etude du cytosquelette dans les cellules KAx-3 surexprimant la construction FH2<sub>myc</sub>. Les cellules KAx-3 et KAx-3 exprimant la protéine FH2<sub>myc</sub> au stade végétatif sont fixées en paraformaldéhyde 4% et perméabilisées en présence de 0,2% Triton X-100. Le réseau de microtubule est détecté par l'anticorps secondaire antisouris marqué au FITC, après une première incubation avec l'anti-tubuline (1/2000). Le noyau est marqué au DAPI et la F-actine avec du TRITC-phalloidine (1/800). Les cellules sont ensuite observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x.

#### (2) Echec de la co-immunoprécipitation du domaine FH2 avec Alix

Nous avons utilisé cette souche pour tester l'interaction entre la protéine  $FH2_{myc}$  et la protéine Alix endogène par immunoprécipitation. Que ce soit par une immunoprécipitation de la protéine  $FH2_{myc}$  avec l'anticorps  $\alpha$ -myc ou de la protéine Alix avec l'anticorps  $\alpha$ -Alix, nous n'avons pas réussi à co-immunoprécipiter les deux protéines. Plusieurs raisons peuvent expliquer cet échec : les conditions expérimentales utilisées (tampons, moment dans le cycle de développement....) ne sont pas propices à révéler l'interaction ; cette interaction ne met en jeu qu'une toute petite fraction de la protéine Alix soluble ; ou bien l'interaction se fait au niveau de la fraction membranaire d'Alix qui n'est pas solubilisée dans le tampon d'immunoprécipitation utilisé.

## *b)* Essai de co-imunoprécipitation et de co-localisation des protéines endogènes Alix et Formine 1

Afin de travailler sur les protéines endogènes, nous avons entrepris la production d'un anticorps  $\alpha$ -For1. La fraction de la protéine GST-FH2<sub>myc</sub> retrouvée dans les corps d'inclusion lors des essais d'expression à 37°C en présence de 1 mM d'IPTG a été utilisée pour immuniser des lapins en vue d'obtenir des anticorps spécifiques de la Formine 1. Le sérum a été validé par Western-blot sur des échantillons protéiques dérivant de la souche parentale et de la souche *for1* nulle (voir paragraphe 4c). Une protéine à la taille attendue de ~ 120 kDa est détectée dans la souche parentale et absente dans la souche *for1* nulle. Curieusement, une autre protéine d'environ 70 kDa est également reconnue par l'anticorps dans la souche sauvage et disparaît dans la souche invalidée. Il pourrait s'agir d'un produit de dégradation de la Formine 1. Le sérum a été purifié sur une colonne de GST-FH2 dépourvue d'étiquette *myc*. Après purification, le serum reconnait la Formine 1 comme protéine majeure par Western-blot.



Des essais de co-immunoprécipitation des protéines endogènes Alix et Formine 1 ont été réalisés à différents stades du cycle de développement mais n'ont pas permis de confirmer l'interaction entre les deux protéines. De façon décevante, l'anticorps  $\alpha$ -For1 n'a pas permis d'approches d'immunofluorescence.

#### c) Invalidation de Dd-Formine 1

L'invalidation d'*alx* se traduisant par un phénotype marqué de développement, nous avons voulu vérifier si l'invalidation de Dd-*for1* se traduisait par le même résultat. Pour cela, une souche nulle a été réalisée par recombinaison homologue (voir annexe pour détails). Après clonage sur un tapis de *K. aerogenes* et extraction de l'ADN génomique d'une dizaine de clones, l'insertion de la cassette *Bsr* dans le locus de Dd-*for1* a été testée par PCR en utilisant des amorces de part et d'autre de

la cassette (F3/F4). Dans la souche parentale KAx-3, cette PCR se traduit par l'amplification d'un fragment d'environ 600 pb absent dans les cellules ayant intégré la cassette *Bsr*.



Figure 89 : Analyse de l'obtention de mutants nuls pour le gène for1 et vérification du phénotype. A. Test par PCR: Une première approche dans la recherche de clones invalidés pour le gène for1 a été réalisée par PCR en utilisant les amorces F3/F4 situées de part et d'autre de la cassette Bsr. Seules les souches non invalidées autorisent l'amplification du fragment. B. L'invalidation du gène a été confirmée par Southern-blot : Après coupure par EcoRV de l'ADN génomique des clones sélectionnés, le gène for1 est révélé par l'hybridation de la sonde F3/F4 marquée au DIG. L'insertion de la cassette Bsr se traduit pas la disparition de la bande à 2500 pb et l'apparition d'une bande à 3800pb (2500+1300). C. Vérification du cytosquelette d'actine : Les cellules KAx-3 et for1 nulles au stade végétatif sont fixées en paraformaldéhyde 4% et perméabilisées en présence de 0,2% Triton X-100. Le noyau est marqué au DAPI et la F-actine avec du TRITCphalloidine (1/800). Les cellules sont ensuite observées sur un microscope inversé Axiovert ZEISS au 63x. D. Vérification du phénotype : Les cellules for1 nulles sont étalées sur un milieu gélosé Na/K phosphate. L'absence de nutriments induit le programme de développement multicellulaire. Après 24 heures de carence nutritive, les cellules forment des fructifications matures normales

Parmi les 10 clones testés, la PCR indique que 4 sont potentiellement invalidés (Fig.89A). L'insertion de la cassette Bsr a été confirmée par Southern-blot pour les clones 2 et 4 (Fig.89B). L'ADN génomique des clones sélectionnés a été digéré par l'enzyme de restriction EcoRV qui possède plusieurs sites dans le gène *for1* dont deux de part et d'autre du lieu d'insertion de la cassette (nucléotide 340 et nucléotide 2882). Dans la souche parentale, la sonde F3/F4 marquée à la digoxigénine s'hybride à un fragment de 2,5 kb. Dans la souche invalidée, cette bande disparaît au profit d'un fragment de 3,8 kb (2,5 kb + 1,3 kb pour la casette Bsr). Les clones 2 et 4 sont invalidés de façon certaine. Seul le clone 2 a été conservé dans la suite des expériences.

En phase végétative, le mutant *for1* nul présente un défaut net dans la formation des pseudopodes qui sont moins abondants que dans la souche parentale (Fig.89C). En situation de carence nutritive la souche *for1* nulle différencie des fructifications semblables à celles de la souche KAx-3 (Fig.89D).

L'invalidation du gène codant pour la Formine 1 ne se traduit donc pas par un phénotype anormal de développement comparable à celui de la souche *alx* nulle. Si ces deux protéines sont impliquées dans la même voie de signalisation, elles n'ont clairement pas la même importance. Un certain nombre d'expériences utilisant la souche *for1* nulle sont en cours visant à répondre notamment aux questions suivantes :

- Quelle est la localisation des protéines Alix, Vps32 et Vps4 dans la souche for1 nulle ?

- L'invalidation de la formine modifie-t'elle la morphologie du compartiment vps32 et du compartiment  $E^{235}Q$  ?
- Peut-on détecter la présence d'actine à la périphérie du compartiment vps32 et comment la mutation *for1* nulle influence-t-elle cette distribution ?

Par ailleurs, nous cherchons actuellement à préciser si la protéine Alix modifie l'activité de polymérisation de l'actine de la formine 1 sur système purifié.

Pour conclure, l'approche double-hybride a permis d'identifier deux formines différentes comme partenaires d'Alix. L'interaction entre le domaine FH2 de la Formine 1 et le domaine AlixPP a pu être confirmée *in vitro* mais pas *in vivo*. La difficulté à confirmer l'interaction des protéines en situation cellulaire nous laisse penser que la Formine 1 n'est peut être pas le partenaire physiologique de Dd-Alix. Dix formines sont codées par le génome de *Dictyostelium*. Notre hypothèse actuelle est que Dd-Alix interagit spécifiquement avec une autre formine au niveau du domaine FH2 et que la spécificité d'interaction est assurée par le domaine N-terminal. La perte du domaine N-terminal (comme dans le cas des protéines recombinantes GST-For1FH2 ou des clones de cDNA isolés chez la Levure) conduit à une perte de la spécificité. D'où l'interaction d'Alix avec les formines 1 et 2.

#### **IV.**DISCUSSION

Dans l'optique d'identifier de nouveaux partenaires et de confirmer des interactions déjà décrites dans d'autres organismes, nous avons entrepris un crible double-hybride à partir d'une banque développementale de *Dictyostelium*. La protéine tronquée Alix-CPP a servi d'appât dans ce crible. Les interactants obtenus ont pu être classés en deux catégories : **0** des protéines associées au processus d'ubiquitination et **2** des protéines de la famille des formines.

#### 1. Dd-Alix est ubiquitiné

Dans la catégorie **1**, un premier groupe inclut les polyubiquitines 5, 7 et les protéines de fusion ubiquitine-protéines ribosomales (Ub-CEP52 et Ub-S27a), autant de sources d'ubiquitine libre pour la cellule après clivage protéolytique des entités ubiquitine. Dans le deuxième groupe, les candidats présentent tous des sites de reconnaissance de l'ubiquitine et sont donc susceptibles d'interagir avec des protéines ubiquitinées.

L'interaction de Dd-Alix avec l'ubiquitine seule a été confirmée en double-hybride puis réinterprété au vu (1) de l'absence de domaine de reconnaissance de l'ubiquitine dans l'appât, (2) de nos essais infructueux visant à confirmer l'interaction *in vitro* (pull down avec une construction GST-Ub, Biacore et blot overlay) et (3) des autres candidats de la catégorie ①. En effet, un même résultat serait obtenu si le domaine AlixCPP était ubiquitiné dans la levure à partir de l'ubiquitine générée par certaines protéines de la banque. L'ubiquitine reste fusionnée au domaine d'activation du facteur de transcription apporté par le vecteur même après clivage protéolytique des polyubiquitines et des protéines de fusion ubiquitine-protéine ribosomale. L'ubiquitination du domaine AlixCPP conduirait à un rapprochement entre le domaine d'activation et le domaine de liaison à l'ADN porté par Alix générant alors un signal positif d'interaction. Cette hypothèse permet également d'expliquer l'identification de protéines possèdant des motifs de liaison à l'ubiquitine. L'utilisation d'une ubiquitine délétée de ses deux glycines terminales a permis de conforter cette hypothèse : l'appât AlixCPP est ubiquitiné dans la levure.

L'ubiquitination de Dd-Alix et de l'extrémité C-terminale d'Alix a été confirmée chez *Dictyostelium*. Le domaine  $Ct_{myc}$  est très clairement polyubiquitiné alors que la protéine entière semble plutôt monoubiquitinée. La différence de pattern d'ubiquitination est à confirmer notamment par l'utilisation du couple d'anticorps FK1 (Tebu) qui ne reconnait que la poly-ubiquitination et FK2 qui reconnait aussi bien la poly- que la mono-ubiquitination. Toutefois, il est possible que le domaine Nterminal, absent de la construction  $Ct_{myc}$ , régule l'ubiquitination de Dd-Alix par modification du repliement de la protéine et de l'accessibilité au(x) site(s) ubiquitinable(s).

A ce stade du travail, il n'a pas encore été établi si l'ubiquitination de Dd-Alix conduit à la dégradation de la protéine (peu probable dans le cas d'une monoubiquitination ou alors par un processus protéasome-indépendant) ou participe à sa fonction. En effet, dans la voie MVB, il a été proposé que la machinerie de tri elle-même soit ubiquitinée en plus de la protéine cible afin de renforcer les interactions entre les différents partenaires possédant des domaines de reconnaissance de l'ubiquitine. Cette hypothèse a été proposée par Dunn et Hicke en 2001 en montrant chez la Levure, que la ligase Rsp5 était nécessaire à l'internalisation de récepteurs portant déjà une étiquette ubiquitine (Dunn and Hicke, 2001). Une conclusion similaire a également été proposée récemment chez les mammifères par Sigismund et coll. dans leur étude de l'internalisation du récepteur à l'EGF (Sigismund et al., 2005). L'ubiquitination des protéines Vps27 (HRS) (Katz et al., 2002 ; Marchese et al., 2003), Eps15 (Polo et al., 2002), Hse1 (STAM) (Katz et al., 2002) notamment soutient cette hypothèse. Cependant, l'ubiquitination de la protéine Tsg101 a été décrite pour diminuer son activité (Amit et al., 2004). Afin de déterminer l'importance de cette régulation dans la fonction d'Alix, il est nécessaire d'identifier les sites précis d'ubiquitination puis d'envisager l'utilisation de mutants ponctuels pour ces sites.

#### 2. Dd-Alix interagit avec les formines?

La catégorie **2** contient deux protéines de liaison à l'actine, de la famille des formines : les formines 1 et 2. Dans le génome de *Dictyostelium*, la Formine 1 que nous avons identifié dans notre criblage correspond à la Formine H et la Formine 2 correspond à la Formine J. Dans ce manuscrit, ne sont présentés que les résultats concernant la formine 1.

L'utilisation de différentes constructions d'Alix a permis de confirmer l'interaction Alix/For1 et de restreindre la zone d'interaction à la région 653-697, intégralement présente dans un fragment de Dd-Alix essentiel au développement multicellulaire (voir Chap. I). Cette interaction a pu être confirmée *in vitro* par des expériences de pull-down et de Biacore.

Plusieurs outils ont été développés (souche surexprimant le domaine FH2, souche nulle, anticorps) dans le but de vérifier la réalité physiologique de cette interaction chez *Dictyostelium*. La mise en place de ces outils a conduit à une caractérisation partielle de la protéine For1 et de son fonctionnement cellulaire indépendamment de son interaction avec la protéine Dd-Alix. Ainsi, nous avons montré que la souche *for1* nulle présente un défaut d'expansion des pseudopodes en phase végétative et que la surexpression du domaine FH2 dans la souche parentale entraîne un défaut de division cellulaire en culture agitée. Ces deux phénotypes peuvent être imputés à un défaut de polymérisation du réseau d'actine. Chez la levure, les formines ont été impliquées dans la division cellulaire : la formine Bni1p intervient dans le positionnement des centrosomes (Lee et al., 1999) et la formine cdc12p est un composant de l'anneau contractile (Chang et al., 1997). Il est possible que la surexpression du domaine FH2 interfère avec le fonctionnement de la formine normalement impliquée dans la mise en place du fuseau mitotique lors de la division. Les anticorps  $\alpha$ -for1 sont inutilisables en immunofluorescence et n'ont pas permis de préciser la localisation de la formine ni d'étayer cette hypothèse.

En ce qui concerne l'interaction de For1 avec Dd-Alix, nos essais de co-immunoprécipitation de la protéine endogène ou du domaine FH2 n'ont pas permis de confirmer cette interaction *in vivo*. A l'heure actuelle, on ne sait pas de façon certaine si Dd-Alix et For1 sont des partenaires physiologiques chez *Dictyostelium*. Toutefois, les difficultés à confirmer l'interaction For1/Alix *in vivo* et l'identification de deux formines différentes dans le crible double-hybride nous amènent à proposer une hypothèse différente : d'après les clones obtenus en double-hybride, l'interaction pourrait être déterminée par la partie N-terminale des formines, notamment le domaine FH3 qui définit la localisation subcellulaire de la protéine. Dans la levure, ce niveau de régulation est inexistant puisque les clones d'ADNc sont limités à la partie C-terminale des formines (domaine FH2 seulement). Cette régulation est également absente des expériences réalisées *in vitro* uniquement avec le domaine FH2. Le génome de *Dictyostelium* code pour 10 formines et, de cette réflexion, il est attendu que Dd-Alix puisse interagir avec le domaine FH2 isolé des 8 autres formines. Pendant cette étude sur la formine 1, le laboratoire de J. Faix a publié une caractérisation détaillée du mutant *for1* nul (confirmant le défaut

de formation des pseudopodes) et une étude biochimique approfondie de For1 qui se comporte telle une formine *bona fide* (Schirenbeck et al., 2005). Leurs études sur la localisation de la Formine 1 avec une étiquette GFP indique que la protéine est essentiellement présente dans les filopodes mais pas associée à des structures vésiculaires confirmant qu'il n'y a sans doute pas co-localisation entre cette protéine et Alix. Par ailleurs, le laboratoire de J. Faix a développé un certain nombre d'outils en vue de caractériser les autres membres de la famille. Une collaboration a été engagée afin de tester les autres formines comme partenaire potentiel de Dd-Alix et également l'effet de Dd-Alix recombinante sur l'activité des différentes formines.

Les formines interviennent dans le remodelage du cytosquelette d'actine et de microtubules mais c'est l'effet sur l'actine qui est le plus connu à l'heure actuelle. L'activité de nucléation de l'actine par le domaine FH2 est particulièrement bien documenté maintenant. In vitro, il est démontré que le domaine FH2 augmente la vitesse de nucléation de l'actine à l'origine de la formation d'un nouveau filament. Ce domaine FH2 peut rester lié à l'extrémité barbée à croissance rapide du filament d'actine, ce qui d'une part empêche la liaison de protéines de capping à cette extrémité et, d'autre part, favorise l'ajout rapide de nouveaux monomères d'actine à cette extrémité du filament permettant ainsi une croissance plus rapide du filament (Pruyne et al., 2002). La polymérisation de l'actine est augmentée par la présence d'un domaine FH1 jouxtant le domaine FH2 et qui interagit avec la profiline, facilitant ainsi le recrutement sur le lieu de la polymérisation d'actine-ATP depuis le complexe profiline-actine (Sagot et al., 2002). Contrairement au complexe Arp2/3 qui nuclée de nouveaux filaments sur les côtés d'un filament préexistant donnant ainsi naissance à un réseau d'actine branché, les formines génèrent des filaments d'actine linéaires (Sagot et al., 2002). Ces protéines interviennent donc dans la formation des câbles d'actine, des fibres de stress et des filopodes. Le domaine FH2 de deux formines, Bni1p et mDia1, a récemment été cristallisé (Shimada et al., 2004 ; Xu et al., 2004b). L'étude concernant Bni1p montre que le domaine FH2 peut être subdivisé en 5 sous domaines : un lasso N-terminal, un segment linker de 17 résidus, une protubérance globulaire, une région en coiled-coil et l'extrémité C-terminale. Le domaine FH2 permet la dimérisation tête bêche de Bnilp par l'interaction de l'extrémité C-terminale d'un monomère avec le lasso de l'autre monomère. La protubérance globulaire, la région coiled-coil et la partie C-terminale entourée du lasso de l'autre monomère constitue un « hémidimère ». Chaque hémidimère constitue un ensemble relativement rigide. Les deux hémidimères sont reliés entre eux de chaque côté par les régions linker. Pour expliquer les effets à la fois de capping et d'augmentation de la polymérisation d'actine, les auteurs proposent un modèle dans lequel un hémidimère resterait fixé au filament d'actine pendant que l'autre hémidimère grâce à la flexibilité apportée par les *linkers* s'en détacherait et fixerait un monomère d'actine. Ce monomère d'actine est alors incorporé au filament et l'autre hémidimère peut à son tour se détacher pour fixer un nouveau monomère. Chaque hémidimère est ainsi alternativement accroché au filament et empêche la dépolymérisation et la fixation de protéines de capping du côté barbé (Xu et al., 2004b). Tous les résidus importants pour la structure et la fonction du domaine FH2 sont conservés dans les dix formines de Dictyostelium (Rivero et al., 2005).



Figure 90 : Structure et Fonctionnement des Formines. A . Vues de dessus et de côté de la structure du dimère de Bni1 (Xu et al., 2004b). B. Modèle pour expliquer le fonctionnement des Formines. Dans un premier temps, le complexe profiline-actine se lie au domaine FH1FH2 d'une formine qui est présente à l'extrémité barbée du filament en cours d'élongation grâce au domaine FH1FH2 de l'autre formine. Chaque formine interagit alors avec un complexe profiline-actine. Après hydrolyse de l'ATP, la profiline présente sur une des formines est libérée dans le cytoplasme et le domaine FH1-FH2 peut de nouveau fixer une nouvelle profiline liée à l'actine. (Romero et al., 2004)

Si un membre de la famille des formines se révèle être un partenaire physiologique de la protéine Dd-Alix, plusieurs rôles peuvent être envisagés, liés à l'élongation de filaments d'actine. Gasman et coll. ont montré que la formine hDia2C régule le mouvement intracytoplasmique des endosomes précoces le long de filaments d'actine via un mécanisme mettant en jeu la kinase c-Src et la G protéine RhoD (Gasman et al., 2003). Alix associé à la membrane de l'endosome pourrait faire le lien avec les filaments par interaction avec la formine. Par ailleurs, le rôle de la formine cdc12 chez S. pombe (Chang et al., 1997) ou S. cerevisiae dans la formation de l'anneau contractile lors de la cytodierèse nous a amenés à avancer une autre hypothèse. Le mécanisme permettant la formation des vésicules intraluminales du MVB est loin d'être élucidé même si l'on sait maintenant que la composition lipidique de la membrane du MVB joue un rôle essentiel dans l'initiation de l'invagination (voir Introduction). Contrairement aux vésicules dérivées de la membrane plasmique dont la fission met en jeu des protéines du cytosol comme la dynamine, il est attendu que les vésicules intraluminales, du fait de contraintes topologiques, recrutent un autre type de machinerie pour procéder à leur séparation de la membrane externe du MVB. Les formines pourraient participer à ce processus par la construction d'un anneau contractile d'actine assurant le reserrement progressif du cou de la vésicule en formation. Enfin, les formines étant décrites pour générer une force motrice capable de pousser la membrane comme dans le cas de la formation des filipodes (Kovar and Pollard, 2004 ; Romero et al., 2004), on peut imaginer qu'en générant des câbles d'actine dirigés vers la lumière de l'endosome, la protéine pourrait fournir la force nécessaire à la déformation de la membrane de l'endosome et à la formation des vésicules internes.

Un lien entre Alix et le cytosquelette d'actine a également été décrit dans d'autres modèles d'étude. Des cellules HeLa appauvries en Alix par ARNi présentent d'une part une relocalisation de leurs endosomes précoces de la périphérie cellulaire vers l'aire périnucléaire, et d'autre part une accumulation de structures aberrantes d'actine contenant également de la cortactine et de la clathrine (Cabezas et al., 2005). En outre, des immunoprécipitations faites contre des protéines du cytosquelette dans des cellules HEK293 ont permis d'identifier Alix comme partenaire de l'actine,  $\alpha$ -tubuline, et de deux kinases régulant les points focaux d'adhésion : FAK et PYK-2 (Schmidt et al., 2003).

De plus, des liens entre le cytosquelette d'actine et certains acteurs de la voie du MVB ont également été décrits. C'est le cas de la protéine Vps36 du complexe ESCRT-II dont l'invalidation se traduit par une réduction du nombre de câbles polarisés d'actine et la formation de larges agrégats d'actine (Bonangelino et al., 2002), de la protéine Vps28 du complexe ESCRT-I dont l'invalidation se traduit par les mêmes effets dans l'embryon de Drosophile avec en plus un défaut de division cellulaire (Sevrioukov et al., 2005) et de la protéine Ent3p chez la levure dont l'absence de fonction par mutation thermosensible se traduit également par un défaut d'organisation du cytosquelette d'actine en plus d'une perturbation dans le tri des cargos au MVB (Friant et al., 2003).

Tous ces résultats suggèrent une coopération fonctionnelle entre le fonctionnement de la machinerie ESCRT et le cytosquelette.

# CONCLUSIONS

Fin 1999, la protéine Alix est décrite comme impliquée dans des voies de signalisation proapoptotiques en association avec son partenaire, la protéine ALG-2 dans les cellules de mammifères (Missotten et al., 1999 ; Vito et al., 1999). Le rôle précis de ces protéines n'est alors pas connu. Mon travail de thèse a consisté à caractériser le rôle de la protéine Alix chez *Dictyostelium*, un modèle d'étude de la mort cellulaire programmée (Golstein et al., 2003).

Les cellules *alx* nulles ne présentent pas de défauts notables au stade végétatif mais l'absence de Dd-Alix se traduit par un défaut majeur de développement lors de la carence nutritive. Les structures terminales obtenues ne contiennent pas de spores mais des cellules indifférenciées et des cellules vacuolisées ressemblant à des cellules de type tige. L'absence d'Alix conduit à une différenciation cellulaire partielle et une morphogenèse anormale. En revanche, le programme de mort cellulaire développemental qui conduit à la formation de cellules tiges mortes et vacuolisées reste opérationnel. Un rôle d'inducteur de la mort semble être écarté en ce qui concerne Dd-Alix. Cependant, un rôle dans la protection contre la mort cellulaire reste envisageable.

Dans un deuxième temps, j'ai donc cherché à établir un lien entre le phénotype de la souche *alx* nulle et la fonction cellulaire de la protéine par l'étude de la protéine, de sa localisation et de ses partenaires.

La caractérisation de Dd-Alix au niveau cellulaire a permis de montrer que cette protéine est associée à la voie endocytaire et que cette association est renforcée lors du passage en développement au moment où se manifeste le phénotype *alx* nul. A ce stade de mon travail, des données publiées chez *Saccharomyces* ont montré qu'Alix est un élément de la machinerie ESCRT et contribue de ce fait au trafic endocytaire de protéines membranaires. J'ai donc développé des outils pour étudier cette machinerie chez *Dictyostelium* et disséquer la relation Alix/ESCRT. J'ai pu montrer que les vésicules portant Alix contiennent également la protéine Vps32 du complexe ESCRT-III ainsi que des protéines ubiquitinées. J'ai également observé que la surexpression de Vps32 se traduit par la formation d'un compartiment anormal séquestrant des protéines ubiquitinées, des protéines de la machinerie ESCRT (Vps32 et Vps4) et la protéine Alix. Enfin, l'expression d'une forme dominante-négative de l'ATPase Vps4 se traduit par la formation de vésicules particulières (vraisemblablement un compartiment de classe E) contenant des protéines ubiquitinées, Vps32, Vps4 et Alix. Autant d'éléments qui soutiennent l'idée que Dd-Alix fonctionne, comme chez la Levure et les Mammifères, en association avec la machinerie ESCRT.

Une stratégie d'invalidation systématique des composants de la machinerie ESCRT m'a permis d'établir que l'absence de Tsg101, Vps32, Vps4 et Alix se traduit par des phénotypes différents à l'échelle de l'organisme entier. Cependant, les travaux menés sur la Levure et les Mammifères suggèrent que l'invalidation de ces mêmes composants résulte en un défaut marqué de biogenèse du MVB et de transit de protéines membranaires spécifiquement ciblées vers la voie MVB-dépendante. Il est attendu que l'analyse en microscopie électronique du MVB chez *Dictyostelium* révèle un défaut similaire. Cette diversité de phénotypes à l'échelle macroscopique m'a amené à proposer le modèle suivant, à la lumière des derniers résultats de la littérature sur les autres modèles cellulaires :

Le développement de *Dictyostelium* est contrôlé par des récepteurs à l'AMPc. Au stade agrégat, certains de ces récepteurs sont internalisés et envoyés à la dégradation via le MVB. Cette étape permet la diminution du nombre de récepteurs en surface et la restriction des récepteurs à certains sous-types cellulaires. Dd-Alix en coopération avec la machinerie ESCRT régule la dégradation de ces récepteurs. Dans la souche *alx* nulle, la voie du MVB est affectée et le récepteur endocyté ne peut plus être envoyé correctement à la dégradation dans le lysosome. Un défaut de régulation de ces récepteurs et leur maintien à la surface membranaire pourraient conduire à la persistence des voies de signalisation en aval et entraîner un conflit de signalisation responsable du phénotype observé.



**Figure 91 : Modèle pour expliquer le phénotype de développement lié à Alix.** Après fixation de son ligand, le récepteur est ubiquitiné et envoyé aux lysosomes pour y être dégradé. Pour cela, il est pris en charge par la machinerie ESCRT dont fait partie Alix. Après sa déubiquitination, le récepteur est séquestré dans des vésicules qui bourgeonnemt dans la lumière de l'endosome donnant ainsi naissance au corps multivésiculaire. Ce bourgeonnement pourrait faire intervenir une protéine de la famille formine recrutée par Alix. Cette protéine pourrait soit polymériser des câbles d'actine amenant ainsi une force motrice capable de pousser la membrane vers la lumière de l'endosome ou bien former un anneau contractile d'actine assurant le resserrement progressif du cou de la vésicule en formation. Dans une souche sauvage (1), le corps multivésiculaire va ensuite fusionner avec les lysosomes permettant le dégradation de ses vésicules internes et de leur contenu. Dans la souche *alx* nulle (2), la formation du corps multivésiculaire est affectée. Le récepteur endocyté ne peut plus être dégradé et recycle à la membrane plasmique où il continue d'activer ses voies de signalisation en aval. La prolongation de ces voies de signalisation est responsable du phénotype observé.

Les protéines Vps4 et Vps32 interviennent tardivement dans l'assemblage fonctionnel de la machinerie ESCRT, après le recrutement des complexes I et II. Il est possible que l'invalidation de *vps4* ou *vps32* apparemment létale conduise à la séquestration d'une protéine essentielle à la vie végétative sur le compartiment E ou son équivalent chez *Dictyostelium*. Cette protéine n'est pas nécessairement un composant essentiel de la machinerie (peut-être un élément de régulation de cette voie) mais serait indispensable à un autre processus végétatif. La surexpression du dominant-négatif Vps4E/Q conduirait au même blocage de la machinerie par séquestration des composants sur le site de biogenèse des vésicules intraluminales, d'où sa létalité végétative.

L'absence de phénotype de la souche *tsg101* nulle, contrairement à la souche *alx* nulle, tend à laisser penser qu'un dysfonctionnement de la machinerie ESCRT ne s'accompagne pas d'un phénotype de développement anormal majeur chez *Dictyostelium*. Cette différence de phénotypes impose de complexifier le modèle proposé précédemment. Deux hypothèses sont envisageables :

1) les récepteurs internalisés ont des devenirs distincts selon le contexte mutant. Dans la souche *tsg101* nulle, le récepteur internalisé pourrait être séquestré dans le compartiment E ou recycler à la membrane plasmique sous une forme inactive alors qu'il recyclerait sous une forme active (déubiquitinée) à la membrane plasmique dans une souche *alx* nulle. Une telle différence de comportement suivant le mutant a été rapportée, par exemple, pour la perméase Gap1 chez la Levure (Nikko et al., 2003). La perméase est séquestrée dans les compartiments E dans les différents mutants sauf dans le mutant *bro1* où la perméase recycle sous une forme déubiquitinée à la membrane plasmique.

2) les protéines de la machinerie ESCRT ont des rôles additionnels dans une ou plusieurs autres voies de signalisation. Des travaux concernant Alix ont montré un rôle précoce de cet adaptateur dans l'internalisation de récepteurs membranaires au niveau de la membrane plasmique, soit en amont du MVB. Un tel rôle, s'il était confirmé chez *Dictyostelium*, pourrait expliquer la diversité des phénotypes observés. Dans ce cas, les différents mutants ponctuels d'Alix qui complémentent parfaitement le défaut de développement de la souche *alx* nulle seraient à reconsidérer quant à leur capacité à complémenter le défaut de biogenèse du MVB. Par ailleurs, la mutation *alx* nulle se traduisant par un phénotype de développement facilement repérable, une approche consistant à rechercher des mutations suppresseurs de la mutation *alx* nulle (restauration du phénotype parental) pourrait être particulièrement adaptée pour identifier des partenaires génétiques d'Alix et identifier l'autre fonction d'Alix responsable du phénotype.

A ce stade du travail, il est maintenant important d'identifier une protéine ciblée dans la voie MVB-dépendante et suivre son devenir dans les différents mutants. Les compartiments Vps32 et Vps4E/Q qui semblent séquestrer des protéines ubiquitinées sont des outils particulièrement intéressants dans cette démarche. Une purification des compartiments générés dans les surexpresseurs couplée à une analyse protéomique pour en déterminer les composants devrait nous permettre d'identifier des protéines ciblées dans cette voie ainsi que des régulateurs possibles de la machinerie.

Une caractérisation par microscopie électronique de nos différents mutants est également une étape importante pour déterminer si à l'échelle subcellulaire, ces mutations se traduisent toutes par la formation d'un compartiment de classe E malgré une différence de phénotypes à l'échelle de l'organisme. Une telle caractérisation est actuellement en cours en collaboration avec le laboratoire de Pierre Golstein (CIML, Marseille).

Enfin, pour mieux comprendre le fonctionnement de la voie MVB chez *Dictyostelium*, il est nécessaire de caractériser les autres composants de la machinerie ESCRT. L'invalidation systématique des autres composants de la machinerie est actuellement en cours au laboratoire en commençant par les protéine du complexe ESCRT-II pour lesquelles nous n'avons pas encore développé d'outils (K. Langou, G. Klein et L. Aubry).

Mon travail de thèse a également permis de montrer un lien tout à fait inattendu entre Alix et Tsg101 : la surexpression sous un promoteur constitutif de la protéine Alix dans la souche sauvage induit une régulation négative complète de la protéine endogène par un processus faisant intervenir Tsg101. Ce phénomène rappelle la fonction de l'autre homologue d'Alix chez la levure, la protéine Rim20 qui se distingue de Bro1 par l'absence de queue poly-proline. Rim20, en association avec les complexes ESCRT-I, -II et le sous-complexe Vps20-Vps32 participe au processing du facteur de transcription Rim101 (Xu et al., 2004a). A nouveau, le rôle exact des différents composants de la machinerie ESCRT dans ce processus n'est pas clairement établi. La machinerie ESCRT pourrait servir de plate-forme permettant de réunir dans une conformation adéquate une protéine cible et une enzyme qui va en cliver une partie (voir Fig.92). Ces deux voies de signalisation apparemment distinctes semblent partager des mécanismes communs d'agencement ou de régulation. Chez *Dictyostelium*, on peut envisager que la protéine Alix remplisse les deux fonctions de Rim20 et Bro1 et régule le processing du répresseur contrôlant son expression, parallèlement à sa fonction endocytaire.



**Figure 92 : Modèle comparant les voies MVB et de processing de facteurs de transcription.** Dans le processing de facteur de transcription, en utilisant les connaissances liées à l'étude de Rim101, Alix interagit directement avec le facteur cible (Xu and Mitchell, 2001). La protéase est recrutée par une interaction directe avec Vps32 (Ito et al., 2001). La protéine Vps20 ainsi que les complexes ESCRT-I et –II sont nécessaires mais leur positionnement est encore flou (Xu et al., 2004a). L'assemblage de toutes ces protéines permet le processing du facteur de transcription et sont activation dans le cas de Rim101. Dans la voie MVB, Alix pourrait interagir directement avec certains récepteurs cibles. Le recrutement de l'enzyme de déubiquitination Doa4 est encore matière à débat : Vps24 pour certains (Amerik et al., 2000), Vps32 (Bowers et al., 2004) et plus récemment Alix (Luhtala and Odorizzi, 2004). Cette étape de déubiquitination précède l'entrée du récepteur dans les vésicules internes du MVB.

Enfin, la dernière partie de mon travail avait pour but d'identifier de nouveaux partenaires de Dd-Alix. Par la technique du double-hybride, nous avons montré qu'Alix interagit avec des protéines de la famille des Formines. La réalité physiologique de cette interaction reste à démontrer mais les formines représentent des candidats intéressants de régulation de la formation des vésicules intraluminales du MVB. Plus surprenant, l'approche double-hybride nous a également révélé qu'Alix est régulée par ubiquitination. Les efforts pour déterminer le ou les sites d'ubiquitination doivent être poursuivis afin d'évaluer l'importance de cette régulation dans la fonction d'Alix. Il serait également intéressant de vérifier si d'autres composants de la voie ESCRT sont régulés de cette façon.

Par ailleurs, Chez C.elegans, l'invalidation de CeVps27 (l'homologue d'Hrs) se traduit par une augmentation des processus autophagiques révélée par la relocalisation de l'homologue d'Atg8 depuis le cytosol sur des structures vésiculaires comme lorsque l'autophagie est induite (Roudier et al., 2005). Dans les cellules HeLa, la surexpression d'une version mutante de l'ATPase Vps4 (Vps4<sup>E235Q</sup>) affecte l'étape de fusion des autophagosomes avec les lysosomes ce qui se traduit par une accumulation d'autophagosomes dans ces cellules et une diminution du taux de dégradation protéique liée à l'autophagie (Nara et al., 2002). L'ATPase semble donc indispensable à la formation d'autolysosome qui est un prérequis à la dégradation autophagique. L'hypothèse avancée par les auteurs pour expliquer ce lien entre Vps4 et l'autophagie serait qu'un composant indispensable à la fusion des autophagosomes avec les lysosomes serait amené par endocytose. Dans un mutant Vps4, ce transport serait affecté, et la fusion n'aurait alors pas lieu. De plus, les auteurs ont montré que le LBPA, un lipide qui pourrait intervenir dans la formation du MVB, est également retrouvé dans les autophagosomes et que dans le mutant Vps4<sup>E235Q</sup>, son transport depuis les endosomes vers ces compartiments autophagiques est affecté (Nara et al., 2002). Le lien entre machinerie ESCRT et autophagie mérite donc d'être étudié plus précisemment chez Dictyostelium, en vérifiant notamment si nos différents mutants d'Alix, de Tsg101, de Vps32 et de Vps4 modifient la voie autophagique.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## A

Aguado-Velasco, C. and Bretscher, M. S. (1999). Circulation of the plasma membrane in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* 10, 4419-27.

Aguilar, R. C. and Wendland, B. (2003). Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol* 15, 184-90.

Alam, S. L., Sun, J., Payne, M., Welch, B. D., Blake, B. K., Davis, D. R., Meyer, H. H., Emr, S. D. and Sundquist, W. I. (2004). Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *Embo J* 23, 1411-21.

Amerik, A. Y., Nowak, J., Swaminathan, S. and Hochstrasser, M. (2000). The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell* **11**, 3365-80.

Amit, I., Yakir, L., Katz, M., Zwang, Y., Marmor, M. D., Citri, A., Shtiegman, K., Alroy, I., Tuvia, S., Reiss, Y. et al. (2004). Tal, a Tsg101-specific E3 ubiquitin ligase, regulates receptor endocytosis and retrovirus budding. *Genes Dev* 18, 1737-52.

Anderson, R. G., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1977). Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10, 351-64.

Aravind, L. and Koonin, E. V. (2000). The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr Biol* 10, R132-4.

Arnason, T. and Ellison, M. J. (1994). Stress resistance in Saccharomyces cerevisiae is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol* 14, 7876-83.

Arnoult, D., Tatischeff, I., Estaquier, J., Girard, M., Sureau, F., Tissier, J. P., Grodet, A., Dellinger, M., Traincard, F., Kahn, A. et al. (2001). On the evolutionary conservation of the cell death pathway: mitochondrial release of an apoptosis-inducing factor during Dictyostelium discoideum cell death. *Mol Biol Cell* 12, 3016-30.

Asao, H., Sasaki, Y., Arita, T., Tanaka, N., Endo, K., Kasai, H., Takeshita, T., Endo, Y., Fujita, T. and Sugamura, K. (1997). Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule. Its suppressive effect on cytokine-induced cell growth. *J Biol Chem* 272, 32785-91.

Aubry, L. and Firtel, R. (1999). Integration of signaling networks that regulate Dictyostelium differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 469-517.

Aubry, L., Klein, G., Martiel, J. L. and Satre, M. (1993). Kinetics of endosomal pH evolution in Dictyostelium discoideum amoebae. Study by fluorescence spectroscopy. *J Cell Sci* **105** ( Pt 3), 861-6.

Aubry, L., Mattei, S., Blot, B., Sadoul, R., Satre, M. and Klein, G. (2002). Biochemical characterization of two analogues of the apoptosis-linked gene 2 protein in Dictyostelium discoideum and interaction with a physiological partner in mammals, murine Alix. *J Biol Chem* 277, 21947-54.

### B

Babst, M. (2005). A protein's final ESCRT. Traffic 6, 2-9.

Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T. and Emr, S. D. (2002a). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* **3**, 271-82.

Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B. and Emr, S. D. (2002b). Endosomeassociated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* **3**, 283-9.

**Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. and Emr, S. D.** (2000). Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic* 1, 248-58.

Babst, M., Sato, T. K., Banta, L. M. and Emr, S. D. (1997). Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *Embo J* 16, 1820-31.

**Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J. and Emr, S. D.** (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *Embo J* **17**, 2982-93.

Bache, K. G., Brech, A., Mehlum, A. and Stenmark, H. (2003a). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* 162, 435-42.

Bache, K. G., Raiborg, C., Mehlum, A. and Stenmark, H. (2003b). STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem* 278, 12513-21.

**Bache, K. G., Slagsvold, T., Cabezas, A., Rosendal, K. R., Raiborg, C. and Stenmark, H.** (2004). The growth-regulatory protein HCRP1/hVps37A is a subunit of mammalian ESCRT-I and mediates receptor down-regulation. *Mol Biol Cell* **15**, 4337-46.

Benghezal, M., Gotthardt, D., Cornillon, S. and Cosson, P. (2001). Localization of the Rh50-like protein to the contractile vacuole in Dictyostelium. *Immunogenetics* **52**, 284-8.

Bilodeau, P. S., Urbanowski, J. L., Winistorfer, S. C. and Piper, R. C. (2002). The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* **4**, 534-9.

**Bilodeau, P. S., Winistorfer, S. C., Kearney, W. R., Robertson, A. D. and Piper, R. C.** (2003). Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *J Cell Biol* **163**, 237-43.

**Bishop, N., Horman, A. and Woodman, P.** (2002). Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol* **157**, 91-101.

Bishop, N. and Woodman, P. (2000). ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking. *Mol Biol Cell* 11, 227-39.

**Bishop, N. and Woodman, P.** (2001). TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes. *J Biol Chem* **276**, 11735-42.

Blondel, M. O., Morvan, J., Dupre, S., Urban-Grimal, D., Haguenauer-Tsapis, R. and Volland, C. (2004). Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uracil binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation. *Mol Biol Cell* **15**, 883-95.

**Bogdanovic, A., Bennett, N., Kieffer, S., Louwagie, M., Morio, T., Garin, J., Satre, M. and Bruckert, F.** (2002). Syntaxin 7, syntaxin 8, Vti1 and VAMP7 (vesicle-associated membrane protein 7) form an active SNARE complex for early macropinocytic compartment fusion in Dictyostelium discoideum. *Biochem J* **368**, 29-39.

Bonangelino, C. J., Chavez, E. M. and Bonifacino, J. S. (2002). Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell* **13**, 2486-501.

Bonifacino, J. S. (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 23-32.

Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72, 395-447.

**Bowers, K., Levi, B. P., Patel, F. I. and Stevens, T. H.** (2000). The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell* **11**, 4277-94.

Bowers, K., Lottridge, J., Helliwell, S. B., Goldthwaite, L. M., Luzio, J. P. and Stevens, T. H. (2004). Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Traffic* **5**, 194-210.

Brazill, D. T., Meyer, L. R., Hatton, R. D., Brock, D. A. and Gomer, R. H. (2001). ABC transporters required for endocytosis and endosomal pH regulation in Dictyostelium. *J Cell Sci* 114, 3923-32.

Buczynski, G., Bush, J., Zhang, L., Rodriguez-Paris, J. and Cardelli, J. (1997). Evidence for a recycling role for Rab7 in regulating a late step in endocytosis and in retention of lysosomal enzymes in Dictyostelium discoideum. *Mol Biol Cell* **8**, 1343-60.

**Burgdorf, S., Leister, P. and Scheidtmann, K. H.** (2004). TSG101 interacts with apoptosisantagonizing transcription factor and enhances androgen receptor-mediated transcription by promoting its monoubiquitination. *J Biol Chem* **279**, 17524-34.

## C

Cabezas, A., Bache, K. G., Brech, A. and Stenmark, H. (2005). Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J Cell Sci* 118, 2625-35.

Cereghino, J. L., Marcusson, E. G. and Emr, S. D. (1995). The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol Biol Cell* **6**, 1089-102.

Chang, F., Drubin, D. and Nurse, P. (1997). cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol* 137, 169-82.

Chang, W. T., Newell, P. C. and Gross, J. D. (1996). Identification of the cell fate gene stalky in Dictyostelium. *Cell* 87, 471-81.

Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N., Torch, S., Missotten, M. and Sadoul, R. (2002). Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J Biol Chem* 277, 29108-15.

Che, S., El-Hodiri, H. M., Wu, C. F., Nelman-Gonzalez, M., Weil, M. M., Etkin, L. D., Clark, R. B. and Kuang, J. (1999). Identification and cloning of xp95, a putative signal transduction protein in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 5522-5531.

Chen, B., Borinstein, S. C., Gillis, J., Sykes, V. W. and Bogler, O. (2000). The glioma-associated protein SETA interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and modulates apoptosis in astrocytes. *J Biol Chem* 275, 19275-81.

Chen, L. and Davis, N. G. (2002). Ubiquitin-independent entry into the yeast recycling pathway. *Traffic* **3**, 110-23.

**Clarke, M., Kohler, J., Arana, Q., Liu, T., Heuser, J. and Gerisch, G.** (2002). Dynamics of the vacuolar H(+)-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of Dictyostelium cells. *J Cell Sci* **115**, 2893-905.

Conner, S. D. and Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. Nature 422, 37-44.

Cornillon, S., Foa, C., Davoust, J., Buonavista, N., Gross, J. D. and Golstein, P. (1994). Programmed cell death in Dictyostelium. *J Cell Sci* 107 (Pt 10), 2691-704.

Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., Bruckert, F. and Cosson, P. (2000). Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* 275, 34287-92.

**Cox, D., Wessels, D., Soll, D. R., Hartwig, J. and Condeelis, J.** (1996). Re-expression of ABP-120 rescues cytoskeletal, motility, and phagocytosis defects of ABP-120- Dictyostelium mutants. *Mol Biol Cell* **7**, 803-23.

Cremona, O. (2001). Live stripping of clathrin-coated vesicles. Dev Cell 1, 592-4.

## D

Damer, C. K. and O'Halloran, T. J. (2000). Spatially regulated recruitment of clathrin to the plasma membrane during capping and cell translocation. *Mol Biol Cell* 11, 2151-9.

De Camilli, P., Chen, H., Hyman, J., Panepucci, E., Bateman, A. and Brunger, A. T. (2002). The ENTH domain. *FEBS Lett* **513**, 11-8.

de Hostos, E. L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R. and Gerisch, G. (1991). Coronin, an actin binding protein of Dictyostelium discoideum localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *Embo J* 10, 4097-104.

Demirov, D. G. and Freed, E. O. (2004). Retrovirus budding. Virus Res 106, 87-102.

**Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F., Stoorvogel, W. and Geuze, H. J.** (2000). Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* **113 Pt 19**, 3365-74.

Dimond, R. L., Burns, R. A. and Jordan, K. B. (1981). Secretion of Lysosomal enzymes in the cellular slime mold, Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* 256, 6565-72.

**Doyotte, A., Russell, M. R., Hopkins, C. R. and Woodman, P. G.** (2005). Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci* **118**, 3003-17.

**Dunn, R. and Hicke, L.** (2001). Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis. *J Biol Chem* **276**, 25974-81.

**Dupre, S. and Haguenauer-Tsapis, R.** (2001). Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. *Mol Cell Biol* **21**, 4482-94.

**Dynes, J. L. and Firtel, R. A.** (1989). Molecular complementation of a genetic marker in Dictyostelium using a genomic DNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7966-70.

## E

Ebina, Y., Takahara, Y., Kishi, F., Nakazawa, A. and Brent, R. (1983). LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene. *J Biol Chem* 258, 13258-61.

Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glockner, G., Rajandream, M. A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q. et al. (2005). The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature* 435, 43-57.

Ellson, C. D., Andrews, S., Stephens, L. R. and Hawkins, P. T. (2002). The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J Cell Sci* 115, 1099-105.

**Eugster, A., Pecheur, E. I., Michel, F., Winsor, B., Letourneur, F. and Friant, S.** (2004). Ent5p is required with Ent3p and Vps27p for ubiquitin-dependent protein sorting into the multivesicular body. *Mol Biol Cell* **15**, 3031-41.

### F

Fernandez-Borja, M., Wubbolts, R., Calafat, J., Janssen, H., Divecha, N., Dusseljee, S. and Neefjes, J. (1999). Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidyl-inositol 3-kinase activity. *Curr Biol* 9, 55-8.

Fevrier, B. and Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16, 415-21.

Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.

Finley, D., Bartel, B. and Varshavsky, A. (1989). The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* 338, 394-401.

Fivaz, M., Vilbois, F., Thurnheer, S., Pasquali, C., Abrami, L., Bickel, P. E., Parton, R. G. and van der Goot, F. G. (2002). Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *Embo J* 21, 3989-4000.

Freemont, P. S. (2000). RING for destruction? Curr Biol 10, R84-7.

Freeze, H. H., Miller, A. L. and Kaplan, A. (1980). Acid hydrolases from Dictyostelium discoideum contain phosphomannosyl recognition markers. *J Biol Chem* 255, 11081-4.

Friant, S., Pecheur, E. I., Eugster, A., Michel, F., Lefkir, Y., Nourrisson, D. and Letourneur, F. (2003). Ent3p Is a PtdIns(3,5)P2 effector required for protein sorting to the multivesicular body. *Dev Cell* 5, 499-511.
Fujita, H., Umezuki, Y., Imamura, K., Ishikawa, D., Uchimura, S., Nara, A., Yoshimori, T., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Ishidoh, K. et al. (2004). Mammalian class E Vps proteins, SBP1 and mVps2/CHMP2A, interact with and regulate the function of an AAA-ATPase SKD1/Vps4B. *J Cell Sci* 117, 2997-3009.

Funakoshi, M., Sasaki, T., Nishimoto, T. and Kobayashi, H. (2002). Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 745-50.

Futter, C. E., Collinson, L. M., Backer, J. M. and Hopkins, C. R. (2001). Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes. *J Cell Biol* 155, 1251-64.

# G

Gage, R. M., Kim, K. A., Cao, T. T. and von Zastrow, M. (2001). A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 276, 44712-20.

Galan, J. M. and Haguenauer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J* 16, 5847-54.

**Galet, C., Min, L., Narayanan, R., Kishi, M., Weigel, N. L. and Ascoli, M.** (2003). Identification of a transferable two-amino-acid motif (GT) present in the C-terminal tail of the human lutropin receptor that redirects internalized G protein-coupled receptors from a degradation to a recycling pathway. *Mol Endocrinol* **17**, 411-22.

Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. and Desjardins, M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152, 165-80.

Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., Rich, R. L. et al. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55-65.

Gasman, S., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2003). RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol* 5, 195-204.

Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M. et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-7.

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.

Gillooly, D. J., Simonsen, A. and Stenmark, H. (2001). Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem J* 355, 249-58.

Glockner, G., Eichinger, L., Szafranski, K., Pachebat, J. A., Bankier, A. T., Dear, P. H., Lehmann, R., Baumgart, C., Parra, G., Abril, J. F. et al. (2002). Sequence and analysis of chromosome 2 of Dictyostelium discoideum. *Nature* 418, 79-85.

Golstein, P., Aubry, L. and Levraud, J. P. (2003). Cell-death alternative model organisms: why and which? *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 798-807.

Gotthardt, D., Warnatz, H.J., Henschel, O., Bruckert, F., Schleicher, M., Soldati, T. (2002). High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3508-20.

Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 721-30.

Gruenberg, J. and Maxfield, F. R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7, 552-63.

Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. and Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**, 791-803.

# Η

Hacker, U., Albrecht, R. and Maniak, M. (1997). Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium. *J Cell Sci* 110 (Pt 2), 105-12.

Haglund, K., Di Fiore, P. P. and Dikic, I. (2003a). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 28, 598-603.

**Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P. and Dikic, I.** (2003b). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* **5**, 461-6.

Hanyaloglu, A. C., McCullagh, E. and von Zastrow, M. (2005). Essential role of Hrs in a recycling mechanism mediating functional resensitization of cell signaling. *Embo J* 24, 2265-83.

Harris, T. J., Ravandi, A. and Siu, C. H. (2001). Assembly of glycoprotein-80 adhesion complexes in Dictyostelium. Receptor compartmentalization and oligomerization in membrane rafts. *J Biol Chem* **276**, 48764-74.

Hartmann-Petersen, R. and Gordon, C. (2004). Protein degradation: recognition of ubiquitinylated substrates. *Curr Biol* 14, R754-6.

Hicke, L. and Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitinbinding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141-72.

Hicke, L., Schubert, H. L. and Hill, C. P. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 610-21.

Hierro, A., Sun, J., Rusnak, A. S., Kim, J., Prag, G., Emr, S. D. and Hurley, J. H. (2004). Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature* **431**, 221-5.

Higgs, H. N. (2005). Formin proteins: a domain-based approach. Trends Biochem Sci 30, 342-53.

Hitt, A. L., Hartwig, J. H. and Luna, E. J. (1994). Ponticulin is the major high affinity link between the plasma membrane and the cortical actin network in Dictyostelium. *J Cell Biol* **126**, 1433-44.

Hittelman, A. B., Burakov, D., Iniguez-Lluhi, J. A., Freedman, L. P. and Garabedian, M. J. (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *Embo J* 18, 5380-8.

Horak, J. (2003). The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta* 1614, 139-55.

Horak, J. and Wolf, D. H. (2001). Glucose-induced monoubiquitination of the Saccharomyces cerevisiae galactose transporter is sufficient to signal its internalization. *J Bacteriol* 183, 3083-8.

Howard, T. L., Stauffer, D. R., Degnin, C. R. and Hollenberg, S. M. (2001). CHMP1 functions as a member of a newly defined family of vesicle trafficking proteins. *J Cell Sci* **114**, 2395-404.

# Ι

Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96, 23-8.

Insall, R., Muller-Taubenberger, A., Machesky, L., Kohler, J., Simmeth, E., Atkinson, S. J., Weber, I. and Gerisch, G. (2001). Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* **50**, 115-28.

Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4569-74.

# J

Jang, I. K., Hu, R., Lacana, E., D'Adamio, L. and Gu, H. (2002). Apoptosis-linked gene 2-deficient mice exhibit normal T-cell development and function. *Mol Cell Biol* 22, 4094-100.

Jenne, N., Rauchenberger, R., Hacker, U., Kast, T. and Maniak, M. (1998). Targeted gene disruption reveals a role for vacuolin B in the late endocytic pathway and exocytosis. *J Cell Sci* 111 (Pt 1), 61-70.

Johannes, L. and Lamaze, C. (2002). Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* 3, 443-51.

Journet, A., Chapel, A., Jehan, S., Adessi, C., Freeze, H., Klein, G. and Garin, J. (1999). Characterization of Dictyostelium discoideum cathepsin D. *J Cell Sci* **112** ( **Pt 21**), 3833-43.

Jung, Y. S., Kim, K. S., Kim, K. D., Lim, J. S., Kim, J. W. and Kim, E. (2001). Apoptosis-linked gene 2 binds to the death domain of Fas and dissociates from Fas during Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 420-6.

Jutras, I. and Desjardins, M. (2005). Phagocytosis: At the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*.

Kamura, T., Burian, D., Khalili, H., Schmidt, S. L., Sato, S., Liu, W. J., Conrad, M. N., Conaway, R. C., Conaway, J. W. and Shilatifard, A. (2001). Cloning and characterization of ELL-associated proteins EAP45 and EAP20. a role for yeast EAP-like proteins in regulation of gene expression by glucose. *J Biol Chem* 276, 16528-33.

Katoh, K., Shibata, H., Hatta, K. and Maki, M. (2004a). CHMP4b is a major binding partner of the ALG-2-interacting protein Alix among the three CHMP4 isoforms. *Arch Biochem Biophys* **421**, 159-65.

Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T. and Maki, M. (2003). The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *J Biol Chem* 278, 39104-13.

Katoh, Y., Shiba, Y., Mitsuhashi, H., Yanagida, Y., Takatsu, H. and Nakayama, K. (2004b). Tollip and Tom1 form a complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes. *J Biol Chem* **279**, 24435-43.

Katz, M., Shtiegman, K., Tal-Or, P., Yakir, L., Mosesson, Y., Harari, D., Machluf, Y., Asao, H., Jovin, T., Sugamura, K. et al. (2002). Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic* **3**, 740-51.

Katzmann, D. J., Babst, M. and Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145-55.

Katzmann, D. J., Odorizzi, G. and Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicularbody sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905.

Katzmann, D. J., Stefan, C. J., Babst, M. and Emr, S. D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* 162, 413-23.

Kessin, R. H. (2001). Dictyostelium-Evolution, cell biology and the development of multicellularity. *Cambridge, U.K: Cambridge Univ. Press* 

Kim, J., Sitaraman, S., Hierro, A., Beach, B. M., Odorizzi, G. and Hurley, J. H. (2005). Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Dev Cell* **8**, 937-47.

Kirchhausen, T. (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. Annu Rev Cell Dev Biol 15, 705-32.

Kirkham, M., Fujita, A., Chadda, R., Nixon, S. J., Kurzchalia, T. V., Sharma, D. K., Pagano, R. E., Hancock, J. F., Mayor, S. and Parton, R. G. (2005). Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol* 168, 465-76.

Kirkham, M. and Parton, R. G. (2005). Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* 1745, 273-286

Kleijmeer, M., Ramm, G., Schuurhuis, D., Griffith, J., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rudensky, A. Y., Ossendorp, F., Melief, C. J., Stoorvogel, W. et al. (2001). Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol* 155, 53-63.

Klein, G. and Satre, M. (1986). Kinetics of fluid-phase pinocytosis in Dictyostelium discoideum amoebae. *Biochem Biophys Res Commun* 138, 1146-52.

tel-00011554, version 1 - 7 Feb 2006

Kobayashi, H., Tanaka, N., Asao, H., Miura, S., Kyuuma, M., Semura, K., Ishii, N. and Sugamura, K. (2005). Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins signal transducing adaptor molecule 1 and 2. *J Biol Chem* 280, 10468-77.

Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Chevallier, J., Makino, A., Mayran, N., Escola, J. M., Lebrand, C., Cosson, P. and Gruenberg, J. (2002). Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem* 277, 32157-64.

Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G. and Gruenberg, J. (1999). Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* 1, 113-8.

Komada, M., Masaki, R., Yamamoto, A. and Kitamura, N. (1997). Hrs, a tyrosine kinase substrate with a conserved double zinc finger domain, is localized to the cytoplasmic surface of early endosomes. *J Biol Chem* 272, 20538-44.

Komada, M. and Soriano, P. (1999). Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. *Genes Dev* 13, 1475-85.

Kosta, A., Roisin-Bouffay, C., Luciani, M. F., Otto, G. P., Kessin, R. H. and Golstein, P. (2004). Autophagy gene disruption reveals a non-vacuolar cell death pathway in Dictyostelium. *J Biol Chem* **279**, 48404-9.

Kovar, D. R. and Pollard, T. D. (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14725-30.

Kranz, A., Kinner, A. and Kolling, R. (2001). A family of small coiled-coil-forming proteins functioning at the late endosome in yeast. *Mol Biol Cell* **12**, 711-23.

Kreitmeier, M., Gerisch, G., Heizer, C. and Muller-Taubenberger, A. (1995). A talin homologue of Dictyostelium rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *J Cell Biol* **129**, 179-88.

Kullas, A. L., Li, M. and Davis, D. A. (2004). Snf7p, a component of the ESCRT-III protein complex, is an upstream member of the RIM101 pathway in Candida albicans. *Eukaryot Cell* **3**, 1609-18.

# L

Lacana, E., Ganjei, J. K., Vito, P. and D'Adamio, L. (1997). Dissociation of apoptosis and activation of IL-1beta-converting enzyme/Ced-3 proteases by ALG-2 and the truncated Alzheimer's gene ALG-3. *J Immunol* **158**, 5129-35.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.

Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A. and Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* **7**, 661-71.

Laurent, O., Bruckert, F., Adessi, C. and Satre, M. (1998). In vitro reconstituted Dictyostelium discoideum early endosome fusion is regulated by Rab7 but proceeds in the absence of ATP-Mg2+ from the bulk solution. *J Biol Chem* 273, 793-9.

Lee, L., Klee, S. K., Evangelista, M., Boone, C. and Pellman, D. (1999). Control of mitotic spindle position by the Saccharomyces cerevisiae formin Bni1p. *J Cell Biol* 144, 947-61.

Lefkir, Y., Malbouyres, M., Gotthardt, D., Ozinsky, A., Cornillon, S., Bruckert, F., Aderem, A. A., Soldati, T., Cosson, P. and Letourneur, F. (2004). Involvement of the AP-1 adaptor complex in early steps of phagocytosis and macropinocytosis. *Mol Biol Cell* **15**, 861-9.

Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B. and Yarden, Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 12, 3663-74.

Lin, Y., Kimpler, L. A., Naismith, T. V., Lauer, J. M. and Hanson, P. I. (2005). Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J Biol Chem* **280**, 12799-809.

Llorente, A., Rapak, A., Schmid, S. L., van Deurs, B. and Sandvig, K. (1998). Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 140, 553-63.

Losko, S., Kopp, F., Kranz, A. and Kolling, R. (2001). Uptake of the ATP-binding cassette (ABC) transporter Ste6 into the yeast vacuole is blocked in the doa4 Mutant. *Mol Biol Cell* **12**, 1047-59.

Lu, Q., Hope, L. W., Brasch, M., Reinhard, C. and Cohen, S. N. (2003). TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7626-31.

Luhtala, N. and Odorizzi, G. (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol* 166, 717-29.

# Μ

Ma, J. and Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. Cell 51, 113-9.

Maniak, M. (2001). Fluid-phase uptake and transit in axenic Dictyostelium cells. *Biochim Biophys Acta* 1525, 197-204.

Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J. and Gerisch, G. (1995). Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* 83, 915-24.

Marchese, A. and Benovic, J. L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* **276**, 45509-12.

Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J. H., Stenmark, H. and Benovic, J. L. (2003). The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell* 5, 709-22.

Martin-Serrano, J., Eastman, S. W., Chung, W. and Bieniasz, P. D. (2005). HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J Cell Biol* 168, 89-101.

Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D. and Bieniasz, P. D. (2003). Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12414-9.

Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N. S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R. et al. (2004). Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* **303**, 531-4.

Maxfield, F. R. and McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 121-32.

Mayran, N., Parton, R. G. and Gruenberg, J. (2003). Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *Embo J* 22, 3242-53.

McCullough, J., Clague, M. J. and Urbé, S. (2004). AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol* 166, 487-92.

Melman, L., Geuze, H. J., Li, Y., McCormick, L. M., Van Kerkhof, P., Strous, G. J., Schwartz, A. L. and Bu, G. (2002). Proteasome regulates the delivery of LDL receptor-related protein into the degradation pathway. *Mol Biol Cell* **13**, 3325-35.

Missotten, M., Nichols, A., Rieger, K. and Sadoul, R. (1999). Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ* 6, 124-9.

Miura, S., Takeshita, T., Asao, H., Kimura, Y., Murata, K., Sasaki, Y., Hanai, J. I., Beppu, H., Tsukazaki, T., Wrana, J. L. et al. (2000). Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol Cell Biol* **20**, 9346-55.

Mizuno, E., Iura, T., Mukai, A., Yoshimori, T., Kitamura, N. and Komada, M. (2005). Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Down-Regulation by UBPY-mediated Deubiquitination at Endosomes. *Mol Biol Cell* 16, 5163-74.

Mobius, W., Ohno-Iwashita, Y., van Donselaar, E. G., Oorschot, V. M., Shimada, Y., Fujimoto, T., Heijnen, H. F., Geuze, H. J. and Slot, J. W. (2002). Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J Histochem Cytochem* **50**, 43-55.

Mobius, W., van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H. F., Slot, J. W. and Geuze, H. J. (2003). Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* **4**, 222-31.

Morita, E. and Sundquist, W. I. (2004). Retrovirus budding. Annu Rev Cell Dev Biol 20, 395-425.

Mousavi, S. A., Malerod, L., Berg, T. and Kjeken, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 377, 1-16.

Muller-Taubenberger, A., Graack, H. R., Grohmann, L., Schleicher, M. and Gerisch, G. (1989). An extended ubiquitin of Dictyostelium is located in the small ribosomal subunit. *J Biol Chem* 264, 5319-22.

# Ν

Nara, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2002). SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation. *Cell Struct Funct* 27, 29-37.

Nikko, E., Marini, A. M. and Andre, B. (2003). Permease recycling and ubiquitination status reveal a particular role for Bro1 in the multivesicular body pathway. *J Biol Chem* **278**, 50732-43.

Noegel, A. A., Rivero, F., Albrecht, R., Janssen, K. P., Kohler, J., Parent, C. A. and Schleicher, M. (1999). Assessing the role of the ASP56/CAP homologue of Dictyostelium discoideum and the requirements for subcellular localization. *J Cell Sci* 112 (Pt 19), 3195-203.

Nolta, K. V., Rodriguez-Paris, J. M. and Steck, T. L. (1994). Analysis of successive endocytic compartments isolated from Dictyostelium discoideum by magnetic fractionation. *Biochim Biophys Acta* 1224, 237-46.

# 0

O'Halloran, T. J. and Anderson, R. G. (1992). Clathrin heavy chain is required for pinocytosis, the presence of large vacuoles, and development in Dictyostelium. *J Cell Biol* **118**, 1371-7.

Odorizzi, G., Babst, M. and Emr, S. D. (1998). Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* 95, 847-58.

Odorizzi, G., Katzmann, D. J., Babst, M., Audhya, A. and Emr, S. D. (2003). Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Sci* 116, 1893-903.

**Oh, P., McIntosh, D. P. and Schnitzer, J. E.** (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* **141**, 101-14.

Ohkouchi, S., El-Halawany, M. S., Aruga, F., Shibata, H., Hitomi, K. and Maki, M. (2004). DdAlix, an Alix/AIP1 homolog in Dictyostelium discoideum, is required for multicellular development under low Ca2+ conditions. *Gene* 337, 131-9.

**Ohkouchi, S., Saito, H., Aruga, F., Maeda, T., Shibata, H. and Maki, M.** (2005). Dictyostelium discoideum requires an Alix/AIP1 homolog, DdAlix, for morphogenesis in alkaline environments. *FEBS Lett* **579**, 1745-50.

Olie, R. A., Durrieu, F., Cornillon, S., Loughran, G., Gross, J., Earnshaw, W. C. and Golstein, P. (1998). Apparent caspase independence of programmed cell death in Dictyostelium. *Curr Biol* 8, 955-8.

Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R. and Kessin, R. H. (2003). Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* **278**, 17636-45.

Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R. and Kessin, R. H. (2004). Dictyostelium macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects. *J Biol Chem* 279, 15621-9.

## P

Padh, H., Ha, J., Lavasa, M. and Steck, T. L. (1993). A post-lysosomal compartment in Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* 268, 6742-7.

Peck, J. W., Bowden, E. T. and Burbelo, P. D. (2004). Structure and function of human Vps20 and Snf7 proteins. *Biochem J* 377, 693-700.

**Pelkmans, L. and Helenius, A.** (2003). Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 414-22.

Pelkmans, L., Puntener, D. and Helenius, A. (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**, 535-9.

Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. Annu Rev Biochem 70, 503-33.

Pillay, C. S., Elliott, E. and Dennison, C. (2002). Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 363, 417-29.

Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P. and Di Fiore, P. P. (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 451-5.

Pornillos, O., Garrus, J. E. and Sundquist, W. I. (2002). Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol* 12, 569-79.

Pornillos, O., Higginson, D. S., Stray, K. M., Fisher, R. D., Garrus, J. E., Payne, M., He, G. P., Wang, H. E., Morham, S. G. and Sundquist, W. I. (2003). HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol* 162, 425-34.

**Prassler, J., Stocker, S., Marriott, G., Heidecker, M., Kellermann, J. and Gerisch, G.** (1997). Interaction of a Dictyostelium member of the plastin/fimbrin family with actin filaments and actimmyosin complexes. *Mol Biol Cell* **8**, 83-95.

Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. and Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* 297, 612-5.

**Puertollano, R.** (2005). Interactions of TOM1L1 with the multivesicular body sorting machinery. *J Biol Chem* **280**, 9258-64.

Puertollano, R. and Bonifacino, J. S. (2004). Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nat Cell Biol* 6, 244-51.

Pukatzki, S., Ennis, H. L. and Kessin, R. H. (2000). A genetic interaction between a ubiquitin-like protein and ubiquitin-mediated proteolysis in Dictyostelium discoideum(1). *Biochim Biophys Acta* 1499, 154-163.

# R

**Raiborg, C., Bache, K. G., Gillooly, D. J., Madshus, I. H., Stang, E. and Stenmark, H.** (2002). Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol* **4**, 394-8.

**Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D. J., D'Arrigo, A., Stang, E. and Stenmark, H.** (2001). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci* **114**, 2255-63.

Raiborg, C., Rusten, T. E. and Stenmark, H. (2003). Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 15, 446-55.

**Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P. and Geuze, H.** (2002). Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**, 718-29.

**Rauchenberger, R., Hacker, U., Murphy, J., Niewohner, J. and Maniak, M.** (1997). Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in Dictyostelium. *Curr Biol* **7**, 215-8

**Raymond, C. K., Howald-Stevenson, I., Vater, C. A. and Stevens, T. H.** (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* **3**, 1389-402.

**Reggiori, F. and Pelham, H. R.** (2001). Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitindependent and -independent targeting. *Embo J* 20, 5176-86.

Rieder, S. E., Banta, L. M., Kohrer, K., McCaffery, J. M. and Emr, S. D. (1996). Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast vps28 vacuolar protein sorting mutant. *Mol Biol Cell* 7, 985-99.

**Rivero, F., Muramoto, T., Meyer, A. K., Urushihara, H., Uyeda, T. Q. and Kitayama, C.** (2005). A comparative sequence analysis reveals a common GBD/FH3-FH1-FH2-DAD architecture in formins from Dictyostelium, fungi and metazoa. *BMC Genomics* **6**, 28.

Roisin-Bouffay, C., Luciani, M. F., Klein, G., Levraud, J. P., Adam, M. and Golstein, P. (2004). Developmental cell death in dictyostelium does not require paracaspase. *J Biol Chem* 279, 11489-94.

Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D. and Carlier, M. F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* **119**, 419-29.

**Roudier, N., Lefebvre, C. and Legouis, R.** (2005). CeVPS-27 is an endosomal protein required for the molting and the endocytic trafficking of the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in Caenorhabditis elegans. *Traffic* **6**, 695-705.

**Rupper, A. and Cardelli, J.** (2001). Regulation of phagocytosis and endo-phagosomal trafficking pathways in Dictyostelium discoideum. *Biochim Biophys Acta* **1525**, 205-16.

Rupper, A., Grove, B. and Cardelli, J. (2001a). Rab7 regulates phagosome maturation in Dictyostelium. *J Cell Sci* 114, 2449-60.

**Rupper, A., Lee, K., Knecht, D. and Cardelli, J.** (2001b). Sequential activities of phosphoinositide 3-kinase, PKB/Aakt, and Rab7 during macropinosome formation in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* **12**, 2813-24.

Ruscetti, T., Cardelli, J. A., Niswonger, M. L. and O'Halloran, T. J. (1994). Clathrin heavy chain functions in sorting and secretion of lysosomal enzymes in Dictyostelium discoideum. *J Cell Biol* **126**, 343-52.

## S

Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R. G. and Mayor, S. (2002). GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell* 2, 411-23.

Sagot, I., Rodal, A. A., Moseley, J., Goode, B. L. and Pellman, D. (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol* 4, 626-31.

Sauvonnet, N., Dujeancourt, A. and Dautry-Varsat, A. (2005). Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. *J Cell Biol* **168**, 155-63.

Scheuring, S., Rohricht, R. A., Schoning-Burkhardt, B., Beyer, A., Muller, S., Abts, H. F. and Kohrer, K. (2001). Mammalian cells express two VPS4 proteins both of which are involved in intracellular protein trafficking. *J Mol Biol* **312**, 469-80.

Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M. and Faix, J. (2005). The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol* 7, 619-25.

Schmidt, M. H., Chen, B., Randazzo, L. M. and Bogler, O. (2003). SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *J Cell Sci* 116, 2845-55.

Schmidt, M. H., Hoeller, D., Yu, J., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., Dikic, I. and Bogler, O. (2004). Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex. *Mol Cell Biol* 24, 8981-93.

Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H., Waterfield, M. D. and Emr, S. D. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260, 88-91.

Scott, A., Chung, H. Y., Gonciarz-Swiatek, M., Hill, G. C., Whitby, F. G., Gaspar, J., Holton, J. M., Viswanathan, R., Ghaffarian, S., Hill, C. P. et al. (2005a). Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *Embo J* 24, 3658-69.

Scott, A., Gaspar, J., Stuchell-Brereton, M. D., Alam, S. L., Skalicky, J. J. and Sundquist, W. I. (2005b). Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain of human VPS4A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13813-13818.

Scott, P. M., Bilodeau, P. S., Zhdankina, O., Winistorfer, S. C., Hauglund, M. J., Allaman, M. M., Kearney, W. R., Robertson, A. D., Boman, A. L. and Piper, R. C. (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* **6**, 252-9.

Seabra, M. C. and Wasmeier, C. (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 16, 451-7.

Seastone, D. J., Harris, E., Temesvari, L. A., Bear, J. E., Saxe, C. L. and Cardelli, J. (2001). The WASp-like protein scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in Dictyostelium. *J Cell Sci* 114, 2673-83.

Seet, L. F., Liu, N., Hanson, B. J. and Hong, W. (2004). Endofin recruits TOM1 to endosomes. J Biol Chem 279, 4670-9.

Segura-Morales, C., Pescia, C., Chatellard-Causse, C., Sadoul, R., Bertrand, E. and Basyuk, E. (2005). Tsg101 and Alix interact with murine leukemia virus Gag and cooperate with Nedd4 ubiquitin ligases during budding. *J Biol Chem* 280, 27004-12.

Sever, S. (2002). Dynamin and endocytosis. Curr Opin Cell Biol 14, 463-7.

Sevrioukov, E. A., Moghrabi, N., Kuhn, M. and Kramer, H. (2005). A mutation in dVps28 reveals a link between a subunit of the endosomal sorting complex required for transport-I complex and the actin cytoskeleton in Drosophila. *Mol Biol Cell* **16**, 2301-12.

Shiflett, S. L., Ward, D. M., Huynh, D., Vaughn, M. B., Simmons, J. C. and Kaplan, J. (2004). Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* 279, 10982-90.

Shih, S. C., Katzmann, D. J., Schnell, J. D., Sutanto, M., Emr, S. D. and Hicke, L. (2002). Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* **4**, 389-93.

Shih, S. C., Sloper-Mould, K. E. and Hicke, L. (2000). Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *Embo J* **19**, 187-98.

Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I. R., Kuhlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M. A. and Wittinghofer, A. (2004). The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Mol Cell* 13, 511-22.

Sibilia, M. and Wagner, E. F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269, 234-8.

Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P. and Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2760-5.

Soldati, T. (2003). Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a menage a trois? *Traffic* 4, 358-66.

Souza, G. M., Mehta, D. P., Lammertz, M., Rodriguez-Paris, J., Wu, R., Cardelli, J. A. and Freeze, H. H. (1997). Dictyostelium lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J Cell Sci* 110 (Pt 18), 2239-48.

Sperandio, S., Poksay, K., de Belle, I., Lafuente, M. J., Liu, B., Nasir, J. and Bredesen, D. E. (2004). Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ* 11, 1066-75.

**Spormann, D. O., Heim, J. and Wolf, D. H.** (1992). Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome). The precursor forms of the soluble hydrolase carboxypeptidase yscS are associated with the vacuolar membrane. *J Biol Chem* **267**, 8021-9.

Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. and Gottlinger, H. G. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**, 689-99.

Strous, G. J. and Gent, J. (2002). Dimerization, ubiquitylation and endocytosis go together in growth hormone receptor function. *FEBS Lett* **529**, 102-9.

Sudol, M. (1996). The WW module competes with the SH3 domain? Trends Biochem Sci 21, 161-3.

Sun, Z., Pan, J., Hope, W. X., Cohen, S. N. and Balk, S. P. (1999). Tumor susceptibility gene 101 protein represses androgen receptor transactivation and interacts with p300. *Cancer* **86**, 689-96.

Sundquist, W. I., Schubert, H. L., Kelly, B. N., Hill, G. C., Holton, J. M. and Hill, C. P. (2004). Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol Cell* **13**, 783-9.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M. et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-6.

Swaminathan, S., Amerik, A. Y. and Hochstrasser, M. (1999). The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell* 10, 2583-94.

# T

Takasu, H., Jee, J. G., Ohno, A., Goda, N., Fujiwara, K., Tochio, H., Shirakawa, M. and Hiroaki, H. (2005). Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 460-5.

Tarabykina, S., Mollerup, J., Winding, P. and Berchtold, M. W. (2004). ALG-2, a multifunctional calcium binding protein? *Front Biosci* 9, 1817-32.

Temesvari, L., Zhang, L., Fodera, B., Janssen, K. P., Schleicher, M. and Cardelli, J. A. (2000). Inactivation of lmpA, encoding a LIMPII-related endosomal protein, suppresses the internalization and endosomal trafficking defects in profilin-null mutants. *Mol Biol Cell* **11**, 2019-31.

Teo, H., Perisic, O., Gonzalez, B. and Williams, R. L. (2004). ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev Cell* 7, 559-69.

Terrell, J., Shih, S., Dunn, R. and Hicke, L. (1998). A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell* 1, 193-202.

Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. and Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166, 7309-18.

Trioulier, Y., Torch, S., Blot, B., Cristina, N., Chatellard-Causse, C., Verna, J. M. and Sadoul, R. (2004). Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. *J Biol Chem* 279, 2046-52.

# U

Ungewickell, E. and Branton, D. (1981). Assembly units of clathrin coats. Nature 289, 420-2.

Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S. E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L. E. and Eisenberg, E. (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* **378**, 632-5.

Uren, A. G., O'Rourke, K., Aravind, L. A., Pisabarro, M. T., Seshagiri, S., Koonin, E. V. and Dixit, V. M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* **6**, 961-7.

### V

Vargas, G. A. and Von Zastrow, M. (2004). Identification of a novel endocytic recycling signal in the D1 dopamine receptor. *J Biol Chem* 279, 37461-9.

Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H. N., Jr. and Penalva, M. A. (2003). YPXL/I is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol Cell Biol* 23, 1647-55.

Vito, P., Lacana, E. and D'Adamio, L. (1996). Interfering with apoptosis: Ca(2+)-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science* 271, 521-5.

Vito, P., Pellegrini, L., Guiet, C. and D'Adamio, L. (1999). Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a Ca2+-dependent reaction. *J Biol Chem* 274, 1533-40.

**Vogel, G., Thilo, L., Schwarz, H. and Steinhart, R.** (1980). Mechanism of phagocytosis in Dictyostelium discoideum: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *J Cell Biol* **86**, 456-65.

von Schwedler, U. K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D. M., Chung, H. Y., Morita, E., Wang, H. E., Davis, T., He, G. P., Cimbora, D. M. et al. (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* 114, 701-13.

#### W

Wagner, K. U., Krempler, A., Qi, Y., Park, K., Henry, M. D., Triplett, A. A., Riedlinger, G., Rucker, I. E. and Hennighausen, L. (2003). Tsg101 is essential for cell growth, proliferation, and cell survival of embryonic and adult tissues. *Mol Cell Biol* 23, 150-62.

Wallar, B. J. and Alberts, A. S. (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **13**, 435-46.

Walters, K. J., Kleijnen, M. F., Goh, A. M., Wagner, G. and Howley, P. M. (2002). Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a. *Biochemistry* **41**, 1767-77.

Ward, D. M., Vaughn, M. B., Shiflett, S. L., White, P. L., Pollock, A. L., Hill, J., Schnegelberger, R., Sundquist, W. I. and Kaplan, J. (2005). The role of LIP5 and CHMP5 in multivesicular body formation and HIV-1 budding in mammalian cells. *J Biol Chem* **280**, 10548-55.

Watanabe, M., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Yano, T., Yoshikawa, H., Yanagisawa, J. and Kato, S. (1998). A putative tumor suppressor, TSG101, acts as a transcriptional suppressor through its coiled-coil domain. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 900-5.

Watts, D. J., and Ashworth, J. M. (1970). Growth of myxameobae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem* J **119**, 171-74

Weidenhaupt, M., Bruckert, F., Louwagie, M., Garin, J. and Satre, M. (2000). Functional and molecular identification of novel members of the ubiquitous membrane fusion proteins alpha- and gamma-SNAP (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment proteins) families in Dictyostelium discoideum. *Eur J Biochem* 267, 2062-70.

Weidenhaupt, M., Bruckert, F. and Satre, M. (1998). Identification of the Dictyostelium discoideum homolog of the N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Gene* 207, 53-60.

Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 169-78.

Whitley, P., Reaves, B. J., Hashimoto, M., Riley, A. M., Potter, B. V. and Holman, G. D. (2003). Identification of mammalian Vps24p as an effector of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-dependent endosome compartmentalization. *J Biol Chem* **278**, 38786-95.

Whittingham, W.F., and Raper, K.B. (1960). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A, 46, 642-649

Wiener, E. and Ashworth, J. M. (1970). The isolation and characterization of lysosomal particles from myxamoebae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum. *Biochem J* **118**, 505-12.

Williams, K. L., Kessin, R. H. and Newell, P. C. (1974). Genetics of growth in axenic medium of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum. *Nature* 247, 142-3.

Wong, R. W. (2003). Transgenic and knock-out mice for deciphering the roles of EGFR ligands. *Cell Mol Life Sci* **60**, 113-8.

Wu, Y., Pan, S., Che, S., He, G., Nelman-Gonzalez, M., Weil, M. M. and Kuang, J. (2001). Overexpression of Hp95 induces G1 phase arrest in confluent HeLa cells. *Differentiation* **67**, 139-53.

Wu, Y., Pan, S., Luo, W., Lin, S. H. and Kuang, J. (2002). Hp95 promotes anoikis and inhibits tumorigenicity of HeLa cells. *Oncogene* 21, 6801-8.

**Wurmser, A. E. and Emr, S. D.** (1998). Phosphoinositide signaling and turnover: PtdIns(3)P, a regulator of membrane traffic, is transported to the vacuole and degraded by a process that requires lumenal vacuolar hydrolase activities. *Embo J* **17**, 4930-42.

# X

Xu, W. and Mitchell, A. P. (2001). Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.* **183**, 6917-6923.

Xu, W., Smith, F. J., Jr., Subaran, R. and Mitchell, A. P. (2004a). Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans. *Mol Biol Cell* **15**, 5528-37.

Xu, Y., Moseley, J. B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B. L. and Eck, M. J. (2004b). Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* 116, 711-23.

# Y

Yamada, M., Ishii, N., Asao, H., Murata, K., Kanazawa, C., Sasaki, H. and Sugamura, K. (2002). Signal-transducing adaptor molecules STAM1 and STAM2 are required for T-cell development and survival. *Mol Cell Biol* **22**, 8648-58.

Yamada, M., Takeshita, T., Miura, S., Murata, K., Kimura, Y., Ishii, N., Nose, M., Sakagami, H., Kondo, H., Tashiro, F. et al. (2001). Loss of hippocampal CA3 pyramidal neurons in mice lacking STAM1. *Mol Cell Biol* **21**, 3807-19.

Yamakami, M., Yoshimori, T. and Yokosawa, H. (2003). Tom1, a VHS domain-containing protein, interacts with tollip, ubiquitin, and clathrin. *J Biol Chem* 278, 52865-72.

Yeo, S. C., Xu, L., Ren, J., Boulton, V. J., Wagle, M. D., Liu, C., Ren, G., Wong, P., Zahn, R., Sasajala, P. et al. (2003). Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting and endosomal transport in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Sci* 116, 3957-70.

# ANNEXES

#### I. DETAILS DES CONSTRUCTIONS CONCERNANT LA PROTEINE ALIX

#### 1. Construction des surexpresseurs

Au vu du profil d'expression de la protéine endogène, les constructions sont exprimées sous le contrôle du promoteur constitutif p*Act15* présent dans le vecteur d'expression de *Dictyostelium* Exp $4^+$ . Une double étiquette myc (myc<sub>2</sub>) est rajoutée du côté C-terminal de toutes les constructions afin de suivre leur expression.

Dans un premier temps, le cDNA d'Alix a été obtenu par RT-PCR avec les amorces alix6 portant le site de restriction BglII et l'amorce alix4 situé après le site de restriction endogène ClaI (nucléotide 2077) et une PCR classique avec l'amorce alix10 située en amont du site ClaI et l'amorce alix8 portant le site de restriction XhoI. Ces deux fragments sont sous-clonés dans le vecteur pSP72 et vérifiés par séquençage. Ce cDNA est ensuite transféré dans le vecteur d'expression Exp4<sup>+</sup> grâce aux enzymes BglII/XhoI. L'étiquette myc<sub>2</sub>, disponible au laboratoire, est digérée avec les enzymes SpeI et XhoI, puis rajoutée grâce au site SpeI porté également par l'amorce alix8 qui permet de rester en phase avec la protéine, et le site XhoI.



**Figure 93 : Construction du surexpresseur Alix**<sub>myc2</sub>. L'ADNc codant pour la protéine Alix a été sous cloné en deux étapes (RT-PCR et PCR) en passant par le vecteur intermédiaire de sous clonage pSP72. Après vérification de la séquence, l'ADNc est sous cloné en aval du promoteur Actine 15 dans le vecteur d'expression Exp4<sup>+</sup>. Une étiquette double-myc est rajoutée à l'extrémité C-terminale.

Les constructions délétées dans la partie C-terminale ont été générées en deux étapes: (1) utilisation du domaine 5' du cDNA d'Alix déjà présent dans le vecteur d'expression (fragment BgIII-ClaI), (2) ajout de fragments amplifiés par PCR à partir du cDNA d'Alix en ce qui concerne les parties 3' des constructions. Les amorces utilisées (alix10/alix25 pour la construction Alix $\Delta$ Pro<sub>mvc</sub> et alix10/alix22 pour la construction  $AlixNt_{myc}$ ) permettent le sous-clonage du produit de PCR entre les sites *ClaI* et *SpeI* du cDNA d'Alix.



Figure 94 : Constructions des surexpresseurs délétés du côté C-terminal. Pour chacune des constructions, l'extrémité C-terminale a été amplifiée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques permettant de remplacer la partie C-terminale de la construction Exp4<sup>+</sup>/Alix<sub>myc</sub>.

Les constructions Alix $\Delta N1\Delta Pro_{myc2}$  et Alix $\Delta N2\Delta Pro_{myc2}$  ont également été générées en deux étapes : (1) utilisation du fragment ClaI-XhoI déjà sous-cloné dans Exp4<sup>+</sup>/Alix $\Delta Pro_{myc}$ , (2) concernant les parties 5' des constructions, ajout de fragments amplifiés par PCR à partir du cDNA d'Alix (alix40/alix4 pour la construction Alix $\Delta N1\Delta Pro_{myc2}$  et alix41/alix4 pour la construction Alix $\Delta N2\Delta Pro_{myc2}$ ). L'amorce 5' apporte toujours le site *BglII* permettant de remplacer le fragment BglII-ClaI du cDNA d'Alix pour la construction AlixICLAI de cette nouvelle PCR.



Figure 95 : Construction des surexpresseurs délétés du côté N-terminal. Pour chacune des constructions, l'extrémité N-terminale a été amplifiée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques permettant de remplacer la partie N-terminale de la construction Exp4<sup>+</sup>/Alix∆Pro<sub>myc</sub>.

Les constructions  $AlixCt_{myc2}$ ,  $AlixCPP_{myc2}$  et  $AlixPP_{myc2}$  ont été faites entièrement par PCR avec des amorces apportant les sites *BglII* et *SpeI*, permettant leur sous-clonage dans le vecteur Exp4<sup>+</sup>, en amont de l'étiquette myc<sub>2</sub>, en remplacement du cDNA d'Alix.



**Figure 96 : Construction des surexpresseurs de l'extrêmité C-terminale.** Ces constructions sont entièrement faites par PCR en utilisant des oligonucléotides permettant le sous clonage en aval du promoteur Actine 15 et en amont et en phase de l'étiquette myc contenue dans la construction Exp4+/Alix<sub>myc</sub>.

#### 2. Construction AlixNt-NLS

Deux amorces (NLS-1 et NLS-2) ont été synthétisées en utilisant la séquence du domaine NLS du facteur de transcription StkA avec aux extrémités un site *SpeI* déjà digéré. En s'hybridant ensemble, elles forment un domaine NLS prêt à être ligué. Ce produit d'hybridation a été rajouté à la construction AlixNt<sub>myc2</sub> au niveau du site *SpeI* présent avant l'étiquette myc.



**Figure 97 : Construction des surexpresseursAlixNt-NLS.** Pour réaliser cette construction, on utilise la construction Exp4+/AlixNt<sub>myc</sub> digérée avec l'enzyme *Spel* à laquelle le produit d'hybridation des amorces NLS-1/NLS-2 est ajouté.

#### 3. Construction des mutants ponctuels

Les différentes mutations ponctuelles ont été introduites par PCR, avec une amorce portant la mutation. Les constructions sont vérifiées par séquençage puis introduites dans le vecteur d'expression  $Exp4^+$  avec une étiquette myc<sub>2</sub> du côté C-terminal. Les mutations situées du côté N-terminal sont introduites dans le vecteur contenant Alix<sub>myc2</sub> ou Alix $\Delta Pro_{myc2}$  en remplaçant le fragment BglII-ClaI :

- Alix<sup>T9A</sup> : PCR alix31/alix4 digérée par *BglII/ClaI*. La mutation est portée par l'amorce alix31.
- Alix<sup>Q181E/Q183E</sup>: PCR alix6/alix37 digérée par *BglII/NheI* et PCR alix36/alix4 digérée par *NheI/ClaI*. La mutation est portée par l'amorce alix36. Le site *NheI* est ajoutée par mutation silencieuse. Le sous clonage se fait par triple ligation *BglII/NheI/ClaI*.
- Alix<sup>D310A/N311A</sup>: PCR alix6/alix39 digérée par *BglII/PstI* et PCR alix38/alix4 digérée par *PstI/ClaI*. Le site *PstI* est porteur de la double mutation en alanine. Le sous clonage se fait par triple ligation *BglII/PstI/ClaI*.
- Alix<sup>Y315F</sup>: PCR alix6/alix13 digérée par *BglII/HindIII* et PCR alix14/alix4 digérée par *HindIII/ClaI*. La mutation est portée par l'amorce alix13. Le site *HindIII* est ajouté par mutation silencieuse. Le sous clonage se fait par triple ligation *BglII/HindIII/ClaI*.
- Alix<sup>Y315D</sup> : PCR alix6/alix21 digérée par *BglII/HindIII* et PCR alix14/alix4 digérée par *HindIII/ClaI*. La mutation est portée par l'amorce alix21. Le site *HindIII* est ajouté par mutation silencieuse. Le sous clonage se fait par triple ligation *BglII/HindIII/ClaI*.
- AlixCt<sup>K792A</sup> : PCR alix10/alix56 digérée par *BglII/SpeI* permettant le sous-clonage dans le vecteur Exp4<sup>+</sup>, en amont de l'étiquette myc<sub>2</sub>, en remplacement d'AlixCt.

#### 4. Construction pour l'anticorps Alix2 et la construction GST-PP

L'anticorps Alix2 est dirigé contre le domaine AlixCt. Ce domaine a été amplifié par PCR avec les amorces alix12 et alix15 permettant le sous clonage dans le vecteur pQE30 grâce aux sites de restriction apportés par les amorces *BamHI/HindIII*.

Le domaine AlixPP a été amplifié par PCR avec les amorces alix8 et alix24. Ce fragment a été digéré avec les enzymes *BglII/XhoI* (sites apporté par les amorces) et inséré dans le vecteur pGEX-KG digéré par *BamHI/XhoI* (les sites *BglII* et *BamHI* donnant des sites compatibles pour la ligation).

#### 5. Construction pour le double-hybride:

Le domaine CPP a été amplifié par PCR avec les amorces alix34 et alix8, le domaine PP avec les amorces alix51 et alix8 et le domaine CPP $\Delta$ Pro avec les amorces alix34 et alix25. Ces différentes amorces apportent le site de restriction *EcoRI* en N-terminal qui permet de rester dans le même cadre

de lecture que le domaine de liaison à l'ADN et le site *XhoI* en C-terminal. Ces sites permettent le sous clonage dans le vecteur pLexA.

# 6. Séquences des amorces utilisées pour les constructions concernant Alix

• Pour l'invalidation

Alix 7 : <u>GAATTC</u>TTATTCATCGAGAGAAAAAGAAC (*EcoRI*) Alix2 :<u>GGATCC</u>TTCTTTGCTGATTCACAATATC (*BamHI*) Alix3 : <u>GGATCC</u>ATCTATCATGACACAATTCC (*BamHI*) Alix28 : <u>CTCGAG</u>TCTCTATTGGCCATCAAAGC (*XhoI*)

#### Pour les sondes

Alix8 : CTCGAGTTAACTAGTATAATGTTTATTATTGAATTATAAGG (*XhoI, STOP* et *SpeI*) Alix9 : GAATTCATGAGAGCAACCTATGGTGCACATG (*EcoRI*) Alix16 : CTCGAGAAAATGTTATCCATCGAGAGAAAAAG (*XhoI*) Alix22 : CTCGAGTTAACTAGTAAGTGGTTCGTATTTTTGGATTTC (*XhoI,STOP* et *SpeI*)

#### • Pour l'anticorps

Alix12 : <u>AAGCTT</u>TTAATAATGTTTATTATTTGAATTATAAGG (*HindIII*) Alix15 : <u>GGATCC</u>ATGAGAGCAACCTATGGTGCACAATG (*BamHI*)

#### • Pour le promoteur d'alix

**Prom1** : <u>AAGCTT</u>GGTTAAAAGATGTTCCACC (*HindIII*) **Prom2** : <u>GGATCC</u>ATTTTATTATTGTTCTATTGGATG (*BamHI*)

#### • Pour les surexpresseurs

Alix6 : <u>AGATCT</u>AAAATGTTATCCATCGAGAGAAAAAG (*BglII*) Alix4 : CAAAGTGATATCATCCTTCTTGC Alix10 : <u>AGATCT</u>ATGAGAGCAACCTATGGTGCACAATG (*BglII*) Alix8 : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>ATAATGTTTATTATTTGAATTATAAGG (*XhoI, STOP* et *SpeI*) Alix25 : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>ATAACGCAGCTTCAATTTGTC (*XhoI, STOP* et *SpeI*) Alix22 : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>AAGTGGTTCGTATTTTTGGATTTC (*XhoI, STOP* et *SpeI*) Alix40 : <u>AGATCT</u>AAAATGTCATTACATCCAGAATGTTCATCA (*BglII*) Alix41 : <u>AGATCT</u>AAAATGTTGAAAGATATGTAATTTCAATCAC (*BglII*) Alix23 : <u>AGATCT</u>AAAATGTACGAACCACTTCAAATGTCTTTG (*BglII*) Alix24 : <u>AGATCT</u>AAAATGTTGGATGAAGGTACTCAATTC (*BglII*)

#### • Pour le domaine NLS

 $\label{eq:nls-1} \textbf{NLS-1}: \texttt{CTAGTAAAACCATCTAAAAAAGAGAAAAGA} \textbf{NLS-2}: \texttt{CTAGTCTTTCTCTTTTTAGATGGTTTA}$ 

#### • Pour les mutants ponctuels

Alix31(T/A) : <u>AGATCT</u>AAAATGTTATCCATCGAGAGAAAAAGAGCAGAAAAAG (*BglII*) Alix36 (QQ/EE) : <u>GCTAGC</u>AGAAGCTGAAGAATGTATCTATG (*NheI*) Alix37 (QQ/EE) : <u>GCTAGC</u>ATTATGGTTACTAATGCTTG (*NheI*) Alix38 (DN/AA) : <u>GCTGCAG</u>ATACCATCTATCATGACAC (*PstI*) Alix39 (DN/AA) : <u>CTGCAG</u>CCTTCTTTGCTGATTCACAATATC (*PstI*) Alix13 (Y/F) : <u>AAGCTT</u>ATGAGCTGGTGGAATTGTGTCATGAAAGATGG (*HindIII*) Alix14 (Y/F) : <u>AAGCTT</u>ACACCAATTGAGAAGAAACC (*HindIII*) Alix21 (Y/D) : <u>AAGCTT</u>ATGAGCTGGTGGAATTGTGTCATGATCGATGG (*HindIII*) Alix56 (K/A) : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>ATAATGTGCATTATTTGAATTATAAGG (*XhoI*, *STOP* et *SpeI*)

#### • Pour le double-hybride

Alix34b : <u>GAATTC</u>CAAATGTCTTTGAATGAGAG (*EcoRI*) Alix51 : <u>GAATTC</u>TTGGATGAAGGTACTCAATTC (*EcoRI*) Alix8 : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>ATAATGTTTATTATTTGAATTATAAGG (*XhoI, STOP* et *SpeI*) Alix25 : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>ATTAACACCAGCTTCAATTTGTC (*XhoI, STOP* et *SpeI*)

ALIX:



225 75

150 50

75 25

318 82

698 201 TCA S CTT L ATC I TCA S TCA \*AT S X CTA L AAT N GAT D ATG M TCA S GAT D GCT A GCT A AAG K GAA E TAT ( Y T CCA GAA TGT TCA A P E C S T **⊗6** ▲ GAA TGT ATC E C I CAA Q GCT A TTA L CAA Q GCA A ATG TTG M L ATA I 624 177

473 126

398 101

548 151

GTA TTC AAT AAG TTG AGA V F N K L R

GCA GG\* A X

GCA A

L TG

CAA Q

TTT F

CAA Q

AAT N

C TGT

GTT AAG AAA GCA V K K A

TCA AAT ATA GAG GGA S N I E G

AGA R

474 127

623 176

ACC T

GTA V

TTA

60

Ц

TCA TTA CAA GCA S L Q A

GAA E

TCA S

TCA S

TTC F

TCA S

H

ACA

00

CAT H

TCA S

GCA A

 $\succ$ 

더

549 152

TAT

GAA

773 226 TCT TTA AAA TCA ATT н ഗ ы Ц S TTA AAT TCA AAT L N S N CTT Ц AAT CAA 0 z TTT F GAA TAT TAT GAT ACA E Y Y D T GCT ¢ GTT  $\geq$ GCT CAA 0 ¢ GCT ¢ TTA Ц AAA ъ 699 202 GTT 774 GT 227 V 948 248 TAT Y 871 ttattttattttaaaaaag AAT TGG AAT ATA ACT GCA ACA GTT AAA AGT TAT TAT AAA GCT ATT TCA TTA 230 N W N I T A T V K S Y L Y K A I S L 1023 273 GTT TCA AGA TTA ATG ATT GCA GTT GAT AAT V S R L M I A V D N GAA CAA ( E Q ' GGT U TTT F CAA 0 GTA TCA S  $\geq$ CAA Q GAA 띠 TTAЦ AAA GGG K G gca ¢ CAC Ξ TGT 949 TG 249 C

# 00

1098 298 GAA AGA TAT GTA ATT E R Y V I GCA CCA ATT GAA TTG AAA GAG ATT GTT A P I E L K E I V TCA AAA GTA AAC TTA GCC AAA ACA S K V N L A K T AAT CAA 7 N Q 5 1024 ATT 7 274 I 1

# 1173 323 TCA GCA AAG AAG GAT AAT GAT ACC ATC TAT CAT GAC ACA ATT CCA CCA GCT CAT S A K K D N D T I Y H D T I P P A H 00/00 G ♠ 88 00 GAA E 0 1099 TCA ATC ACT AGA TAT TGT 299 S I T R Y C

90

1248 348 TTCГщ CCA д GAT Д GTT  $\geq$ TTTГщ TTA CCA GAG ATT AAT z н 띠 Д Ц CCA Д TTA Ц CCA TTA GCA AAA GCA ¢ ы ¢ Ц д AAG AAA ы ы ATT GAG 띠 н CCA പ 1174 AAA TTA ACA EH Ц ы 324

1323 373 TAT TAT AAT GAT CAA AAA GAA ACT TTA TTA AGA AAA Y Y N D Q K E T L L R K GCA R r TCT s D GAT AAA GAA G K E CTT ⊳ TCT S П Г Г GTA CCA V P TTA L TCA S 1249 AAT 7 349 N TCT S AAT CAA 0 z CAT H LLL L GAA 띠 AAT ATT н z GAT D DTTG Ц GAA 띠 1324 374

1509 

1597 396 GGA G TTA CCA L P GGA G TCA ATG ( S M 0 TTA L aataataataataataataataataatattgatattgatattgatattaatatt<br/>ctttaaaaaaag A TCA TTA S $_{\rm L}$ 1510 388

1672 421 GTT ACA AAT GAA CAA GGT U 0 띠 Z E  $\geq$ TCA ATT GAA GCA TTA GAT GTT GGT GTA CCA GTA GCA TTA AAA GAA AAG ATG AAT GTT  $\geq$ Z Σ ы ഥ ы Ч ¢  $\geq$ Д  $\geq$ U  $\geq$ Ω Ц ¢ 더 н S 1598 397 1747 446 GCT À TCA TTA L TTA TCA GAT GAA GAT AGT GCA ATT TGT L S D E D S A I C AGA TTA TTA GAG AAT ATT CAA CAA R L L E N I Q Q ATA ACT. I T AGT AAT S S N GTT 1673 GTT 422 V

0 / 0 / 0

1822 471 TTG AAA AAG GAA GAA GAT GAT GAT TTA ATG AGA GCA ACC TAT GGT GCA CAA TGG CAC AGA ACT L K K E E D E D N L M R A T Y G A Q W H R T AAT CTA Ц z БGТ U 1748 447

1897 496 GCA AAT CTA ACT CAA GAT TAT GCA AAG TAT ACA AGT CAT TTA CAA CAT TCC ACT AAA A $\rm N$  L t  $\rm Q$  d Y a K Y t S H L Q H S t K TCC TAT ACA TTG ACT S Y T L T CCA P 1823 472

1972 521 TTT ATT AGA AAG AAA TTT GAA GAT CAT AAA AAT TCA ATT CAA GAA TTA GAG AAT CAA ACA GAG ATC F I R K K F E D H K N S I Q E L E N Q T E I GAT AGT T D S I TCT S 1898 497

2047 546 GCA TTG TTA CCA ACC AAT AAT TTA CCA TCG GGT AAA ATA GCA GAG ATT GCA TCG TTG ACG GTG TTG ATG AAC A L L P T N N L P S G K I A E I A S L T V L M N ATT I 1973 522

2122 571 GAT ATC D I GAT D 2048 GAT TTG GAT GCT TTG ATG GCC AAT AGA GAA TCG ATA GCA GAG AAA CTA AAG AAT CTT TGC AAG AAG AAG 547 D L D A L M A N R E S I A E K L K N L C K K ClaI

2197 596 CTT L CCA P GAA E TAC Y CAA AAG GAT AAA TCT TTA ATT TAC GCA GAG GAA ATC CAA AAA Q K D K S L I Y A E E I Q K 00 2123 ACT 7 572 T I

|| 90 ||

2272 621 GAG AAA TTC E K F GAG AAT ( E N 1 GAA GAT ATT AGA AAA E D I R K 2198 CAA ATG TCT TTG AAT GAG AGT TTC TTG AAA CAA CAG AGG CTC ATT 597 Q M S L N E S F L K Q Q R L I 2347 646 AAT CAA AGA GAG GAA ATC CTT CAA AAG TAT GCA AAT GCT TAC AAA GTC TAC N $\mathbb{Q}$  R E E I L $\mathbb{Q}$  KYA N AYK V Y GGT G CAA Q AAT CAA AAA TCA AAA N Q K S K ACA 2273 622

- 86/80

2422 671 GAG TTA AAG GCA AAC TTG GAT GAA GGT ACT CAA TTC TAT TTG AAT TTG AAT AAA TTT TTA E L K A N L D E G T Q F Y L N F Q E I L N K F L 60 2348 AAT ( 647 N F

2497 696 GTT V 2423 AAT AGA TGT AAA GAT TTC ACC ACT GGT AGA GAG GAG GAAT GAA ATT GAA TTA AÀA AGA CAA ATT GAA GCT GGT 672 N R C K D F T T G R E N E K I E L K R Q I E A G 2572 721 TTA ACT TCA CCT TCT CCA TCT TTA CAA TCA CCA GTT AAT AAT TAT CCA AAT CAA TTC TCT L T S P S P S L Q S P V N N Y P N Q F S 2498 AAT CCA CAT TCA CCT 697 N P H S P

2647 746 TCA CCA AAT CAA CAA CAA CAA CAA CAA TAT GTA CCA TCA TGT CAA CCA CCA S P N Q Q Q Q Q Q Q Y V P S C Q P P 2573 TCA CCA CAA TAT CAT ACT 722 S P Q Y H T 2722 771 2648 CCA CAA TAC TCT TAT AAT CCA CAA CCA TAT CAA CCA CAA TTT GGT GGA CCA TTA CCA CCA CCA CAA TCT 747 P Q Y S Y N P Q P Y Q P P Q Q F G G P L P P Q S

# ● 00/00/00

2794 795 

#### **II.** DETAILS DES CONSTRUCTIONS CONCERNANT LA PROTEINE TSG101

#### 1. Construction d'invalidation

La construction a été générée en 3 étapes. Les régions choisies en 5' et 3' du gène codant pour Tsg101 sont appelées respectivement A et B. La région A a été amplifiée par PCR avec les amorces Tsg1 et Tsg5 et la région B avec les amorces Tsg6 et Tsg7 à partir d'ADN génomique. Ces fragments ont été ensuite sous-clonés successivement dans le vecteur de sous-clonage pSP72 en utilisant soit des sites de restrictions rajoutés aux amorces dans cette optique: Tsg5:*BamHI*, Tsg6:*BamHI* soit en utilisant les sites de restriction endogènes :*SphI* en 5' (nucléotide 26) et *ClaI* en 3' (nucléotide 1228). Le site *BamHI* a ensuite été utilisé pour l'insertion de la cassette BsR. Pour la transfection, le plasmide a été linéarisé grâce aux sites de restriction *SphI* (nucléotide 26) et *ClaI* (nucléotide 1228).



Figure 98 : Constructions pour l'invalidation de tsg101. La cassette Bsr, qui permet la survie des cellules lorsque de la blasticidine est rajoutée dans le milieu, a été insérée par sous clonage dans le gène codant pour tsg101. La construction, digérée par Sphl/Clal a ensuite été électroporée dans le génome de Dictyostelium. L'insertion de la construction se fait par recombinaison homologue dans le locus de tsg101.

#### 2. Construction des surexpresseurs

Les constructions sont exprimées sous le contrôle du promoteur constitutif p*Act15* présent dans le vecteur d'expression de *Dictyostelium*  $Exp4^+$ . Une double étiquette myc (myc<sub>2</sub>) est rajoutée du côté C-terminal de toutes les constructions afin de suivre leur expression.

L'ADN codant pour Tsg101 entier est amplifié par PCR sur l'ADN génomique avec les amorces Tsg3 portant le site de restriction *BglII* et l'amorce Tsg4 portant le site de restriction *XhoI*. Ce fragment de PCR est ensuite transféré dans le vecteur d'expression  $Exp4^+$  grâce aux enzymes *BglII/XhoI*. L'étiquette myc<sub>2</sub> est digérée avec les enzymes *SpeI* et *XhoI*, puis rajoutée grâce au site *SpeI* porté également par l'amorce Tsg4 qui permet de rester en phase avec la protéine, et le site *XhoI*.

L'ADN codant pour le domaine TsgUEV a été amplifié par PCR avec les amorces Tsg3/Tsg8 sur de l'ADN génomique. Cette PCR a ensuite été transféré dans le vecteur Exp4<sup>+</sup> grâce aux sites de restriction apportés par les amorces *BglII/XhoI*.

La construction Tsg $\Delta$ UEV a été faite à partir d'une PCR réalisée avec les amorces Tsg12/Tsg4, sous clonée directement dans le vecteur Exp4<sup>+</sup> grâce aux sites de restriction apportés par les amorces *BglII/XhoI*.

La mutation ponctuelle Tsg<sup>M117A</sup> a été faite en deux étapes. Une première PCR avec les amorces Tsg3/Tsg10 et une seconde avec les amorces Tsg11/Tsg4. La mutation ponctuelle est portée par l'amorce Tsg11. La triple ligation (*BglII/XbaI/XhoI*) a été introduite dans un premier temps dans Sp72 et après séquençage, la construction est transférée dans le vecteur Exp4<sup>+</sup> grâce aux sites de restriction *BglII/XhoI*. Le site XbaI porté par les amorces Tsg10 et Tsg4 est ajouté par mutation silencieuse.



**Figure 99 : Construction des différents surexpresseurs de Tsg101.** Les différents domaines d'intérêt sont amplifiés par PCR avec des amorces apportant les sites de restrictions nécessaires à leur sous clonage dans le vecteur d'expression Exp4<sup>+</sup>. Une étiquette double-myc est rajoutée à l'extrémité C-terminale.

#### 3. Construction pour les anticorps

L'ADN codant pour le domaine UEV a été amplifié par RT-PCR avec les amorces Tsg1/Tsg2 pour le sous clonage dans le vecteur pGEX-KG grâce aux sites de restriction *BamHI/HindIII*.

La seconde construction a été faite en utilisant le fragment *BamHI/EcoRI* de la RT-PCR Tsg1/Tsg2 et le fragment *EcoRI/XhoI* de la construction Exp4<sup>+</sup>/Tsg101 grâce au site *EcoRI* endogène

(nucléotide 313). La triple ligation *BamHI/EcoRI/XhoI* est insérée dans le vecteur pQE30 digéré par *BamHI/SalI* (*SalI et XhoI* donnant des sites compatibles pour la ligation).

# 4. Séquences des amorces utilisées pour les constructions concernant Tsg101

#### • Pour l'invalidation

Tsg1 : GGATCCATGTATGGTCATCATGGATAC (BamHI)Tsg5 : GGATCCAACTAATCCCTGTAAATTTACATG (BamHI)Tsg6 : GGATCCATCCATATATATCAAGTTGG (BamHI)Tsg7 : TATCCATTTCTCCAATTGTTC

#### • Pour tester l'invalidation par PCR

**Tsg3** : AGATCTAGAATGTATGGTCATCATGGATAC *(BglII)* **Tsg8** : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>TTGTTGTGATACTCTTGTC *(XhoI, STOP* et *SpeI)* 

• Pour la sonde

Tsg6 : <u>GGATCC</u>ATCCATATATATCAAGTTGG (*BamHI*) Tsg7 : TATCCATTTCTCCAATTGTTC

#### • Pour les anticorps

**Tsg1** : <u>GGATCC</u>ATGTATGGTCATCATGGATAC (*BamHI*) **Tsg2** : <u>AAGCTT</u>TTATTGTTGTGATACTCTTGTC (*STOP, HindIII*)

#### • Pour les surexpresseurs

 Tsg3 : <u>AGATCT</u>AGAATGTATGGTCATCATGGATAC (BglII)

 Tsg4 : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>TTTAGAAAAATATTGTTGTTGATTG (XhoI, STOP et Spel)

 Tsg8 : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>TTGTTGTGATACTCTTGTC (XhoI, STOP et Spel)

 Tsg12 : <u>AGATCT</u>AAAATGCACCCTTTAGAGACAAGAGTATC (BglII)

#### • Pour le mutant ponctuel

Tsg10(M/A) : <u>TCTAGA</u>ACCATTGTTGGGAATTCTTGTGG (*XbaI*) Tsg11(M/A) : <u>TCTAGA</u>TCCAACACCAGAGGCAAGGATTGTAG (*XbaI*)

TSG101 :

780 219 855 244 405 94 480 119 555 144 630 169 705 194 150 50 230 70 330 75 25 gtaagtaaaaaaaagaaaaaaa GTT AAT TTA ATA TGT ATA AAA GGT ACA ATT CCA ATT TGT TTT AAA GGT ATT AAT TAT TAT TTA CCA ATT V N L I C I K G T I P I C F K G I N Y Y L P I TCA CAA S Q ACA CAA T Q GAT D TAT AGA GAT CCA CTA AGA ATA AGT AAA GAT Y R D P L R I S K D ATT I CCA CCT TAT GGT TCA TCA CCA ACC AAT AAT GTG P P Y G S S P T N N N V TGG AGT TCC AAT TCA W S S N S AAT ACA TCT TTA CCC CCA CCA AAA CAA CCA CAA N T S S L P P P K Q P Q GTG AGG R ♠  $\geq$ ATA CCA GAG ATG P E M AAA CCA CCT TTA GAG ACA AGA GTA K P P L E T R V ТАТ Ү **8** / **8** н CCC TCA S 00 ¢ S TCA TTAЧ CCA ACT P T GTT TTA GAT CCA ACA V L D P T TAT CAT CCA TAT ATA TCA AGT Y H P Y I S S AGT ACT TCA AAT TCC S T S N S GAA AAT ATA CCA A E N I P N 80 AAT . Z GTT 0  $\geq$ ATG Σ TAT Y ATG CCA P CAA TTT F GCT R 0 CAA ACA AGT S AGA TTT F TCA S പ്പ H 0 TTC CCA F TAT ATT Y I CCA P CAA Q СCG Р GTT V TTT F TCA S CCA CCA TCG TAC GAT TCA ATT AAA AAT AAA ACT AAT P P S Y D S I K N K T N Θ GCA CAT H TCA S GTA AAT TTA CAG GGA TTA V N L Q G L CCA CAA CCA CCA CAA AAT AAT ATA TCA P Q P P Q N N I S TAT GGT Y G ¢ AAT N L GAA E GAT ( CAT GCA H A TTT CTT Z CCA AAT P N L C CCA P TTA AAC TAT CCA CAA L N Y P Q SphI CCA P ATG M ▼ 0 TAC CCA Y AAA ATG K M I CCA P ACT T ПTC F TCA S TTA L CCA P CTA CAT CAT TTA L GGA CAA 0 Ц U н TTT F CCA P CAA Q CAA Q TGT C GGT CAT CAT AAA ATG CAT ACT K M H T Ξ GTA ( CAT ( CAA ( ACA CAT H 0 / C Ξ GAA GTA GAG AAT V E N CAA Q CAA Q TGG GGT U М U g AT AGA ( R TAT Y AAA K GTT CAA GCA ATT 0 ¢ н  $\triangleright$ ATG M 76 AAT 26 N TTA L ATA ACG CAA 781 CCA 220 P GCA 0 К н 151 51 231 331 71 406 95 481 120 556 145 631 170 706 195  $\neg$ 

1155 344 1005 294 1080 319 1230 369 1305 394 1380 419 1455 444 1530 469 1605 494 930 269 TCA TTG S L CAA Q AAA K TTG L TCT S TAC AAT AGT CAA ATG Y N S Q I GAT D TCA ACC ATC S T I TCA AAT AGA ATA TCT TTG GAA GAA TAC CTT AAA AAT GTT S N R I S L E E Y L K N V CAA AAT CAA Q N Q AAT ATT ON I AAA K CAA Q QTT V TTT F AAC AAA N K CCA P TCA S ATT I CAA CAA TAC AAT CAA CAA TAT Q Q Y N Q Q Y CCA P CCA P ACA T TCA S GAT GAT CAA TTT ATA ATT AGA О പ്പ Ø GAT D C TGT CAT H CCA P TCA S Ω н CAA Q ATA I GAT AAA TCA D K S AAA CAG CAA CAA CAA ACA K Q Q Q Q T TCG AAT CAA TTG GCA ACT S N Q L A T TTA AAA TTG GTC TCT TTC GAA GCT F E A S н AAT AAT AAT ATA N N N I GTT GAT V D  $\geq$ Гщ Ц 0 GAA AAT ( E N I GAA ATG E M AAG GAT K D AAA AAA GTT K K V ы Ц GAG ATT Z ATA AAC I N CAA Q AAA AGT K S TTGCGT R Ц TTA L CAA Q CAA Q AAA GAT TCA CTC TCA AAA CAA GTT  $\geq$ 0 CAA GCA A AAA K TGG M TTA L GAG AAG GAG GAG E K E E TTC ATT ATT AGA GCA ACA F I I R A T CCA P ы TTA CAT L H CAA CAA Q Q GAT D GCA A TCA S GAA CAA TTG GAG AAA E Q L E K CAA CAA CAA AAT TCA Q Q Q N S Ø Ŋ ACA ( ATT I ACA T Ц പ്പ 0 CAA CAA O Q Q 0 GAA CCA E P GAC ACT D T GTT ∨ GAT AAA GCA D K A S TTA CTT ( L L l CCA P Ω ACA ТАТ Ү ACT T CAA Q ы CCA P TAT Y CCA P TTT F AAA K ATT I P CCT TTA L CAA CTA CAA CAA CAA CAA L Q Q Q Q Ø TCG AAA S K CCA P GCA A CCA P TCA AAG AAA S K K AAT GAA AAC N E N CTC TAC TAC L Y Y GAT БGТ Д U AGT AGA C CCA P TTGCCA P TTAЦ Ц ъ ССС P CCT TTA L GAT CAA ATA CCA P н GAG TTA E L L TG GAT TTA D L CCA P CCA P CCA P TTA L CTA 0 Ц TCA TCA S TTA L GAA E CAA Q TCA CAA Q 1606 AAA TAA 495 K \* ഗ Ω Ŋ 1306 ATC 0 395 I I CAA Q GAA GAT D GAA E CAA Q ACA CCA P CCA P AGA H 띠 പ്പ 856 245 931 270 1006 295 1081 320 1156 345 1231 370 1381 420 1456 445 1531 470

 $\begin{array}{c} 1\,6\,1\,1\\ 4\,9\,6\end{array}$ 

#### **III. DETAILS DES CONSTRUCTIONS CONCERNANT LA PROTEINE VPS4**

#### 1. Construction d'invalidation

La construction a été générée en 3 étapes. Les régions choisies en 5' et 3' du gène codant pour Vps4 sont appelées respectivement A et B. La région A a été amplifiée par PCR avec les amorces Vps4-7 et Vps4-8 et la région B avec les amorces Vps4-3 et Vps4-4 à partir d'ADN génomique. Ces fragments ont été ensuite sous-clonés successivement dans le vecteur de sous-clonage pSP72 en utilisant les sites de restrictions rajoutés aux amorces dans cette optique: Vps4-7:*HindIII*, Vps4-8:*PstI*, Vps4-3 :*Pst-I* et en utilisant le site de restriction endogènes :*EcoRI* en 3' (nucléotide 1527). Le site *PstI* a ensuite été utilisé pour l'insertion de la cassette BsR. Pour la transfection, le plasmide a été linéarisé grâce aux sites de restriction *HindIII/EcoRI*.



Figure 100 : Constructions pour l'invalidation de vps4. La cassette Bsr, qui permet la survie des cellules lorsque de la blasticidine est rajoutée dans le milieu, a été insérée par sous clonage dans le gène codant pour vps4. La construction, digérée par *Hind111/EcoR1* a ensuite été électroporée dans le génome de *Dictyostelium*. L'insertion de la construction se fait par recombinaison homologue dans le locus de vps4.

#### 2. Construction des surexpresseurs

Les constructions sont exprimées sous le contrôle du promoteur constitutif act15 présent dans le vecteur d'expression de *Dictyostelium* Exp4<sup>+</sup>.

L'ADN codant pour Vps4 est amplifié par PCR sur l'ADN génomique avec les amorces Vps4-1 portant le site de restriction *BglII* et l'amorce Vps4-2 portant le site de restriction *XhoI*. Ce fragment de PCR est ensuite transféré dans le vecteur d'expression  $Exp4^+$  grâce aux enzymes *BglII/XhoI*. L'étiquette myc<sub>2</sub> est digérée avec les enzymes *SpeI* et *XhoI*, puis rajoutée grâce au site *SpeI* porté également par l'amorce Vps4-4 qui permet de rester en phase avec la protéine, et le site *XhoI*.

La mutation ponctuelle Vps4<sup>E235Q</sup> a été faite en deux étapes. Une première PCR avec les amorces Vps4-1/Vps4-2 et une seconde avec les amorces Vps4-3/Vps4-4. La mutation ponctuelle est portée par l'amorce Vps4-2. La triple ligation (*BglII/PstI/XhoI*) a été introduite dans un premier temps dans Sp72 et après séquençage, la construction est transférée dans le vecteur Exp4<sup>+</sup> grâce aux sites de

restriction *BglII/XhoI*. Le site *PstI* porté par les amorces Vps4-2 et Vps4-3 est ajouté par mutation silencieuse.

La mutation ponctuelle Vps4<sup>K181A</sup> a été faite en deux étapes. Une première PCR avec les amorces Vps4-1/Vps4-10 et une seconde avec les amorces Vps4-9/Vps4-4. La mutation ponctuelle est portée par l'amorce Vps4-10 et Vps4-9. La triple ligation (*BglII/NheI/XhoI*) a été introduite dans un premier temps dans Sp72 et après séquençage, la construction est transférée dans le vecteur Exp4<sup>+</sup> grâce aux sites de restriction *BglII/XhoI*. Le site *NheI* porté par les amorces Vps4-10 et Vps4-9 est ajouté par mutation silencieuse.

Les ADN codants pour Vps4 ou Vps4<sup>E235Q</sup> ont été amplifiés par PCR à partir des constructions  $Exp4^+/Vps4$  ou  $Exp4^+/Vps4^{E235Q}$  avec les amorces Vps4-1 portant le site de restriction *BglII* et l'amorce Vps4-4 portant le site de restriction *XhoI*. Ces fragments de PCR ont ensuite été transférés dans le vecteur d'expression pCsa :GFP digéré par *BamHI/SalI* (compatibles avec *BglII/XhoI* pour la ligation) permettant l'expression sous le contrôle du promoteur du gène *contact site A* (Csa) avec une étiquette GFP en N-terminale.



Figure 101 : Construction des différents surexpresseurs de Vps4.

#### 3. Construction pour l'anticorps

La RT-PCR sur *vps4* a été faite avec les amorces Vps4-1 et Vps4-4, digérée avec les enzymes *BglII/XhoI* ce qui permet l'insertion dans le vecteur PGEX-KG digéré par *BamHI/XhoI* (car les sites *BglII* et *BamHI* donnent des sites compatibles pour la ligation).

# 4. Séquences des amorces utilisées pour les constructions concernant Vps4

• Pour l'invalidation

Vps4-7 : <u>AAGCTT</u>TAAAATGTTTGTATTAACC (*HindIII*) Vps4-8 : <u>CTGCAG</u>TAAATATGATTTACCTGTACCTG (*PstI*) Vps4-3 : <u>CTGCAG</u>TTCACGTAATGATCAAGAATCTG (*PstI*) Vps4-4 : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>TACACCATCTTGCCCAAAATC (*XhoI*, *STOP* et *SpeI*)

#### • Pour l'anticorps

**Vps4-1** : <u>AGATCT</u>AAAATGGGTGATGTTAATTTCTTAC (*BglII*) **Vps4-4** : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>TACACCATCTTGCCCAAAATC (*XhoI*, *STOP* et *SpeI*)

#### • Pour les surexpresseurs

Vps4-1 : <u>AGATCT</u>AAAATGGGTGATGTTAATTTCTTAC (*BglII*) Vps4-2 : <u>CTGCAG</u>AGAGAATCAACTTGATCAATAAAAATTAC (*PstI*) Vps4-3 : <u>CTGCAG</u>TTCACGTAATGATCAAGAATCTG (*PstI*) Vps4-4 : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>TACACCATCTTGCCCAAAATC (*XhoI*, *STOP* et *SpeI*) Vps4-9 : <u>GGTACC</u>GGTGCATCATATTTAGCAAAAGC (*NheI*) Vps4-10 : TAAATATGATGC<u>ACCGGT</u>ACCTGGTGG (*NheI*)

325 74 400 99 475 124 550 149 625 174 250 49 GTT GCA ACA GAA ATT TCA 806 V A T E I S 193 154 46 75 25 AAA AAT K N GCA TTA AAA Tgtttgtattaacctttct L K Y TTA L TCA S TAC TTA AAA GAA Y L K E TTA TTA TAT L L Y ¢ TAT Y GGΤ TCT S IJ gca GAA E TCC S GCA AAT ¢ z TTA AAA L K TTA L GAT AAT CCA CAA ATG TTT ACA GGT AAT AGA AAA CCA TGG AAA GGT ATT P Q M F T G N R K P W K G I ¢ Z S TCT AGT TTA TAT CAA GCA AAA GAA L Y Q A K E Д S 0 GAA CAA CAA БGТ GAG GAT AAA AAA AGA AAT GAT E D K K R N D 0 U GGT ACA GGT AAA TCA TAT TTA GCA AAA GCA G T G K S Y L A K A GAA GCT ¢ 되 ACA ACA GCT T T A caa aga gca Q R A AAT AAA AGT AAT AGT N K S N S GCA ACA 0 EH ¢ CAA 0 TAT CTT Y L CAA GGT GGT TTT F 0 GCT A TGG W GTT  $\geq$ 0 GAA E GAA E GGT G CCA P AAA TGG GAT GAT GTA K W D D V ATT н ATG GAT M D CAA TTA L TTA L GGT G 0 AGT GCA AAA ACA A K T GTT ATT  $\geq$ н GAA GAT 7 E D M ATC CAA I Q GCA GTA GCA R R CCA P AAA  $\geq$ К 0 AAA TTT ( K F I 725 ttattactactatttattataaattag CCA 176 P CAA Q AAA K TAT Y AAG AAA CCA K K P GAT D ACA AAA CCA AAT GTT T K P N V TTA L ATT I GAT D TTA Ц AGA R TTC ACA T GCA AAA GAG A K E TTT CCA ATT F P I Гщ GCA CAT A H AAA GCA K A AAG AAT K N AAT z GTT  $\geq$ GTA ACA A AAA TCA K S GAT GAA E TCA S AAA TCA GTT ATC G Д Ŋ н GCA A AGA R GGT ы  $\geq$ U 626 GGT ( 175 G ATG M GAA E 476 ATT 125 I 76 TAT 26 Y GAT GGT G ECT GCT К Ω 251 50 326 75 401 100 551 150  $\neg$ 

881 218 807 TCA ACA TTT TTT TCA ATT TCA CCA TCA GAT ATT GTT ACC AAA TGG TTA GGT GAT AGT GAA AAA TTG GTG AAA CAA 194 S T F F S I S P S D I V T K W L G D S E K L V K Q

VPS4:
1106 293 1256 343 1406 393 1556 443 1181 318 1481 418 1031 268 1331 368 956 243 GAA E TCA S GAA TTC ACT AAT GAT TTT GGG CAA GAT GGT E F T N D F G Q D G GAT D CCA P ССС Р TCA CCT GGT GAT CCA TTG GCT CAA GAG ATG S P G D P L A Q E M TTA AAG AGT TTA AGA L K S L R CGT R TCA AAT N Ц С С С С TTT F ACT T TTC AAA CAA ATT AGA GCA F K Q I R A S GAT ATT ( D I 0 TCA S CGT R TCA S GGT G đ GTT V AGA R GGT G TGT C TCA S L CGT ATT I G GT TTAЦ CAT H AAT N GAG GGT TAC TCG GGT E G Y S G ACA ATC GCC GAT TGT T I A D C s TCT TTA GCA ATT L A I CAA ATT 0 Q I GAT D ATG M GAA GTT E V CAA . Q CAT H GCA ACT ( A T I GAT D 0 ATT I TTT F EcoRI C TC ATG ' L TG GAT Д TTA ACC L T AAA K TGT C TTT F GGT GGT TGT C ATT GAA ATT GTT ATT AAA CCA TCT GTT AAT AAA GCT GAT TTA GAT AGA TAT GTT V I K P S V N K A D L D R Y V н н GAG E CAA Q TGG W СCT Р GCC A TTT F ഥ CCA P GAT D ACA T AGA R GTT V TAT GTC ACA Y V T CCT P GTA ATT н AAG GCA A ATT I AAA AAG TTG GCA K K L A GCA A AAA TTA AAA GAA K L K E  $\geq$ AGT ATA . I N N CAA ( с С С С С С С С С С Ŋ AAT . CGT R ACA T CCA P GTT V GTT ATG ACC GAT V M T D z AAT 2 GCA GAA E CCA P AGA R z R AAG K TAT Y CAA Q CCA ACT P T GCA A GCA A CCA P GAA TCA S TTG L TTA L GAT D ATG M [고] GAA E GCA TCA S GAC ATT I AGG GTA V GGT G Ø പ്പ TAT ATC ( Y I GTT CAA ( V Q *i* GAT CCT D P GAT ATT D I GCA GCA A TCT S TTG ¢ Г GAA E ATA I GAT 0 ATG Σ AGA ATA ' R I ACA TTA ( T L ' GTA AAG V K AGA GAG R E TGG ATG W M GAG CAA Q G GT G ഥ TTT F GAT D GAT D AAT N TTGAAG K AAT . TTG L r TCT S ACT N TCC 882 TTC 219 L z 957 244 1032 269 1107 294 1182 319 1257 344 1332 369 1407 394 1482 419

1557 GTA TAA 444 V \*

#### **IV. DETAILS DES CONSTRUCTIONS CONCERNANT LA PROTEINE VPS32**

## 1. Construction d'invalidation

Une seule PCR a été faite sur l'ADNg avec les amorces Vps32-3 et Vps32-4. Ces deux amorces apportent le site de restriction *XbaI*. Ce fragment est ensuite sous-clonés dans le vecteur de sous-clonage pSP72 grâce à ce site. La cassette Bsr est ensuite ajoutée grâce au site de restriction endogène : *EcoRI* (nucléotide 399). Pour la transfection, le plasmide a été linéarisé grâce au site de restriction *XbaI*.



Figure 102 : Constructions pour l'invalidation de vps32. La cassette Bsr, qui permet la survie des cellules lorsque de la blasticidine est rajoutée dans le milieu, a été insérée par sous clonage dans le gène codant pour vps32. La construction, digérée par a ensuite été électroporée dans le génome de *Dictyostelium*. L'insertion de la construction se fait par recombinaison homologue dans le locus de vps32.

## 2. Construction des surexpresseurs

Les constructions sont exprimées sous le contrôle du promoteur constitutif *act15* présent dans le vecteur d'expression de *Dictyostelium* Dip-j.

L'ADN codant pour Vps32 est amplifié par PCR sur l'ADN génomique avec les amorces Vps32-1 portant le site de restriction *BglII* et l'amorce Vps32-2 portant le site de restriction *XhoI*. Ce fragment de PCR est ensuite transféré dans le vecteur d'expression Dip-j grâce aux enzymes *BglII/XhoI*. L'étiquette myc<sub>2</sub> est digérée avec les enzymes *SpeI* et *XhoI*, puis rajoutée grâce au site *SpeI* porté également par l'amorce Vps32-2 qui permet de rester en phase avec la protéine, et le site *XhoI*.

La construction n'ayant pas d'étiquette myc à la fin a été fait avec les amorces Vps32-1 et Vps32-10 qui ne possède pas de site *SpeI* avant le STOP.

# 3. Construction pour l'anticorps

L'ADN codant pour Vps32 a été amplifié par RT-PCR avec les amorces Vps32-5/Vps32-6 pour le sous clonage dans le vecteur PGEX-KG grâce aux sites de restriction *BamHI/HindIII*.

# 4. Séquences des amorces utilisées pour les constructions concernant Vps32

• Pour l'invalidation

**Vps32-3** : <u>TCTAGA</u>TACTCAAGAAACAATTGG (*Xbal*) **Vps32-4** : <u>TCTAGA</u>TTCTTCCAAAGCTCTAATCTC (*Xbal*)

# • Pour l'anticorps

**Vps32-5** : <u>GGATCC</u>ATGAAACTCTTTGGTAAACC (*BamHI*) **Vps32-6** : <u>AAGCTT</u>TTACATTGCTAAAGATTCTTCC (*STOP, HindIII*)

## • Pour les surexpresseurs

**Vps32-1** : <u>AGATCT</u>CCTTAAAAAATGAAACTCTTTGG (*BglII*) **Vps32-2** : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>CATTGCTAAAGATTCTTCC (*XhoI*, *STOP* et *SpeI*) **Vps32-10** : <u>CTCGAG</u>TTACATTGCTAAAGATTCTTCC (*XhoI*, *STOP*)

316 84 549 148 225 75 989 98 708 189 150 50 474 123 624 173 798 197 75 GCA TTA GAG AAT GCA AAG ATG AAT ATG GAA ATT ATG A L E N A K M N M E I M TTA CAA L Q GAC GTA D V GAT D AGC S TAT GAG CAA GAA TTA GAT GCT CAA TTA CTT AAT Y E Q E E L D A Q L L N GGT AAC CAA G N Q TTAGTC V Ц ACA TTA L AAA K GAT D H ACA TTA L TTAGTC V CAT GGT CAC CTT ACT ATC GAT AAA GTT H G H L T I D K V Ц LTD > GAG ATT CAA GAG CAA ATG GAA ATT CAC GAA GAA ATT TCA AAT GCT ATC AGT CAA CCA E I Q E Q M E I H E E I S N A I S Q P AAG K AGA പ്പ GAG E GCA A CTT Ц ' CAA AAT Q N AAA K AAA K 799 AAA CTT TCA AAA GAA GAA GAA GAG ATT AGA GCT TTG GAA GAA TCT TTA GCA ATG TAA 198 K L S K E E E E I R A L E E S L A M \* GAA E GGT 0 / 0 / 0 Ċ CAA Q TTA AAA AAG AGA AAT AAT TTT L K K R N N F ACA ATT н GAA E EH GAA E AAA K Ø GAA E CAA Q ATT TTT ( I F *I* GAT ACT D T TTA L GAA E TTA L GAA E TTA GCT L A AAA K GAT D GCA AGA TCA TTA AGA A R S L R CAA 0 317 ataatcaccaccaccaactaataataaattutttttag 85 9 L C C AAA CAA Q GAA GAA TTA CTA AGA GAA E E L L R E К CCA P TTA L TTA L AAA K TTT F ₽ CCA ACA T GCA A AAT N L AAA CAA Q GAA E ATG AGA GAT GGT M R D G Ы G AAG AGA ( K R GAT ACA D T AGG R GGТ U GAA ( E AAA K TTT F AAA AGA K R C.T.C TCA TAT S Y GAA E GAT D ATG AÀA M K GAA E 400 AAT TCA 99 N S GAA E CTT L EcoRI 475 ATT ( 124 I 625 ATT 2 174 I CAA Q GGT G ATG M GTT V 151 51 226 76 550 149 709 190 76 26 VPS32:

# V. DETAILS DES CONSTRUCTIONS CONCERNANT LA PROTEINE FORMINE1

# 1. Construction d'invalidation

La construction a été générée en 3 étapes. Les régions choisies en 5' et 3' du gène codant pour la Forminel sont appelées respectivement A et B. La region A a été amplifiée par PCR avec les oligonucléotides F8 et F9 et la région B avec les oligonucléotides F10 et F4 à partir d'ADN génomique. Ces fragments ont été ensuite sous-clonés successivement dans le vecteur de sous-clonage pSP72 en utilisant soit des sites de restrictions rajoutés aux oligonucléotides dans cette optique : F8 : *EcoRI*, F9 : *BamHI*, F10 : *BamHI* soit en utilisant un site de restriction endogène :*HindIII* (nucléotide 2152). Le site *BamHI* a ensuite été utilisé pour l'insertion de la cassette BsR. Pour la transfection, le plasmide a été linéarisé grâce aux sites de restriction *EcoRI* et *HindIII*.



**Figure 103 : Constructions pour l'invalidation de la Formine 1.** La cassette Bsr, qui permet la survie des cellules lorsque de la blasticidine est rajoutée dans le milieu, a été insérée par sous clonage dans le gène codant pour la Formine1. La construction, digérée par *EcoRI/HindIII* a ensuite été électroporée dans le génome de *Dictyostelium*. L'insertion de la construction se fait par recombinaison homologue dans le locus de *for1*.

#### 2. Construction des surexpresseurs

Les constructions Exp/FH2myc et pGEX/FH2 ont été faites à partir des produits de PCR F7/F6 et F1/F2 digérés par *BamH1/HindIII/XhoI*. La triple ligation est insérée dans le vecteur pGEX-KG digéré par *BamH1/XhoI* et dans le vecteur Exp4<sup>+</sup> digéré par *BglII/XhoI* (*BglII et BamHI* donnant des sites compatibles pour la ligation). L'étiquette myc a été ajoutée en C-terminale de la construction Exp/FH2 grâce au site *SpeI* porté par l'amorce F2.



**Figure 104 : Sous clonage du domaine FH2 de la Formine 1.** Le domaine FH2 a été amplifié à l'aide de 4 amorces et du site *HindII*I endogène. Les produits de PCR ont ensuite été introduits dans les vecteurs d'intérêts pGEX-KG pour exprimer ce domaine en bactéries et dans le vecteur d'expression de *Dictyostelium* Exp4<sup>+</sup>.

# 3. Séquences des amorces utilisées pour les constructions concernant For1

• Pour l'invalidation

**F8** : <u>GAATTC</u>AATTTTACAATGGGAATGTAC (*EcoRI*) **F9** : <u>GGATCC</u>ATCTTCAATACCAATTTGTGTACC (*BamHI*) **F10** : <u>GGATCC</u>ACAAATTTCATCGCGTGTAAC (*BamHI*) **F4** : CTCTCTCTTTAATGCTTCGTC

• Pour la sonde

 $F3: {\tt GTGTTTGAAGAAGAGTTATCAAC} \\ F4: {\tt CTCTCTCTTTAATGCTTCGTC} \\$ 

• Pour les protéines de fusion GST-FH2 et Exp4<sup>+</sup>:FH2<sub>mvc</sub>

F7 : <u>GGATCC</u>AAAATGCCTGCTAAACCAATTATTAAACCATC (*BamHI*)
F6 : TGGTTCACCAAAGTAAGAGGTG
F2 : <u>CTCGAG</u>TTA<u>ACTAGT</u>TTTTTTAATTGGCCTGATGG (*XhoI, STOP* et *SpeI*)
F1 : <u>GGATCC</u>GATTTCGTACCAATGATCAATGATCCA (*BamHI*)

FORMINE 1 :

75 25 AGT S AGT Ŋ TTAЦ AGA പ്പ ATT TCA S TCA Ŋ AGG AAC Z പ്പ GGT U ATTACA EH AGT S GGT IJ GGΤ U AGT AGT Ŋ Ŋ AAT . z AGT S GAG 더 TTA Ц GAT Д TTTГщ TCT Ŋ ATG M  $\neg$ 

TTG Ц CTC Ц TTA Ц GAA ۲Ì TTTГщ ATC ATA GAT TTA GAT AGA GAG I I D L D R E GAA Гц TTA AAT z Ц TCA Ŋ GTA ⊳ ACT T AGT S GAA . 띠 TCA S CCA P gca A TTA Ц gga Ċ 76 26

150 50 225 75 ACA TTA T L CGT R AAA K TCA ATG CAA AGT TTA CCA GAT ATA M Q S L P D I ATA AAG AGA AAA CAA I K R K Q CCA P GAT D GAA E ATT I GCA A TTA L AAA K GAT D 151 51

300 100 GTT AAA V K D GAT GCA R TTT F TCA S AAA CAC AAA GGA CCA ATT GAA K H K G P I E GAT ATC TAC AGA ACA GTT D I Y R T V AAC AAA GCG N K A C AA Q GAA E TTA L 226 76

EcoRV

375 125 TTA AAC ACT L N T ATT CAT н н CGT പ്പ ATT AAA ACA TTA Ц E ы н GAT ATC GTT CCA ATT V P I AAA CAT ( K H <sup>1</sup> ACT . E ATC AAT Z н AGT TCA S S GTA ATC н  $\geq$ TCA S 301 101 450 150 ATT TTA AAG AGA CTC I L K R L GTT CAA CCA ATT TTA AAT V Q P I L N GGT G GAT AAC GAT D N D TTT TTA F L TCA S CAA Q GAT TGG ATT D W I GAT AGA D R 376 GCA 126 A

GAA 더 451 151 838 161 746 aatcagtactaataagttttctttttttttttttttaaatttaatcatttaaatcttttaatattttaatattttatag C CGA AAA AGA AAA GAG CAT 156

913 186 gca ATT TAT GAA 되 ATG ( Σ БGТ Ċ TTA ATG AAA ATT AAA ATT ы ы Σ H ACA AGA TGT ATT GCA GCA T R C I A A ATT TTA CAA TGG GAA TGT I L Q W E C 839 TCA 1 162 S

1409 287 GG gtaaataattaaattaatatttttctctactatagtttttaaaaa 1074 G 1259 237 1334 262 1582 312 1732 362 1807 387 1657 337 988 211 GTT TTA V L GAA E ACT GAT TTA CCA TCA CGT ATT GAA ATT AGA AAA GCA TTT D L P S R I E I R K A F TCA TCG CGT GTA ACT GGT ACA CCA TCA CAA CAA GAA TTG ATA ACA TTG ATG ACT CAT S S R V T G T P S Q Q E L I T L M T H CTC TAT AAT GCA TTA GCA AAT CAA TTG GAA L Y N A L A N Q L E GTT  $\geq$ TTA ACA L T GGT ATT GAA н 더 TTG AAA 0 Ч U ы TAT Y GAT ACC CCA TTA ATT AAA GCT AAA ACT D T P L I K A K T TCA CAA CAA GGT ACA CAA AITI' S Q Q G T Q I CAT 0 н GAA E TAT  $\succ$ GCT A ATG ATT н TTA AAA ATA GAG AAA AAT L K I E K N Σ TTA ACT TCA Ŋ EH Ч TGG ACA W T TTA AAT GTT Z  $\geq$ Ц CAT H TTG TCA S GAG TTA TCA ACA GAT GAA CAA E L S T D E Q σTT V TCA CCA AGT S P S Ц GTA CAA V Q TTA GGT L G TGT ACT GAT AGA GGT υ IJ TTA Ц പ്പ AAT TTA ( N L ATG GTA ATT TCA TCA TCA AAT TTA GGT S S N L G  $\triangleright$ Д Ŋ Σ EH CTT U V TTT F ATT Ц 0 AAT GCA TAT Y TGT R υ z TCA CAA ATT S Q I ACA AGA R AAT GAA GAA ATT H z ഥ ATA ACT I T ATG AGT M S ATC ACT GCA TTA AAT TTA AAG ATT 0 E R н н ഥ GCA TTT T CAA TTT0 ¢ Гщ ы GAA E GTG CCT TTATTTTTC CAA CGT F Q R ATG TCA Ц Гц ρ Ŋ Ч  $\geq$ CTT AAA K GAT TTA TTTſェ Ц 0 Ц Ω Σ Z AAA K TTA GAT GAA TCA TGT Ц О S 더 U Ч 914 989 212 1583 313 187 1260 238 1335 263 1410 288 1658 338 1733 363

1882 412 1808 GAT GAA TTG AAA ATT CAT CCA GAT TTA GAT GTT ACC TTG GTG TCA TTG TTA TTC CCT GAA GTA AAG AAA TCA AGT 388 D E L K I H P D L D V T L V S L L F P E V K K S S

2032 462 2107 487 2182 512 2332 562 2482 612 2632 662 2257 537 2407 587 2557 637 1957 437 GAA CCA E P ACA T ACT T GGT G GAA GCA TTA AAG AGA E A L K R AGT S TCA TCA ATT CAT ACT AGC ACT GAT AAA TTA ACA AAT TCA ACT S S I H T S T D K L T N S T CCA CCA CCA CCA CCA P P P P P ATT ATT AAA CCA TCA GTT AAG ATG AGA AAT TTC AAT I I K P S V K M R N F N TCA TTC ATT CAA TCA S F I Q S GGT AAT A G N S TTA ATG GCA CAA L M A Q AAG K TCT S GCA TTC F E B B B B B ¢ G ATG AAA K AAT ATA AAG AAT AAT CCA TCA GTT TTA TTG AAT AGT N I K N N P S V L L N S TCT S Σ P CCA AAT N TCA S TCT AAT GAC G CAA Q TTG L GGT TCA ACA CTT TCA CCA AGT G S T L S P S CCA ATG TCA GGA GGA GGA P M S G G G G TCT S TGG GAT AAA TTG GAT GAA ACA W D K L D E T TTACAA Q GCT Ц ø AAA K GCA AAG AAT AAA TTA ATC K N K L I ¢ CCA P TTA CTT L L gat to<u>a agc tt</u>a d s s l HindIII TCA S S TCC CAT H TCA GAA E S CCA P LLL E CCA P GAA E GGT GGA AAG AGT AAT AAA CCT GCT AAA CCA G G K S N K P A K P ATT I GGT G CCT P GGT ACA G T CCA P ACA T GAA E TCA S TCA S GGT GGT AAA AAA K AGA R AGT S TCA S GTT V CCA CCA CCA P P P К GTT CAA O V Q O TTC ATT I F I ATT ACA I GAA E S TCC CAA GAA E 0 0 0 GAA ATT G E I E AAA AAA K ATT I 0 0 0 0 0 К ATG . M LDD D AAA K GAG E CCT P TCT S CTT L 000 0 GAA E TGG W ATG M AAT N TTT F CCA P L CTT БGТ GGA G IJ CCA P GAT D TCA S GCA A TTA TTA AGA L L R AAT N AGA R GGA G TTTГщ ATT CCA I GAA E GTT V ACT T GGT G GAT D Н 9 9 9 GGA IJ TCA AAA K GAT D TTA L ACT T GGT G TTT F ATT ACA I T AAT GGT N G ATA CCA I P CCA ATT P I CCA CCT P P AAA K AAT N G GT G CAA Q CTT Ц GAG AAT ( E N CTT L CAA Q AAT N ГЭЭ U AAG K CCA . GAA E TGG W GAA E ATT I ССT Р AGT ЧGД S U 2333 563 2483 613 1883 413 1958 438 2033 463 2108 488 2183 513 2258 538 2408 588 2558 638

2707 687 GAT AAG GTG GAA TTA GAG AGT TTA TTT AGT GCC AAA GCA CCA ACA GTA AAG GTA GAA AGT AAA CAA TTA ACA D K V E L E S L F S A K A P T V K V E S K Q L T 2633 TTG 0 663 L I

3082 812 3232 862 3307 887 3382 912 2782 712 2857 737 2932 762 3007 787 3157 837 3457 937 3532 962 AAA AAG K K AAA CAA K Q TCA S 3458 GAG TTC CAA AAG ATC GCC AAA GTA CAA TAT CAA AGA ATT GAA AAG GAA ATC GAT GAA ATG AAT AAA GCT TTC GAA 938 e f Q k i a k v Q Y Q r i e k e i d e m n k <del>a f</del> e ATA I CTC L GCC A GGT GGT GCA GAG TTA CCA CAT A E L P H GAA CAT GCT TCA GAG GTA AGT TTA AAT AAT AAT ATC ATC AGT GAT AGT AGT GAA ATT AAA CGT TCC ATC GAT TTG E H A S E V S L N N I I S D S S E I K R S I D L GTA CCA ATG ATC AAT GAT CCA TTG TTT GCT CAT GAT AAA CAT TGG ATT CAC AAA ATC ACC V P M I N D P L F A H D K H W I H K I T AAG Z TAC Y 0 0 0 0 0 CGT R GAT AAC AAA CTT D N K L GAA TTG 7 E L I TTC F TTG L TTC F ATC I TCA ACC ACT S T T HindIII CAT GCT A CAA Q ATT I н DTT J ATG M TTC F CAA AAT N 0 CAA Q TTA CCA AAG ATG AGA GAT GCT CGT AGT AAC L P K M R D A R S N TTAGAG E AAA GCA ATC AAA GCA GCC TCA K A I K A A S GGT AAT TAT GTC AAT GGT G N Y V N G CCA GAG ATT TGG AAT ATT GGT P E I W N I G TTA AAA GCA L K A Ц ATG CAA Q GAC D Σ ATT s TCC GGT G н TCA CGT S R GCC A TTC F CAA Q TAT ( CAT H TGT U AAA GAG K GAT D AAT N AAA K GAA E AAT CTT L GAC ATT TTG AAA TTC ATC TTA GCA ATT D I L K F I L A I Z GAT ATC A D I I I CCA AAA ( P K GCA GAT D GAG GCT ATT E A I AAA ACT CTT CAA GAT CGT ATT K T L Q D R I Ø GAT ATG AAG AAA D M K K CTC L ATG M ATT ( GAA GAT TTA GTA CCT E D L V P CAA ATT Z Q I I ATG GAT M D GAG GAT ATC E D I TTC AAG GTG TTG GAA ACT F K V L E T EcoRV AAG ATG ( K M ATC GTT V н G GTT AAA K ACA T  $\geq$ GTC ∨ AAA K TTC TTG GCT F L A ACA ACC T TAT ATG CTC Y M L H GGT CTC G TTA AGT L S GAT TTC ( D F 7 L TG CCA P GTT  $\geq$ CAA Q GCA A LDD D GTT  $\geq$ AAG AGA 7 K R I TTA CAT L H GAA E GCA TTT A F GAA CGT E R GTG GAA E TTT F CAA Q  $\geq$ GAG E AAT N CAA Q TTC F AAA ы CTC L CCA P AAA K ATC ATT I TTA L GGT G AGA GCC A AGT S പ്പ 3308 888 3383 913 2708 688 2783 713 2858 738 2933 763 3008 788 3083 813 3158 838 3233 863

3607 987 TTA L TTT F ATT AAT AAC I N N TTT TCG ACA F S T GTT TTC V F CCC GAT ( CAA Q ACT T TCA CCA AAA 7 P K GAA E GGT G TAC TTT 0 Y F 0 0 TCT S GAA ATC ACC E I T 3533 963 3682 1012 ATG GAA M E AAA . K TCA S AAT N GAA E TTG L GAA E GCT A AAG K AGA R ATT I ATG . M GCT A CAA Q TAT Y GAA E GGT G TAC Y GCC A GAA AAA E K CTT L GAC D GAA E 3608 988

3757 1037 GTT V AGA R AGA R GAT D AAA K TTC F CAA TTA Q L G GT G TCT S AGA R ATT I CAA Q rCT s S TCC GAT CTT D CAA Q CTT L GGT G AAA GGT ( K G GAA E CCA P GAT D 3683 1013

3832 1062 TCA ACC ACA ACT S T T T ACT T AAA AAT TTA AAA TCA K N L K S AGA R TTA L AGT S GAT D GTT  $\geq$ CAA AAT ( Q N <sup>1</sup> CAA ATG ( Q M ( GCT A GTC ATT O TCT S GAT D GGT U 3758 1038

3907 1087 GGC CAA TTA AAA AAA G Q L K K 0 ATT TTA AAA CCA TCA I L K P S Ý TCA CAA Q TCT S CCT P L L ATT AAA ATT GAA I K I E CCA CCA ACT P P T CCA AAT ACT P N T 3833 1063

3908 TAA 1088 \*

# VI. SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES POUR LES CONSTRUCTIONS CONCERNANT L'UBIQUITINE

• Pour les protéines de fusion GST-Ub (avec poly-glycine entre GST et Ub)

**Ub1** : <u>GGATCC</u>GGTGGTATGCAAATCTTTGTAAAG (*BamHI*) **Ub2** : <u>GAATTC</u>TTAACCACCTCTTAATCTGAGGACCAAG (*EcoRI*, *STOP*)

• Pour les constructions double-hybride

**Ub3** : <u>ACTAGTGAATTC</u>ATGCAAATCTTTGTAAAGAC (*SpeI et EcoRI*) **Ub4** : <u>CTCGAG</u>TTATCTTAATCTGAGGACCAAGTG (*XhoI, STOP*) **Ub5** : <u>CTCGAG</u>TTAACCACCTCTTAATCTGAGGAC (*XhoI, STOP*)

Ubiquitine :

75 25  $1 \text{ ATG CAA ATC TTT GTA AAG ACC CTC ACC GGT AAG ACT ATT ACA CTC GAA GTT GAA GGT AGT GAC AAT ATT GAG AAT 1 M Q I F V K T L T G K T I T L E V E G S D N I E N$ 8 / B

150 50 GAT AAA GAA GGT ATT CCA CCA GAT CAA CAA CGT CTC ATT TTC GCT GGT AAA CAA TTA D K E G I P P D Q Q R L I F A G K Q L 76 GTA AAA ACA AAG ATT CAA 26 V K T K I Q

GAA GAT GGT CGT ACT CTC TCT GAT TAC AAT ATC CAA AAA GAA TCA ACT CTC CAC TTG GTC CTC AGA TTA AGA GGT 225 E D G R T L S D Y N I Q K E S T L H L V L R L R G 75 151 51

226 GGT 76 G

# **PUBLICATIONS**

# **PUBLICATIONS :**

- Aubry, L., **Mattei, S.**, Blot, B., Sadoul, R., Satre, M., Klein, G., 2002 Biochemical characterization of two analogues of the apoptosis-linked gene 2 protein in *Dictyostelium discoideum* and interaction with a physiological partner in mammamls, murine Alix. J. Biol. Chem. 277, 21947-21954
- Mattei, S., Ryves, W.J., Blot, B., Sadoul, R., Harwood, A.J., Satre, M., Klein, G., Aubry, L., 2005 Dd-Alix, a conserved endosome-associated protein, controls *Dictyostelium* development. Dev. Biol. 279, 99-113
- Mattei, S., Klein, G., Satre, M., Aubry, L., 2006 Signal transduction and trafficking : Alix at the crossroad. Eur.J.Cell.Biol : submitted
- Mattei, S., Klein, G., Satre, M., Aubry, L., Dd-TSG101 affects Alix turnover in *Dictyostelium*. Manuscript in preparation.